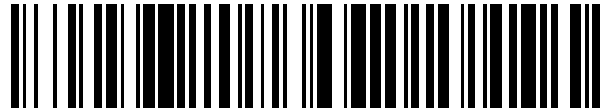


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 929**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2005 E 05744476 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1754058**

54 Título: **Procedimiento para determinar la cantidad de CD36 circulante**

30 Prioridad:

**26.05.2004 DK 200400829**

**13.08.2004 DK 200401222**

**13.08.2004 US 601123 P**

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

**27.05.2016**

73 Titular/es:

**REGION NORDJYLLAND (100.0%)**

**Niels Bohrs Vej 30**

**9220 Aalborg Øst, DK**

72 Inventor/es:

**HANDBERG, AASE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 571 929 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar la cantidad de CD36 circulante.

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de cuantificación de la proteína CD36 o un fragmento de la misma de acuerdo con las reivindicaciones 1-7 en una muestra de plasma del paciente utilizando un ensayo basado en un anticuerpo específico y la correlación del nivel así medido de CD36 con el riesgo relativo de que dicho paciente desarrolle un estado patológico, tal como aterosclerosis, aterotrombosis y resistencia a la insulina. Aspectos adicionales de la invención están relacionados con un procedimiento de predicción del desarrollo de un estado patológico, tal como aterosclerosis o aterotrombosis en un ser humano que padece diabetes y/u obesidad, y un kit de diagnóstico para la detección de CD36 en el plasma sanguíneo y/o la cuantificación del nivel relativo de CD36 en el plasma sanguíneo.

## ANTECEDENTES

- 15 Por todo el mundo la incidencia de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está aumentando y constituye un factor siempre creciente de gasto en los sistemas sanitarios especialmente del mundo occidental. En el momento de la diagnosis aproximadamente el 50 % de estos pacientes presentan complicaciones, especialmente en forma de aterosclerosis. El desarrollo de aterosclerosis y aterotrombosis puede retrasarse mediante tratamiento intensivo de la dislipemia, la resistencia a la insulina y también la desregulación de la diabetes.

- Típicamente, los factores de riesgo para la aterotrombosis en los pacientes con diabetes son monitorizados en muestras sanguíneas tales como mediciones de la regulación de la diabetes (HbA1c) combinadas con mediciones de fracciones de colesterol y triglicéridos (dislipemia). Se usan ECG, CRP sensible y enzimas marcadoras de isquemia cardiaca para el examen de aterosclerosis y trombosis cardiaca así como con fines de diagnóstico y monitorización. Además, es necesario evaluar los síntomas clínicos de la aterosclerosis implicando así una gama compleja de pruebas y evaluaciones clínicas con el fin de obtener una valoración realista de los factores de riesgo.

- Una medición integrada del nivel y el riesgo de aterosclerosis y/o aterotrombosis en pacientes, como los pacientes con diabetes, facilitaría y permitiría una intervención temprana proporcionando así considerables ganancias sanitarias y económicas.

- Griffin, E. y col. (Nature Medicine, Vol. 7, N° 7, julio de 2001, pp 840-846) han demostrado que un aumento mediado por glucosa en la eficiencia de traducción de mRNA de la CD36 tiene como resultado un aumento de expresión de CD36 del receptor *scavenger* (basurero) de macrófagos y que la expresión de CD36 se incrementaba en las lesiones de endarterectomía de pacientes con una historia de hiperglucemia. Así, el aumento de traducción de transcripciones de CD36 bajo condiciones de glucosa elevada proporciona un mecanismo para aterosclerosis acelerada en los diabéticos. Griffin t col. utilizan la inmunocitoquímica en lesiones de la arteria carótida humana y las células mononucleares sanguíneas periféricas humanas para detectar los niveles de expresión de CD36.

- Liang C-P y col. (JCI1 13:763-73, 2004) descubrieron, en un estudio que usa macrófagos procedentes de ratones ob/ob, la prueba de que una mayor expresión de la proteína CD36 en macrófagos resistentes a la insulina está causada por deficiente señalización de la insulina, y que la deficiente señalización de la insulina de macrófagos predispone a la formación de células espumosas y aterosclerosis en estados resistentes a la insulina. La solicitud de patente publicada JP N° 2000180447 describe un procedimiento y un kit de reacción para detectar un antígeno CD36 en una muestra de organismo tal como la sangre como un marcador para la presencia de y/o el grado de infarto de miocardio agudo. Sin embargo, en el documento JP 2000180447 no se muestra o menciona una correlación entre la presencia de antígeno CD36 en una muestra sanguínea de un paciente o sujeto y un riesgo de que dicho paciente o sujeto desarrolle aterosclerosis.

- Por otra parte, se sabe que una caída en los niveles de CD36 en las células de un paciente después de iniciar la terapia de inhibidor de la proteasa en relación con el nivel antes de la terapia de inhibidor de la proteasa es predictiva del desarrollo subsiguiente de lipodistrofia asociada con la terapia antirretroviral. El nivel de CD36 se mide en las células utilizando un análisis citométrico de flujo. Las células pueden ser monocitos de una muestra sanguínea o una fracción de la misma (solicitud de patente CA N° 2289365).

Así, parece que las mediciones de la proteína CD36 unida a la membrana como molécula marcadora para afecciones relacionadas con la aterosclerosis tienen un potencial de diagnóstico. Sin embargo, con el estado actual de la técnica, tales mediciones implicarán el uso de inmunocitoquímica y/o citometría de flujo que requieren el uso de

aparatos complicados y que no resultan útiles inmediatamente para un laboratorio hospitalario estándar.

Existe una necesidad de un procedimiento simple y económico para predecir quiénes tienen riesgo de desarrollar aterosclerosis y/o aterotrombosis. Dicho procedimiento proporcionaría una medición integrada de la influencia de varios factores de riesgo en un análisis de una muestra de plasma sanguíneo midiendo el nivel de un analito circulante tal como una proteína no unida o una fracción de la misma o un complejo soluble que comprende dicha proteína o fracción presente en el plasma sanguíneo.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

10

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un procedimiento que integra una medición de la influencia de varios factores de riesgo en un análisis de una muestra de plasma sanguíneo midiendo el nivel de proteína CD36 circulante o proteína CD36 no unida a células presente en el plasma sanguíneo. La proteína CD36 circulante puede estar presente como la proteína no unida (soluble) o una fracción de péptido de la misma, o la proteína CD36 puede estar presente unida a una fracción de lipoproteína tal como la lipoproteína de baja densidad (LDL), la IDL (lipoproteína de densidad intermedia) o la VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) en una fracción de elevado peso molecular (MW) del plasma sanguíneo, o puede estar presente en micropartículas desprendidas de células tales como plaquetas, monocitos o adipocitos después de la activación por varios estímulos. Así, en un aspecto la invención proporciona un procedimiento inmunológico para medir la cantidad de proteína CD36 circulante en una muestra de plasma libre de células, que comprende las etapas de:

20

(i) proporcionar una muestra de plasma que ha de ser investigada,

25

(ii) degradar complejos de elevado peso molecular en dicha muestra de plasma,

(iii) proporcionar un anticuerpo anti-CD36,

30

(iv) exponer la muestra que ha de ser investigada al anticuerpo anti-CD36 unido a una fase sólida, opcionalmente exponer el complejo CD36-anticuerpo a un segundo anticuerpo anti-CD36, y

35

(v) detectar y cuantificar la cantidad del anticuerpo que se une a CD36. Preferentemente, la proteína CD36 circulante o una fracción detectable de anticuerpo de la misma se une a una fracción de lipoproteína, que puede ser una lipoproteína de baja densidad, una lipoproteína de densidad intermedia, y/o una lipoproteína de muy baja densidad que está presente preferentemente en una fracción de plasma de elevado peso molecular en una muestra libre de células que puede obtenerse de un sujeto o paciente. Alternativamente, la proteína CD36 puede estar presente en micropartículas desprendidas de células tales como plaquetas, monocitos o adipocitos después de la activación por varios estímulos.

40

En otros aspectos la descripción proporciona un kit de reactivos para llevar a cabo el procedimiento inmunológico, y un procedimiento de predicción del desarrollo de aterosclerosis y/o aterotrombosis en un paciente que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de plasma libre de células de dicho paciente, (b) poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-CD36 para obtener un complejo CD36-anticuerpo; (c) incubar dicha muestra con dicho anticuerpo para obtener un complejo CD36-anticuerpo, (d) poner en contacto dicho complejo con un compuesto marcado que tiene afinidad específica por dicho complejo; y (e) detectar el compuesto marcado unido a dicho complejo, por lo que puede medirse la cantidad de proteína CD36; (f) determinar si los niveles de CD36 medidos en la etapa (e) son superiores a los niveles estándar medidos en una población de referencia sana, siendo el aumento en el nivel de CD36 circulante predictivo del riesgo de que el paciente desarrolle un estado patológico, tal como aterosclerosis y/o aterotrombosis

#### 50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55

La fig. 1 muestra una curva de dilución de plasma ELISA de CD36 obtenida midiendo la CD36 (eje y) en diluciones decrecientes de plasma almacenado (eje x). El fondo es bajo, lo cual asegura las mediciones en el intervalo inferior, y la curva de dilución es aproximadamente lineal a lo largo de un intervalo de dilución multiplicado por 10, lo cual es ventajoso porque las muestras procedentes de una población con una elevada variación interindividuos pueden medirse sin las largas mediciones de la dilución adicional de muestras.

