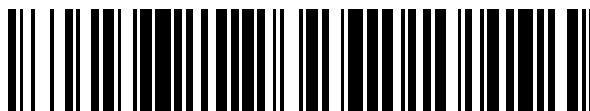


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 459**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09742310 .7**
96 Fecha de presentación: **10.04.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2274623**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2011**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR.**

30 Prioridad:
11.04.2008 FR 0852459

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2012

73 Titular/es:
**Assistance Publique Hôpitaux De Paris
3 Avenue Victoria
75001 Paris, FR;
Université Paris Descartes y
UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

72 Inventor/es:
**MOUTHON, Luc;
HUMBERT, Marc y
TAMBY, Mathieu**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 376 459 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 de diagnóstico de la hipertensión arterial pulmonar.

La presente invención se refiere al diagnóstico y al seguimiento de una hipertensión arterial pulmonar.

Estado de la técnica:

5 La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una patología rara responsable de la aparición de descompensación cardiaca derecha que puede dar lugar la muerte. La HAP se define por la puesta en evidencia por cateterismo derecho de una presión arterial pulmonar media superior o igual a 25 mm de Hg en reposo o a 30 mm de Hg con esfuerzo en ausencia de subida de la presión capilar pulmonar (Rubin, 1997). La aparición de una HAP es la consecuencia de una obstrucción crónica de las pequeñas arterias pulmonares secundaria a la proliferación de células endoteliales, de células musculares lisas vasculares y de fibroblastos (Dorfmüller et al, 2003). En particular, durante la HAP severa, se forma una capa de miofibroblastos y de matriz extracelular que se localiza entre el endotelio y el limitante elástico interno, denominada neointima, que es característica de esta afección.

10 La HAP puede aparecer en la evolución de patologías de componente autoinmune que son los conectivos, en particular, la esclerodermia sistémica (Hachulla et al, 2005), el síndrome de Sharp y el lupus eritematoso sistémico. Además, durante la HAP idiopática, se encuentra de vez en cuando otros estigmas de autoinmunidad, a saber anticuerpos antinucleares o anticuerpos antitiroglobulina.

15 Se relacionó la presencia de anticuerpos anticélulas endoteliales (Tamby et al, 2005) y de anticuerpos antifibroblastes (Tamby et al, 2006) durante la HAP idiopática o se asoció a la esclerodermia sistémica. Sin embargo no se estudió el valor predictivo de estos anticuerpos en la aparición de la HAP y la función potencial de los fenómenos autoinmunes en la patogenia de la HAP idiopática sigue siendo incierta (Mouthon et al, 2005).

20 En la mayoría de los casos, la HAP se detecta cuando el paciente presenta una disnea de fase III o IV. Cuando se sigue al paciente por una enfermedad crónica como la esclerodermia sistémica, la HAP se detecta por una ecografía cardiaca anual.

25 Sin embargo, un ensayo simple y fiable de detección de una HAP falta siempre, y sería preciosa para un diagnóstico lo más precoz posible, que permitiría establecer rápidamente estrategias terapéuticas para mejorar el estado del paciente y sus posibilidades de supervivencia.

Resumen de la invención:

30 La invención proporciona ahora un procedimiento *in vitro* de detección de una HAP, o de un riesgo de desarrollar una HAP, que incluye la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos anti-Tenascina C (TN-C) en una muestra biológica procedente de un paciente, siendo la presencia de anticuerpos anti-TN-C indicadora de una HAP o de un riesgo de desarrollar una HAP.

35 Preferentemente, la presencia de anticuerpos anti-Tenascina C en la muestra biológica se compara con un valor de control, la presencia de anticuerpos anti-Tenascina C en una cantidad superior al valor de control siendo indicadora de una HAP o de un riesgo de desarrollar una HAP.

Otro objeto de la invención es un procedimiento *in vitro* de pronóstico o de seguimiento de una HAP, que incluye la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos anti-TN-C en una muestra biológica procedente de un paciente, en distintos tiempos, siendo el aumento de la cantidad de anticuerpos anti-TN-C a lo largo del tiempo indicativo de una agravación de la HAP.