La fig. 2 muestra la CD36 y 3 parámetros de lípidos (Chol = colesterol; HDL; y TG = triglicéridos) (eje y) en fracciones FPLC de plasma (eje x). La curva para CD36 alcanza su nivel máximo junto con una fracción de

colesterol.

La fig. 3 muestra la CD36 medida por ELISA (eje y, panel inferior) en fracciones de FPLC de plasma humano (eje x). Puede apreciarse a partir de la curva que el contenido de CD36 alcanza su nivel máximo en las fracciones 9 y 10 que representan moléculas/partículas de aproximadamente 1 millón de gram/mol (marcadores mw en el eje x inferior), lo cual es una indicación de que la molécula 88kD CD36 está presente en un complejo mucho más grande. El análisis de las fracciones 9 y 10 para ApoB y ApoA muestra que la concentración de CD36 es 0,08 g/l para ApoB y sólo 0,01 g/l para ApoA mientras que las fracciones 15 y 16 muestran la relación inversa (panel superior) que indica que la CD36 está presente en las mismas fracciones de FPLC que lo está el colesterol LDL. El panel central muestra Western blots de CD36 en fracciones de FPLC.

La fig. 4 muestra un diagrama de concentraciones de CD36 en plasma basal (en ayunas) medidas en unidades arbitrarias con intervalos SEM tal como se indica del estudio 1 en este documento. Las columnas muestran una diferencia significativa entre la CD36 basal medida en plasma procedente de sujetos diabéticos de tipo 2 obesos ( $p < 0,0005$ ), y obesos ( $p < 0,02$ ) comparados con sujetos de control delgados, compárese también la tabla 1.

La fig. 5 es un gráfico que muestra la concentración de CD36 en plasma (se utilizan unidades arbitrarias) frente a la concentración (mmol/l) de glucosa plasmática en ayunas (Fp-glucosa). La CD36 en plasma fue correlacionada significativamente con la glucosa plasmática en ayunas, ( $r = 0,69$ ,  $p < 0,0001$ ).

La fig. 6 es un gráfico que muestra la concentración de CD36 en plasma (se utilizan unidades arbitrarias) frente a la Fp-glucosa (mmol/l) en pacientes con DM2. El gráfico muestra una correlación consistente entre elevada CD36 en plasma y un nivel elevado de Fp-glucosa ( $r = 0,69$ ,  $p < 0,03$ ).

La fig. 7 es un gráfico que muestra la concentración de HbA1c (%) frente a la concentración de CD36 en plasma (se utilizan unidades arbitrarias) en pacientes con DM2. El gráfico muestra una correlación positiva, y aproximadamente lineal, entre las concentraciones de CD36 en plasma y las concentraciones de HbA1c (%) ( $r = 0,76$ ,  $p < 0,0001$ ).

La fig. 8 es un gráfico que muestra un análisis de correlación de sCD36 (CD36 soluble, CD36 en plasma) y velocidades de infusión de glucosa durante el pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico en el estudio 1. La sensibilidad a la insulina se midió como velocidades de infusión de glucosa (GIR) al final de un pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico de 3 h a una velocidad de infusión de insulina de 40 mU/m<sup>2</sup> por min. La sCD36 (eje x) está trazada frente a la GIR, los círculos negros representan pacientes diabéticos de tipo 2, los círculos abiertos representan sujetos de control obesos y delgados. Se realizó una correlación inversa de la sCD36 y la GIR ( $r = -0,67$ ,  $p < 0,0001$ ,  $N = 31$ ). El gráfico muestra una relación inversa entre la CD36 en plasma y la sensibilidad a la insulina. La fig. 9 muestra las velocidades de infusión de glucosa (GINF, mg/min/m<sup>2</sup>) durante los últimos 30 min. de un pinzamiento hiperinsulinémico euglucémico de 3 horas con una velocidad de infusión de insulina de 40 mU/ m<sup>2</sup>/min, compárese con el estudio 1.

La fig. 10 muestra la CD36 soluble en controles de obesidad, obesos relativos y pacientes diabéticos de tipo 2. La CD36 soluble (sCD36) se midió en plasma procedente de sujetos diabéticos de tipo 2 obesos (diabéticos), y obesos relativos (FDR) y sujetos de control de obesidad (obesos) mediante un ensayo ELISA, y se expresa en relación con plasma almacenado (unidades relativas). \* $p < 0,025$  comparado con los pacientes diabéticos de tipo 2 obesos. Los participantes en el estudio se describen en la tabla 5.

La fig. 11 es un gráfico que muestra la GINF (velocidad de infusión de glucosa, mg glucosa/m<sup>2</sup>/min) frente a la concentración de CD36 en plasma medida en unidades arbitrarias durante los últimos 30 min de un pinzamiento hiperinsulinémico euglucémico de 3 horas con una velocidad de infusión de insulina de 40 mU/m<sup>2</sup>/min. El gráfico muestra una relación inversa entre la CD36 en plasma y la sensibilidad a la insulina incluyendo sujetos caracterizados en las tablas 1 a 4.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

- (i) proporcionar una muestra de plasma que ha de ser investigada,
- (ii) degradar complejos de elevado peso molecular en dicha muestra de plasma,

- (iii) proporcionar un anticuerpo anti-CD36 tal como se define en este documento,
- (iv) exponer la muestra que ha de ser investigada a una fase sólida y el anticuerpo, y,
- 5 (v) detectar y cuantificar la cantidad del anticuerpo que se une a la CD36; y en un aspecto más preferente de la invención se proporciona un procedimiento para determinar la CD36 humana en una muestra de plasma mediante inmunoensayo enzimático ELISA en fase sólida que comprende las etapas de
- 10 (i) proporcionar una muestra de plasma que ha de ser investigada,
- (ii) degradar complejos de elevado peso molecular en dicha muestra de plasma,
- (iii) proporcionar un anticuerpo anti-CD36,
- 15 (iv) exponer la muestra que ha de ser investigada al anticuerpo anti-CD36 unido a una fase sólida, opcionalmente exponer el complejo CD36-anticuerpo a un segundo anticuerpo anti-CD36, y
- 20 (v) detectar y cuantificar la cantidad del anticuerpo que se une a la CD36,
- y donde la fase sólida preferentemente es una placa de microtitulación, la CD36 está presente preferentemente (es parte de) en una fracción de plasma de elevado peso molecular, siendo dicha fracción de plasma de elevado peso molecular preferentemente un complejo CD36-lipoproteína; dicho anticuerpo anti-CD36 se selecciona
- 25 preferentemente del grupo constituido por anticuerpos monoclonales tal como se especificó anteriormente y que incluyen el sc7309 (CD36 (SMf), IgM de ratón), y anticuerpos específicos de CD36 policlona, tales como sc5522 (CD36 (N-15), IgG de cabra, epítipo N-terminal (h)), sc9154 (CD36(H-300), IgG de conejo, epítipo 1-300 (h)); dicha determinación se lleva a cabo preferentemente mediante un inmunoensayo enzimático en fase sólida, donde, en el inmunoensayo enzimático, la muestra es expuesta en primer lugar a un anticuerpo de unión a CD36 humana, y la
- 30 cantidad de CD36 unida se mide usando un segundo anticuerpo que lleva una marca enzimática, donde la medición se lleva a cabo mediante una reacción cromática catalizada por enzima o quimioluminiscencia. La CD36 es una proteína transmembrana de 471 aminoácidos (que tiene 1 o 2 dominios que se extienden por la membrana en las posiciones de residuos de aminoácidos 439-460 y posiblemente 7-28). La CD36 es una glicoproteína de 88kDa altamente glicosilada con sitios de unión de palmitoil. La CD36 está presente en caveolas donde puede representar
- 35 un papel en la mediación del movimiento del colesterol celular dentro y fuera de las células. La CD36 se expresa mediante monocitos, macrófagos, plaquetas, células endoteliales microvasculares, el epitelio glandular mamario, adipocitos y tejido muscular. Es un receptor multifuncional que se une a la LDL oxidada (OxLDL), ácidos grasos de cadena larga (LCFA), fosfolípidos aniónicos, células apoptóticas, trombospondina (TSP), colágeno y eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum*.
- 40 La CD36 tiene numerosas funciones celulares. Es una translocasa de ácidos grasos (FAT) y pertenece a la familia de receptores *scavenger* Clase B, que representa un papel principal en la absorción de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) sobre la membrana celular en un tejido metabólicamente activo, en la formación de células espumosas, y en la absorción de OxLDL por los macrófagos. Los macrófagos ricos en lípidos son diferenciados entonces dentro
- 45 de células espumosas y contribuyen a la formación de lesiones ateroscleróticas. Además, la CD36 de macrófagos, junto con la TSP y la integrina  $\alpha v \beta 3$ , pueden fagocitar los neutrófilos apoptóticos. Además, la proteína es uno de los receptores de colágeno en la adhesión y agregación de plaquetas. La CD36 también puede mediar la citoadherencia de los eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum* al endotelio de vénulas postcapilares de diferentes órganos. Por otra parte, la CD36 citoplasmática representa un papel importante en la transducción de
- 50 señales interactuando con las tirosinas quinasas de la familia Src. La deficiencia en la CD36 en las poblaciones asiática y africana se ha asociado a la resistencia a la insulina. Monty Krieger (julio de 1999) Vol. 68 pp. 523-558 (doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.523) establece que el riesgo de enfermedad cardiovascular debido a aterosclerosis aumenta con concentraciones crecientes de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) y es inversamente proporcional a los niveles de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL). En los ratones, la SR-BI
- 55 representa un papel clave en la determinación de los niveles de colesterol HDL en plasma y en la mediación de la administración regulada y selectiva de colesterol HDL a tejidos esteroideogénicos y el hígado. Las alteraciones significativas en la expresión de SR-BI pueden tener como resultado trastornos cardiovasculares y reproductivos. La SR-BI puede representar un papel similar en los seres humanos; así, la modulación de su actividad puede proporcionar la base de futuras estrategias para el tratamiento y la prevención de la enfermedad aterosclerótica.

Además, Tunstall, R.J. y col. (AM J Physiol Endocrinol Metab 283: E66-E72, 2002 (publicado por primera vez el 12 de marzo de 2002; 10.1152/ajpendo.00475.2001) descubrieron que después de 9 días de ejercicio hubo un aumento significativo (36 %, P 0,04, efecto del tratamiento) en la expresión del gen humano FAT/CD36 de los músculos esqueléticos comparado con el estado sin entrenamiento.

5

Las características conocidas de la CD36 a partir de octubre de 1999 han sido resumidas por Laurence M. Howard; J.L. McGregor, compárese con [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/1625576610\\_g.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/1625576610_g.htm), una parte de lo cual se reproduce más adelante:

10 Nombres alternativos para la CD36 (Determinante de grupo 36) incluyen CD36 [nombre de gen HUGO], GPIIb, GPIV, antígeno OKM5, y PASIV.

La actividad bioquímica de la CD36 incluye:

15 Reconocimiento de la lipoproteína de baja densidad oxidada, ácidos grasos de cadena larga, fosfolípidos aniónicos, tipos de colágeno I, IV y V, trombospondina (TSP) y eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum*, reconocimiento de neutrófilos apoptóticos en cooperación con TSP y avb3.

La función celular de la CD36 incluye: receptor *scavenger* para LDL oxidada y segmentos externos de  
20 fotorreceptores desprendidos;

Reconocimiento y fagocitosis de células apoptóticas;

25 Molécula de adhesión celular en adhesión y agregación de plaquetas, interacción plaquetas-monocitos y plaquetas-células tumorales;

Citoadherencia de eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum*;

Relevancia patológica de la CD36 y función de la CD36 en un animal intacto:

30

Aterogénesis: unión a la pared de los vasos, infiltración y formación de células espumosas macrófagas;

Malaria: La citoadherencia de las células infectadas a las células endoteliales microvasculares es un factor importante en la virulencia de la malaria cerebral;

35

Inflamación: Resolución de la inflamación por fagocitosis de PMN envejecidos;

Visión: la fagocitosis mediada por CD36 de los segmentos externos de los bastones se piensa que es crítica para la función visual normal:

40

Deficiencia de CD36: los individuos Naka-negativos no expresan la CD36 en sus plaquetas (variante tipo II) o en sus plaquetas y monocitos (variante tipo I) (Yamamoto y col. 1994). Esto puede deberse predominantemente a una mutación por sustitución Pro90 a Ser, pero hasta ahora no se han asociado problemas fisiológicos a esta deficiencia.

45

Familias moleculares en las cuales la CD36 es un miembro:

CD36-->clase SR-B-->receptores *scavenger* de defensa del huésped-->superfamilia de receptores *scavenger*

Estructura molecular de la CD36:

50

471 residuos de aminoácidos;

Región transmembrana (residuos 439-465) y,

55

La región amino-terminal de 438 aminoácidos puede ser enteramente extracelular o puede tener una segunda región transmembrana potencial cerca del extremo amino terminal;

Cola citoplasmática corta aa (residuos 466-471);

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

Se informa que la masa molecular de la CD36 depende del tipo de célula tal como se muestra a continuación:

5

Plaquetas 88 kDa/113 kDa

Eritrocitos fetales 78 kDa

10

Células epiteliales mamarias 85 kDa

Eritroleucémico 88 kDa, 85 kDa, 57 kDa

HeLa 85 (160) kDa 85 kDa

15

Células endoteliales microvasculares dérmicas 80-90 kDa

En la modificación postranscripcional de la CD36 se han identificado dos formas alternativas de CD36 mRNA. La primera se expresa en células HEL y omite los residuos de aminoácidos 41-143- La segunda aún no ha sido traducida pero en la cual se han omitido los últimos 89 residuos.

20

Modificación postraduccional de la CD36:

25

Se afirma que la CD36 está fuertemente glicosilada, con 10 sitios de N-glicosilación en la porción extracelular. Se ha sugerido que la glicosilación confiere su resistencia a la división proteolítica;

Se ha demostrado que la treonina 92 está fosforilada;

La CD36 también está palmitoilada en ambas colas citoplasmáticas N-terminal y C-terminal.

30

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

35

Oct-2: El primer gen que se demuestra que es regulado por el factor de transcripción Oct-2 durante la diferenciación de células B;

35

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

40

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

40

Los sustratos para la CD36 son desconocidos. Puede ser posible que la CD36 regule la autofosforilación del residuo Thr92. Las enzimas que modifican la CD36 son desconocidas. Puede ser posible que el Thr92 sea fosforilado por treonina quinasa(s) extracelular(es).

45

La señalización intracelular está asociada probablemente con la fosforilación de Fyn, Lyn y Yes, pero la manera por la cual la cola citoplasmática interactúa con estas PTK se desconoce.

Principal expresión celular de la CD36:

50

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

55

Los eventos fisiológicos regulados por la ligación de la CD36 aún se desconocen en gran medida. Hasta el 50 % de LDL oxidada se ingiere a través de la CD36, de este modo la CD36 parece ser un gran receptor *scavenger*. Sin embargo, dada la ausencia aparente de estados patológicos en sujetos con deficiencia de CD36, otros mecanismos parecen ser capaces de compensar esta ausencia.

Anticuerpos monoclonales específicos de la CD36 [NOMBRE (ID de taller) FUENTE o REFERENCIA]:

185-1G2 Vilella

5 131.1 Tandon, Rockville

131.2 Tandon, Rockville

131.4 Tandon, Rockville

10

131.5 Tandon, Rockville

131.7 Tandon, Rockville

15 NAM28-8C12 Blanchard, Nantes

AmAK-5 Kehrel, Muenster

CLB-IVC7 CLB, Amsterdam

20

Lyp 10.5 McGregor, Lyon

Lyp 13.10 McGregor, Lyon

25 El anticuerpo anti-CD36 utilizado en este documento puede ser un anticuerpo monoclonal tal como se describió anteriormente, y es preferentemente un anticuerpo monoclonal aislado, obtenible mediante un procedimiento de inmunización en el cual se utiliza CD36 humana purificada o recombinante como componente antígeno y el anticuerpo es preferentemente específico para diversas fracciones de la proteína CD36 que está presente en el plasma sanguíneo humano en forma soluble, opcionalmente como parte de un complejo CD36-lipoproteína, tal como  
 30 CD36 o una fracción de la misma unida a lipoproteína de baja densidad (LDL), IDL (lipoproteína de densidad intermedia) o VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) que puede estar presente en una fracción de elevado peso molecular del plasma libre de células. Que el plasma está libre de células puede verificarse microscópicamente después de la centrifugación de la muestra de sangre a 3000G. Preparaciones de plasma adecuadas pueden ser plasma procedente de sangre estabilizada con heparina, sangre estabilizada con citrato o estabilizada con EDTA.  
 35 Ejemplos de anticuerpos útiles en la invención son sc5522 y sc9154 (ambos de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA). Los anticuerpos utilizados en el ensayo ELISA para detección de CD36 circulante en plasma son marcados preferentemente por facilidad de detección, siendo la marca preferentemente en forma de una biotinylación que resulta perfectamente conocida para un experto en la materia.

40 En el contexto de la presente invención, se entiende que los "procedimientos inmunológicos" significan procedimientos analíticos basados en inmunoquímica, en particular en una reacción antígeno-anticuerpo. Ejemplos de procedimientos inmunológicos incluyen inmunoensayos tales como radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA, combinado con la técnica en fase sólida: ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)) o, si no, ensayos de inmunofluorescencia. El inmunoensayo se lleva a cabo exponiendo la muestra que ha de ser  
 45 investigada a un anticuerpo de unión de CD36 y detectando y cuantificando la cantidad de CD36 unida a este anticuerpo. En estos ensayos, la detección y cuantificación se lleva a cabo directa o indirectamente de una manera conocida. Así, la detección y cuantificación de los complejos antígeno-anticuerpo se posibilita utilizando marcas adecuadas que pueden ser transportadas por el anticuerpo dirigido contra la CD36 y/o por un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario. Dependiendo del tipo de inmunoensayos anteriormente mencionados, las  
 50 marcas son, por ejemplo, marcas radioactivas, una marca quimioluminiscente, tintes fluorescentes o, si no, enzimas, tales como fosfatasa o peroxidasa, que pueden ser detectadas y cuantificadas con la ayuda de un sustrato adecuado.

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

Para llevar a cabo un procedimiento según la invención, una muestra adecuada, tal como una muestra líquida del



paciente, se aplica a la fase sólida. La muestra es preferentemente una muestra de plasma donde la CD36 o una fracción de la misma está presente en forma no unida o está presente en una forma que podría unirse a su ligando LDL. La suposición en este documento de que sCD36 está presente en el complejo con una fracción de elevado peso molecular en el plasma implica que se prefiere congelar y descongelar las muestras que han de ser probadas, de modo que dicho complejo de elevado peso molecular (complejo lípido-proteína) posiblemente se degrada.

El inventor de la presente invención ha demostrado que la CD36 o una fracción reactiva inmunológica de la misma está presente en una muestra de plasma libre de células y puede ser detectada y cuantificada utilizando un ensayo inmunológico sencillo y correlacionada con el riesgo de desarrollo o la presencia de diversos estados patológicos que se describe en este documento y específicamente en los ejemplos y reivindicaciones de más adelante. Además, el inventor ha demostrado que el nivel relativo medido de CD36 presente en una muestra de plasma está correlacionado linealmente con la glucosa plasmática en ayunas HbA1c en pacientes con DM2 y existe una correlación lineal negativa con la GINF (velocidad de infusión de glucosa) durante un pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico que implica una relación inversa a la sensibilidad a la insulina. Además, el inventor ha demostrado que la IL-6 circulante puede asociarse independientemente con sCD36 en sujetos, principalmente en sujetos intolerantes a la glucosa. Este descubrimiento, junto con la asociación positiva de masa de grasa e IL-6 ( $r=0,20$ ,  $p=0,03$ ), sugiere que la IL-6 derivada de la grasa podría conducir a resistencia a la insulina y mayor sCD36 concomitantemente, posiblemente como parte del proceso inflamatorio leve, que se cree que es un contribuyente muy importante al desarrollo de resistencia a la insulina y aterosclerosis.

La sCD36 circulante fue asociada positivamente con la alanina transferasa sérica ( $r=0,40$ ,  $p=0,002$ ), aspartato aminotransferasa ( $r=0,34$ ,  $p=0,009$ ) y GT ( $r=0,33$ ,  $p=0,01$ ) en sujetos intolerantes a la glucosa pero no en sujetos no normotolerantes ( $r=-0,03$ ,  $p=0,7$ ,  $r=0,09$ ,  $p=0,3$ ,  $r=0,05$ ,  $p=0,6$ , respectivamente), indicando que la sCD36 puede servir como marcador de esteatohepatitis no alcohólica.

Se descubre que la CD36 en plasma está localizada en un complejo de elevado peso molecular que posiblemente es LDL o IDL, los niveles de CD36 en plasma en pacientes con DM2 son 5 veces los niveles hallados en sujetos de control delgados (sujetos sin DM2) y 1,5 veces los niveles hallados en sujetos de control sin DM2 obesos, y los niveles de CD36 en plasma en pacientes con DM2 no diabéticos obesos son 3 veces los niveles de CD36 de controles de obesos, compárese la tabla 1 y la tabla 2. Basándose en estos descubrimientos el inventor ahora presenta la hipótesis de que la CD36 circulante basada en la velocidad de degradación de tejidos de expresión de CD36 o de la propia CD36 puede proporcionar un diagnóstico alternativo sumamente valioso y/o un marcador de predicción de afecciones con expresión alterada de la CD36, por ejemplo en macrófagos, tal como la aterosclerosis y/o la formación de células espumosas; en el endotelio microvascular, tal como la microangiopatía; en plaquetas, tales como afecciones con aumento de activación de plaquetas causado por dislipemia; o combinadas, tales como aterotrombosis; en trastornos mieloproliferativos, compárese con Salah-Uddin, H., Mol Cell Biochem 2002:239:203-11 y Thibert, V., Br J Hematol 1995, 91:618-24. Por analogía con SR-BI en trastornos reproductivos. Además, los datos experimentales sugieren que la sCD36 además de ser predictiva del desarrollo y la presencia de estados patológicos tales como aterosclerosis también puede servir como un marcador de actividad para estos estados patológicos, es decir, cuanto más alta es la concentración de sCD36 más "activo" es el estado patológico. La monitorización de CD36 puede ser de un valor diagnóstico o predictivo como proteína señalizadora de adipocitos, o la degradación de la CD36 en adipocitos como una señal de adiposidad; como proteína señalizadora de células musculares esqueléticas o cardiomiocitos, o la degradación de la CD36 de estas células; como marcador de flujo de ácidos grasos libres entre fracciones de lipoproteína, tales como VLDL, LDL, y quilomicrones o entre fracciones de lipoproteína y tejidos diana tales como el músculo esquelético o cardíaco; o basada en la velocidad de degradación de tejidos de expresión de CD36 o de la propia CD36; o como un marcador para complicaciones que resultan de la malaria causada por *P. falciparum*, tales como oclusiones microvasculares.

Además se sugiere en este documento que la proteína CD36 circulante no unida a células o una fracción o un fragmento de la misma opcionalmente como parte de un complejo lipoproteico puede ser un diagnóstico útil o un marcador predictivo para la aterosclerosis y/o aterotrombosis en pacientes que padecen síndrome metabólico, por ejemplo caracterizados por hipertensión, resistencia a la insulina, diabetes tal como la DM2, y dislipemia, y posiblemente también en pacientes que padecen esteatohepatitis no alcohólica, tal como se caracteriza en la esteatosis hepática con leve afección hepática y resistencia a la insulina. Mostrando ambas afecciones resistencia a la insulina, mientras que el síndrome metabólico está asociado con un aumento del riesgo de aterosclerosis, y siendo ésta una diagnosis relativamente nueva también podría estar asociada con complicaciones tardías tales como la aterosclerosis y/o la aterotrombosis.

Aparentemente, aumentar el índice de masa corporal tiene el efecto de aumentar los niveles de CD36 circulante, y la

diabetes tiene un efecto final creciente adicional. Esto puede deberse a la obesidad que tiene como resultado una cierta resistencia a la insulina, niveles de insulina ligeramente elevados y niveles de glucosa normales. La diabetes añade un nivel de glucosa elevado, un aumento de la resistencia a la insulina e insulina.

5 Para los propósitos de la presente invención el término "CD36" utilizado en las frases, tal como "CD36 circulante", o "CD36 no unida a células", y en las reivindicaciones, incluye la proteína CD36 o un fragmento de la misma que es reconocida por un anticuerpo específico contra la CD36, tal como sc5522, sc9154 y sc7309. Esto incluye la proteína CD36 de longitud total, un polipéptido o un fragmento de péptido del mismo, así como tal proteína o fragmento(s) de la misma presentes en un complejo de fracción del plasma de elevado peso molecular que comprende lipoproteína del mismo, todos los cuales son preferentemente solubles (sCD36). Los términos CD36 circulante y CD36 soluble (sCD36) pueden utilizarse como sinónimos en este documento. La CD36 circulante puede ser secretada de caveolas o la cual es parte de una micropartícula que comprende porciones de membrana procedentes de una membrana de caveola que ha sido liberada de una membrana celular y está presente en la circulación sanguínea. Caveolas de interés en este sentido pueden estar presentes en la membrana celular de células, tales como adipocitos y trombocitos.

Bibliografía citada:

1. Daviet, L. y col. 1996. Platelets 7:117-124.
2. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. Blood 1992 80:1105 PubMed.
3. Krieger M, Herz J Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). Annu Rev Biochem 1994 63:601 PubMed.
4. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol Today 1993 14:131 PubMed.
5. Armesilla AL, Vega MA Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. J Biol Chem 1994 269:18985 PubMed.
6. Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. Science 1993 262:1436 PubMed.
7. Endermann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. J Biol Chem 1993 268:11811 PubMed.
8. Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS Membrane glycoprotein IV (CD36) es physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. Proc Natl Acad Sci U S A 1991 88:7844 PubMed.
9. Konig H, Pfisterer P, Corcoran LM, Wirth T Identification of CD36 as the first gene dependent on the B-cell differentiation factor Oct-2. Genes Dev 1995 9:1598 PubMed.
10. Tang Y, Taylor KT, Sobieski DA, Medved ES, Lipsky RH Identification of a human CD36 isoform produced by exon skipping. Conservation of exon organization and pre-mRNA splicing patterns with a CD36 gene family member, CLA-1. J Biol Chem 1994 269:6011 PubMed.
11. YamamotoN, Akamutsu N, Sakuraba H, Yamazaki H, Tanoue K Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. Blood 1994 83:392 PubMed.

## 55 EJEMPLOS

Análisis ELISA, reactivos utilizados y condiciones del ensayo

Tampón fosfato 0,1 mol/l, pH 8,0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 0,1 mol/l, pH 8,0, almacenado a 4°C.

Tampón POD

5

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 1,5 mmol/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O, 8,5 mmol/l

10 NaCl 400 mmol/l

pH 7,4

Almacenado a 4°C 20

15

Preparación de solución de lisozima:

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

20

POD-avidina Dako P364: reactivo de color

Sustrato de peroxidasa micropocillos de TMB (1 componente)

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

Ácido fosfórico, 1 mol/l

Solución POD avidina:

30

Tampón POD 12 ml

Solución de lisozima 120µl 30

35 POD-avidina 6µl

Para ser preparada inmediatamente antes de usar.

Anticuerpo

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

Aparato

Enjuagadora de placas de microtitulación automática Elx50 (Biotek Instruments).

45

Se enjuaga una placa de microtitulación 3 veces con 340 µl de tampón de enjuague por pocillo usando el programa 12. El último enjuague se termina sin aspiración de tampón de enjuague, que primero es decantado inmediatamente antes de la aplicación de estándares (lote de plasma EDTA) y muestras (con posibles controles), e inmediatamente antes de la adición de reactivo 5.

50

Estándares

55 Sangre EDTA procedente de 100 sujetos procedente de muestreo de sangre rutinario se centrifuga a 3000 G durante 10 min, la parte superior del plasma es extraída con pipeta y almacenada. El plasma almacenado se congela el partes alícuotas de 350 µl. (Controles en forma de preparaciones de membrana plaquetaria).

El coeficiente de variación intraensayo, que se estimó a partir de una serie de 76 determinaciones individuales de la misma muestra, fue el 10 %, y el estimado a partir de determinaciones dobles del control alto en 15 días diferentes fue el 6 %. El coeficiente de variación internensayo, estimado a partir de los controles en cada serie realizada, fue el

16,4 %. Las series sólo se aceptaron cuando los controles estuvieron dentro del intervalo de +/- 1,96 x SD (interensayo).

Procedimiento para ensayo Elisa

5

Se enjuaga una placa de microtitulación en el Elx50. Se aplican estándares, controles, muestras y tampón de dilución en filas dobles, 100 µl/pocillo. Se anotan las posiciones de las aplicaciones. La placa de microtitulación se cubre con película de plástico y se incuba durante 60 min en una mesa vibratoria.

10 La placa se enjuaga en el Elx50. Se añadieron 100 µl de sc-9154 biotinilado por pocillo, se cubre con una película de plástico y se incuba durante 60 min en una mesa vibratoria. La placa se enjuaga en el Elx50..

15 Se añaden 100 µl de solución POD-avidina por pocillo. Se cubre con película de plástico y se incuba durante aproximadamente 30 min en una mesa vibratoria. La placa se enjuaga en el Elx50. En una campana extractora se añaden 100 µl de TMB por pocillo. Se cubre con película de plástico, se incuba durante aproximadamente 10 min en una mesa vibratoria. La reacción se termina con 100 µl de ácido fosfórico por pocillo (en una campana extractora). Se cubre con película de plástico hasta la lectura.

Medición

20 Se leen las extinciones a 450 nm y 620 nm en un aparato Multiscan antes de 60 min después de la terminación de la reacción.

Cálculo

25 Spline cúbico con escala lineal en ambos ejes.

Tampón de dilución Elisa: tampón fosfato 10 mmol/l con 0,145 mol/l de NaCl, pH 7,4

30 **Estudio 1:** Comparación de niveles de CD36 en plasma en pacientes obesos con diabetes tipo 2, controles de no diabéticos y controles de no diabéticos delgados equiparados por peso.

35 El propósito del estudio 1 fue comparar los niveles de CD36 en plasma procedente de pacientes obesos con diabetes tipo 2 con controles de salud equiparados por edad y peso así como sujetos de control sanos delgados. Nuestra hipótesis inicial fue que la CD36 soluble estaría suprarregulada en la diabetes como consecuencia del aumento de los niveles de glucosa con el resultado de niveles de expresión elevados en macrófagos. Los sujetos del estudio fueron seleccionados cuidadosamente con el fin de equiparar por edad, sexo, y BMI en el caso de los controles de obesos y pacientes con DM2. Las características de la población de estudio se dan a continuación en las tablas 1 y 2.

40

TABLA 1. DM2 frente a controles de delgados y obesos

	Control de delgados	Control de obesos	DM2 obeso
Edad	50,8 ± 1,0	48,1 ± 1,5	49,9 ± 1,5
Sexo (F/M)	5/5	5/6	6/4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,2 ± 0,5	34,0 ± 1,4	33,5 ± 1,1
Fp-glucosa Mmol/l	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,2	10,0 ± 0,6
HbA1c %	5,5 ± 0,1	5,4 ± 0,1	7,5 ± 0,5

TABLA 2. Parámetros de lípidos en el estudio de DM2 frente a controles de delgados y obesos

	Control de delgados	Control de obesos	DM2 obeso
Colesterol mmol/l	5,3 ± 0,2	5,3 ± 0,4	5,4 ± 0,4
Colesterol HDL	1,85 ± 0,15	1,54 ± 0,15	1,36 ± 0,03
Colesterol LDL	2,9 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,3 ± 0,3
TG mmol/l	1,12 ± 0,16	1,34 ± 0,18	1,93 ± 0,4

45

Las muestras de sangre que han de usarse para la determinación de CD36 en plasma se obtuvieron en tubos de muestreo de sangre estabilizada con EDTA de 8 ml, y se centrifugaron a 3000 G a 4 °C con el fin de obtener plasma. El plasma fue congelado inmediatamente a -80 °C hasta el análisis. Las muestras de sangre se obtuvieron después de un ayuno nocturno (muestras basales), y de nuevo después de 3 horas de infusión de insulina a una velocidad de 5 40 mU/m<sup>2</sup>/min junto con la infusión de glucosa a las velocidades necesarias para mantener la euglucemia (5 mmol/l de glucosa). Se utilizó pinzamiento euglucémico para determinar la sensibilidad a la insulina expresada como la velocidad de eliminación de glucosa (mg/min/m<sup>2</sup>). Los resultados se dan en la fig. 9. Se analizaron muestras de plasma para el contenido de CD36 de la siguiente manera: las muestras fueron descongeladas sobre hielo. Se usó una placa de microtitulación de 96 pocillos. Como norma se aplicó plasma almacenado en las siguientes diluciones: 10 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128 en determinaciones dobles. Como fondo se aplicó un tampón de dilución de muestra PBA a 2-4 pocillos. Las muestras se aplicaron en determinaciones dobles diluidas 1:5. La "concentración" de CD36 se expresó en unidades arbitrarias – en relación con el plasma almacenado estándar. El primer experimento se usó para establecer la dilución óptima para cada muestra (es decir, con una absorción esperada dentro de la parte lineal de la curva estándar). Después, se analizaron todas las muestras basales en una placa 15 ELISA. Los resultados se muestran en la fig. 4. Se realizó un análisis estadístico mediante una prueba bilateral en T. La CD36 en plasma fue significativamente superior en obesos comparados con los controles y la CD36 en DM2 fue significativamente superior tanto a los controles de obesos como de delgados. No hubo diferencia por sexo. La CD36 en plasma covaría con la glucosa en plasma en ayunas, HbA1c y de la manera más consistente inversamente a la sensibilidad a la insulina expresada como velocidades de eliminación de glucosa o GINF, compárense la fig. 5, la fig. 20 6, la fig. 7 y la fig. 8, respectivamente. El análisis de covariación se expresó como coeficiente de Pearson. Las muestras estimuladas con insulina fueron analizadas por pares con las muestras basales correspondientes en determinaciones dobles, y los resultados se expresaron en relación con el plasma almacenado estándar. No se observó ningún efecto estadísticamente significativo de 4 horas de infusión de insulina en la CD36 en plasma.

25 **Estudio 2:** CD36 en plasma procedente de pacientes con DM 2 obesos, parientes jóvenes obesos de pacientes con DM2 y personas de control obesas. El propósito fue probar el hallazgo de CD36 elevada en pacientes con DM2 así como probar si las personas sanas con riesgo de desarrollar DM2 expresan algunos de los hallazgos de CD36 de personas con DM2 manifiesta. Las características de los grupos de estudio se muestran en la tabla 3 y 4 a continuación:

30

TABLA 3. Características de los participantes en el estudio 2

Personas de control	Parientes con DM2	DM2	
Edad (años)	55 ± 3	26 ± 4	52 ± 1
Sexo (f/m)	2/11	1/4	4/17
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31 ± 1	30 ± 2	31 ± 1
Fp-glucosa (mmol/l)	6,0 ± 0,1	6,1 ± 0,4	11,4 ± 0,7
HbA1c (%)		7,3 ± 0,3	

35

TABLA 4. Características de lípidos de los participantes en el estudio 2

DM2	Parientes		Controles
Colesterol (mM)	5,6 +/- 0,2	4,9 +/- 0,2*	6,1 +/- 0,2
HDL (mM)	1,1 +/- 0,1*	1,1 +/- 0,1	1,4 +/- 0,1
LDL (mM)	3,6 +/- 0,2*	2,8 +/- 0,3*	4,2 +/- 0,2
Tg (mM)	2,3 +/- 0,3*	2,4 +/- 0,7*	1,2 +/- 0,1
FFA (mM)	0,65 +/- 0,05*	0,45 +/- 0,06	0,40 +/- 0,03

Tabla 5. Datos antropométricos, y mediciones de laboratorio en sangre procedente de los participantes en el estudio del estudio 2.

	Sujetos de control	Parientes de primer grado de pacientes diabéticos de tipo 2	Pacientes diabéticos de tipo 2
Sexo (mujer/hombre)	2/11	9/13	4/17
Edad (años)	54,7 ± 2,7	30,6 ± 1,4 <sup>A</sup>	52,4 ± 1,3 <sup>C</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31,0 ± 1,2	30,4 ± 0,8	30,5 ± 0,9
Glucosa en plasma			11,4 ± 3,3

(mmol/l)*			
HbA1c (%)			7,3 ± 1,5
Glucosa en plasma (mmol/l)	6,0 ± 0,1	5,9 ± 0,1	5,8 ± 0,2
Insulina sérica (pmol/l)	49,6 ± 8,8	73,1 ± 6,8	161,8 ± 16,4 <sup>A,C</sup>
Ácidos grasos libres (mmol/l)	0,40 ± 0,03	0,46 ± 0,04	0,27 ± 0,04 <sup>B,C</sup>
Triglicérido (mmol/l)	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2 <sup>B</sup>	1,9 ± 0,2 <sup>A</sup>

Los valores son promedios ± SE. \*La glucosa en plasma en ayunas y el HbA1c se midieron un día antes del pinzamiento euglicémico-hiperinsulinémico en los sujetos diabéticos de tipo 2. Se midieron otras variables en el estado basal durante los estudios de pinzamiento. <sup>A</sup>  $P < 0,01$  y <sup>B</sup>  $P < 0,05$  frente a controles de obesos. <sup>C</sup>  $P < 0,01$  frente a parientes de primer grado.

Las muestras de control basal de pacientes con DM2 se obtuvieron 1-2 días antes del estudio. Los pacientes con DM2 fueron admitidos en el hospital la noche anterior, y la glucosa en plasma fue normalizada por la noche mediante insulina. Se midió la CD36 tal como se describe en el estudio 1 en muestras basales en ayunas. La CD36 se elevó significativamente en los pacientes con DM2 comparados con los parientes y los controles equiparados por peso, compárese con la fig. 10. La CD36 en plasma se correlacionó con la velocidad de infusión de glucosa durante un pinzamiento euglicémico-hiperinsulinémico de 3 horas realizado tal como se describe en el estudio 1, compárese con la fig. 11.

### 15 Estudio 3

Existe una evidencia creciente de que la inflamación sistémica y la resistencia a la insulina constituyen sucesos interrelacionados que contribuyen a la aterosclerosis. Hemos estudiado el efecto de la asociación entre los niveles de interleuquina-6 (IL-6) circulante, uno de los principales mediadores de la inflamación, y la resistencia a la insulina en la sCD36.

Nos propusimos estudiar esta relación en 147 hombres aparentemente sanos, 90 sujetos normotolerantes y 57 intolerantes a la glucosa.

Cuando todos los sujetos se consideraron en conjunto, la concentración de sCD36 circulante se asoció significativamente con la masa libre de grasa, la hemoglobina glicosilada, los triglicéridos en plasma, número de plaquetas, interleuquina-6 en plasma y con la efectividad de la glucosa ( $p$  entre 0,04 y 0,001). Sin embargo, la asociación con la masa libre de grasa, los triglicéridos, el número de plaquetas y la interleuquina-6 se observó principalmente en sujetos con intolerancia a la glucosa pero no en sujetos normotolerantes.

La sCD36 circulante se asoció negativamente con la glucosa en ayunas y positivamente con la efectividad de la glucosa en sujetos normotolerantes. En sujetos con intolerancia a la glucosa, la sCD36 se asoció positivamente con la glucosa en ayunas y negativamente con la sensibilidad a la insulina.

En un análisis de regresión lineal múltiple para predecir la sCD36 circulante, en todos los sujetos considerados en conjunto, la IL-6 ( $p=0,033$ ) y la masa libre de grasa ( $p=0,035$ ) contribuyeron independientemente al 5 % y el 5 %, respectivamente, de la varianza de sCD36, después de ajustar por edad, glucosa en ayunas, triglicéridos en plasma, recuento de plaquetas y sensibilidad a la insulina.

Entre los sujetos con intolerancia a la glucosa, la IL-6 ( $p=0,0035$ ) y la masa de grasa ( $p=0,025$ ) se asociaron independientemente con la concentración de sCD36 en plasma, contribuyendo al 12 % y el 9 %, respectivamente, de la varianza de sCD36 después de ajustar por las mismas variables.

Así, la IL-6 circulante se asoció independientemente con la sCD36 en todos los sujetos, principalmente en sujetos intolerantes a la glucosa. Este hallazgo, junto con la asociación positiva de la masa de grasa y la IL-6 ( $r=0,20$ ,  $p=0,03$ ), sugiere que la IL-6 derivada de la grasa podría conducir a resistencia a la insulina y un aumento de sCD36 concomitantemente, posiblemente como parte del proceso inflamatorio leve, que se cree que es un contribuyente muy importante al desarrollo de resistencia a la insulina y aterosclerosis.

La sCD36 circulante se asoció positivamente con la alanina transferasa sérica ( $r=0,40$ ,  $p=0,002$ ), la aspartato

aminotransferasa ( $r=0,34$ ,  $p=0,009$ ) y la GT ( $r=0,33$ ,  $p=0,01$ ) en sujetos intolerantes a la glucosa pero no en sujetos normotolerantes ( $r=-0,03$ ,  $p=0,7$ ,  $r=0,09$ ,  $p=0,3$ ,  $r=0,05$ ,  $p=0,6$ , respectivamente), indicando que la sCD36 podría servir como marcador de esteatohepatitis no alcohólica.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar la cantidad de proteína CD36 circulante o una fracción de la misma que está presente en una fracción de plasma de elevado peso molecular libre de células, utilizando un procedimiento inmunológico que comprende las etapas de:
- 5
- (i) proporcionar una muestra de plasma que ha de ser investigada,
  - (ii) degradar complejos de elevado peso molecular en dicha muestra de plasma,
  - 10 (iii) proporcionar un anticuerpo anti-CD36,
  - (iv) exponer la muestra que ha de ser investigada al anticuerpo, y
  - 15 (v) detectar y cuantificar la cantidad del anticuerpo que se une a CD36.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dichos complejos de elevado peso molecular son degradados por congelación y descongelación.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde dicha muestra es puesta en contacto con dicho anticuerpo unido a una fase sólida.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, donde la fase sólida es una placa de microtitulación.
- 25 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, donde dicha cantidad de CD36 circulante o fracción de la misma está presente en una fracción de lipoproteína seleccionada de una lipoproteína de baja densidad, una lipoproteína de densidad intermedia, y una lipoproteína de muy baja densidad.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, donde dicha cantidad de CD36 circulante  
30 o fracción de la misma está presente en micropartículas.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dicho anticuerpo anti-CD36 se selecciona del grupo constituido por anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de la CD36.



Curva de dilución de plasma ELISA de CD36

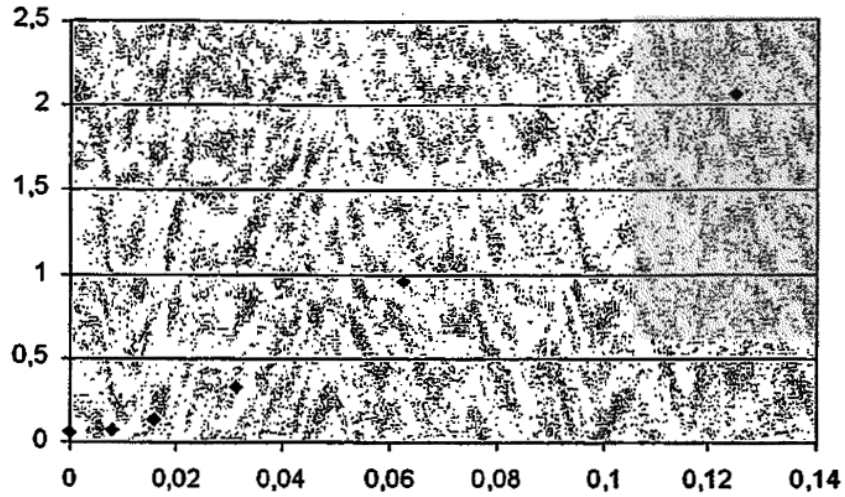


Fig. 1

CD36 y parámetros de lípidos en fracciones de FPLC de plasma

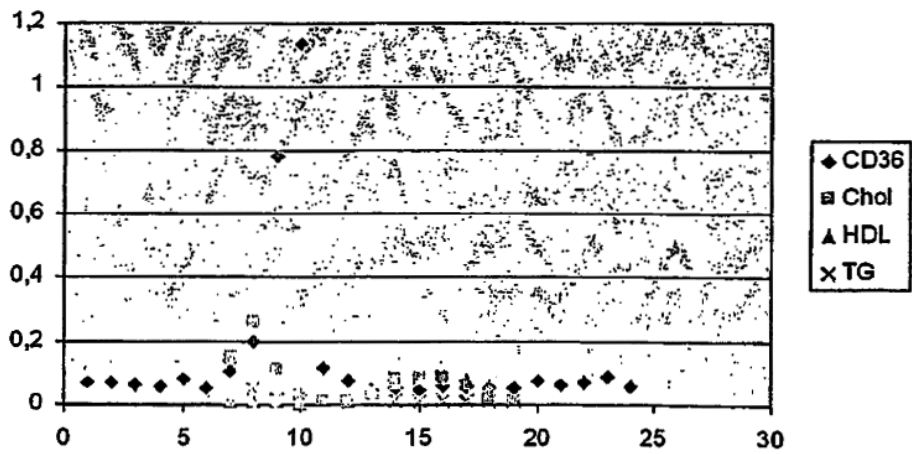


Fig. 2

CD36 en fracciones de FPLC de plasma humano

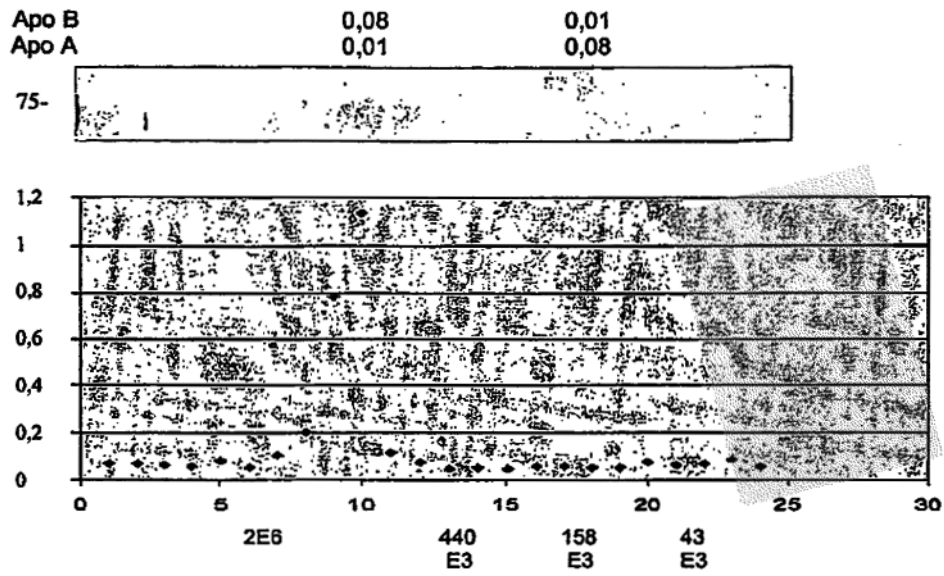


Fig. 3

## CD36 en plasma – basal

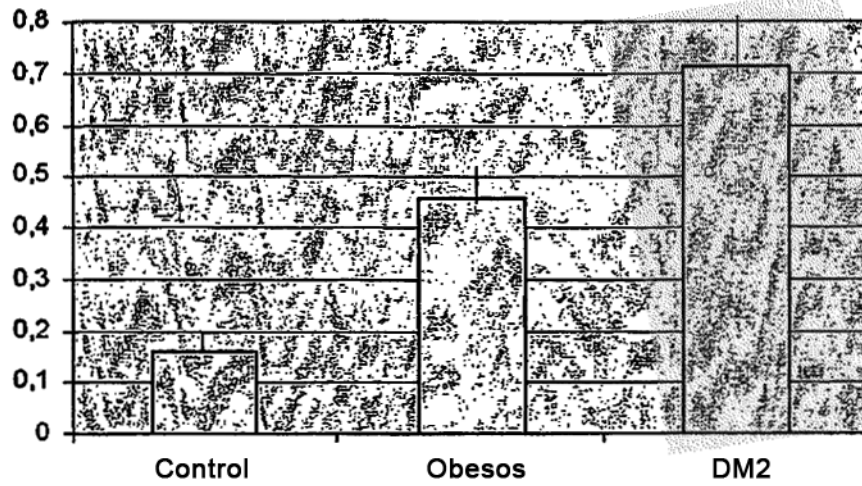


Fig. 4

## Fp-glucosa frente a CD36

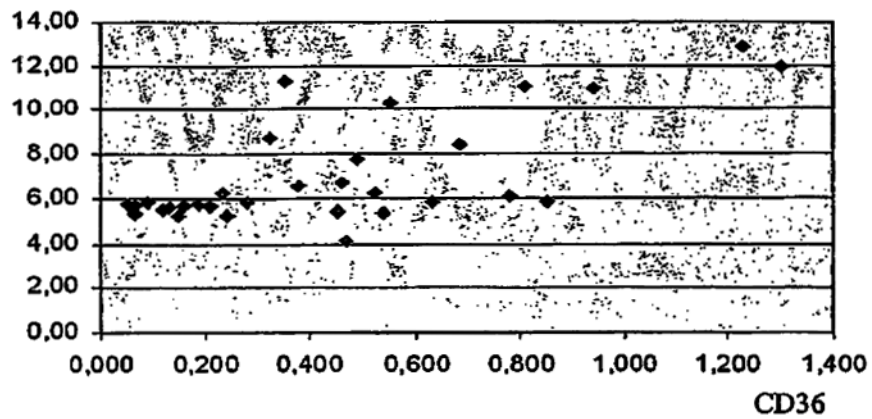


Fig. 5

Fp-glucosa frente a CD36

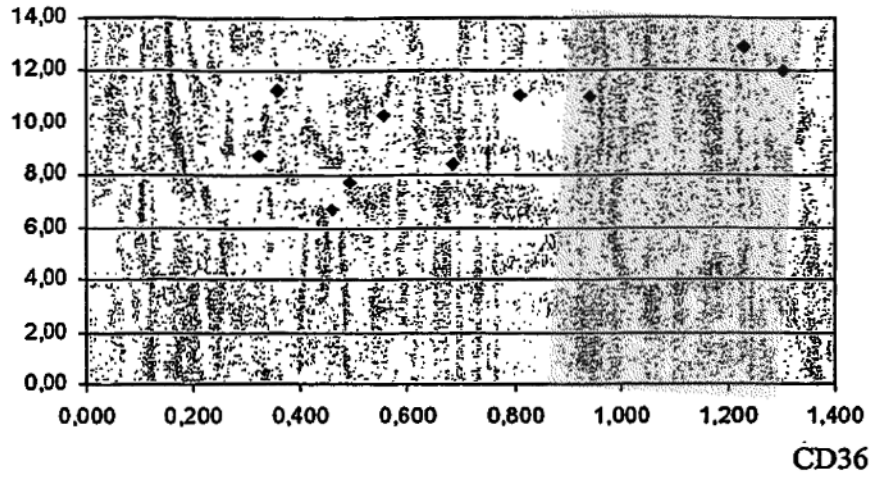


Fig. 6

CD36 frente a HbA1c en DM2

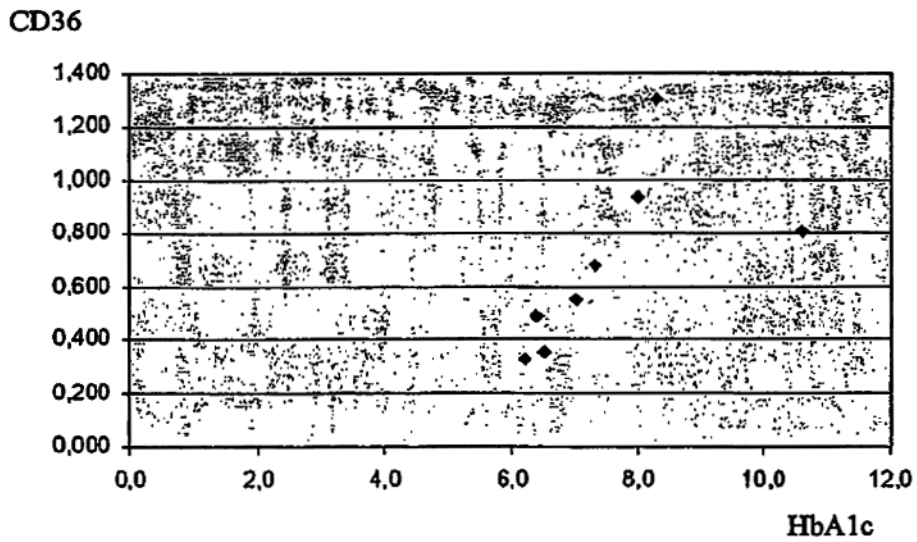


Fig. 7

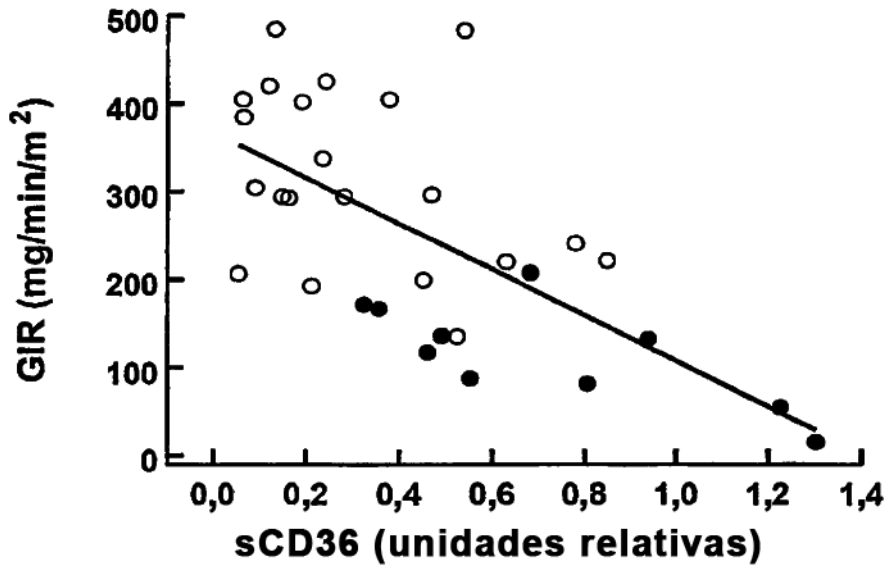


Fig. 8

Velocidades de infusión de glucosa durante pinzamiento euglicémico-hiperinsulinémico

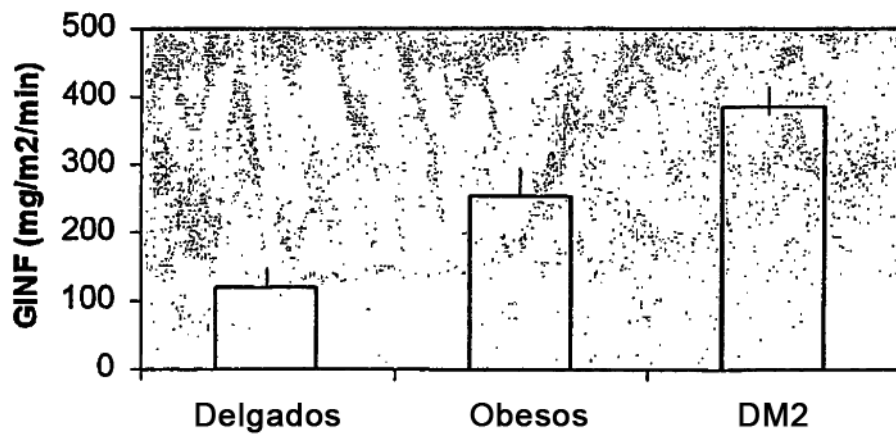


Fig. 9

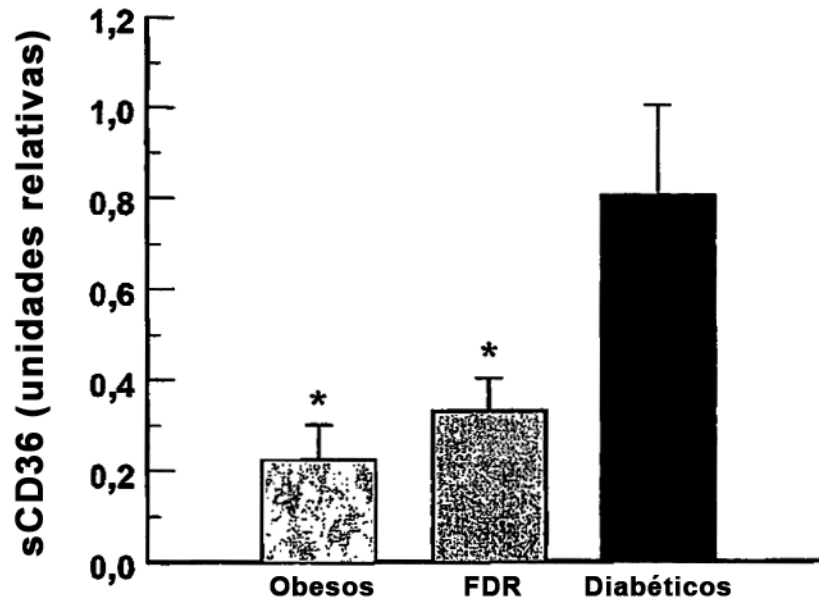


Fig. 10

### CD36 frente a GINF, datos combinados

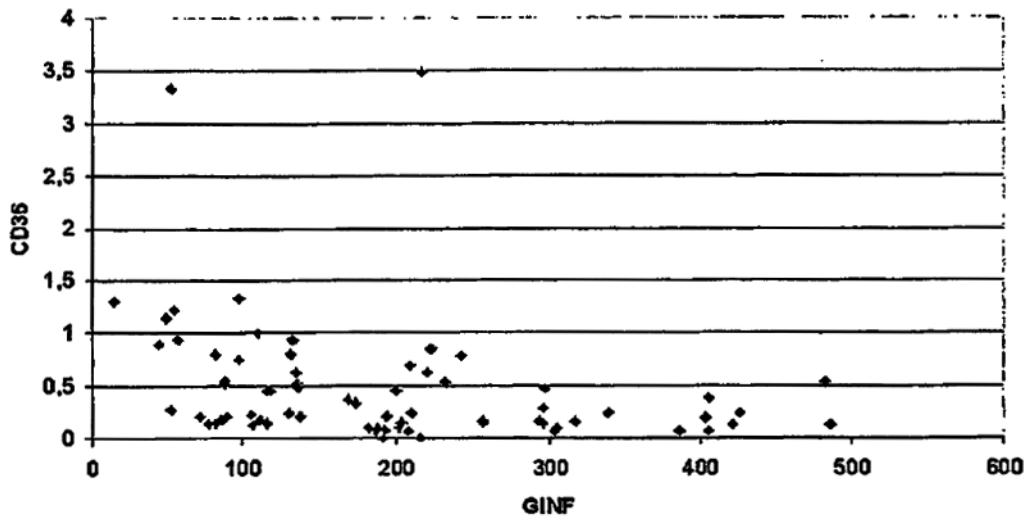


Fig. 11