40 Otro objeto de la invención es un procedimiento *in vitro* de evaluación de la eficacia de un tratamiento hacia una HAP, que incluye la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos anti-TN-C en una muestra biológica procedente de un paciente, en distintos tiempos antes, a lo largo o después del tratamiento, siendo la disminución de la cantidad de anticuerpos anti-TN-C a lo largo del tiempo indicativo de una mejora de la HAP.

Descripción detallada de la invención:

45 La TN-C se expresa en el interior y alrededor de los vasos sanguíneos en el pulmón fetal (Rettig et al, 1994), pero no se expresa a continuación ya en las arterias pulmonares adultas normales (Jones et al, 1996). Por otra parte, la pérdida de señalización mediante BMPRII, en el origen de un defecto de células T reguladoras que pueden predisponer a la aparición de una HAP (Nicoles et al, 2005), puede también inducir la expresión de la TN-C *in vivo* y sobre células vasculares en cultivo (Ihida-Stansbury et al, 2006). Sobre esta base, los inventores emitieron la hipótesis que pacientes que tienen una HAP pueden desarrollar una respuesta inmune dirigida contra la TN-C. Por eso decidieron buscar anticuerpos anti-TN-C en el suero de pacientes afectados por la HAP.

50 Los inventores así pudieron poner de relieve una correlación entre la aparición de una HAP y la producción de anticuerpos anti-TN-C. Sobre esta base, proponen un procedimiento *in vitro* de diagnóstico o de pronóstico de una

HAP, o de un riesgo de desarrollar una HAP, que incluye la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos anti-TN-C en una muestra biológica procedente de un paciente. Los anticuerpos anti-TN-C detectados son preferentemente inmunoglobulinas G (IgG).

Definiciones

5 La Tenascina C (o TN-C) es una glicoproteína de la matriz extracelular. Se conoce también bajo el nombre de hexabraquion o citotactina. Se recoge una secuencia de la TN-C humana en anexo (SEQ ID n° 1).

10 El término "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra biológica procedente de un paciente. Ejemplos de muestras incluyen líquidos biológicos, biopsias de los tejidos orgánicos. De manera preferente, la muestra puede ser de sangre, de suero, de saliva, de orina o de esperma. De manera más preferente, la muestra biológica es una muestra de sangre o de suero.

15 El término "paciente" se refiere a cualquier sujeto susceptible de ser ensayado. Preferentemente se trata de un humano, pero el término incluye a cualquier otro mamífero, tal como perros, gatos, roedores, ganado, caballos, monos, etc. El paciente puede ser ensayado cualquiera que sea su sexo o su edad. El paciente puede ser un sujeto de riesgo, ser asintomático o presentar signos precoces o avanzadas de una HAP. Por ejemplo, el paciente puede ser un sujeto predispuesto a desarrollar una HAP, en particular un sujeto que lleva uno o varios cambios en el gene codificador para BMPRII.

El término "diagnóstico" significa la identificación de la patología o la evaluación del estado de severidad de la patología.

El término "pronóstico" significa la evaluación del riesgo de agravación, y de sus consecuencias.

20 El término "valor de control" se refiere a un valor basal que corresponde a la media de los valores obtenidos con la muestra biológica de sujetos sanos, no afectados por una HAP o una enfermedad susceptible de implicar una HAP. Puede tratarse de un valor estadístico de referencia.

25 Para evaluar la evolución de la patología, puede ser útil ensayar a un paciente y controlar el efecto de un tratamiento o la evolución de la patología, ensayando de nuevo al paciente, por ejemplo de varios meses de intervalo. En este caso, los resultados del segundo ensayo se comparan con los resultados del primer ensayo, así como a menudo al valor denominado "control".

Una cantidad de anticuerpos anti-TN-C "superior al valor de control" significa generalmente un aumento estadísticamente significativo, por ejemplo de al menos dos desviaciones estándares por encima de la media de las densidades ópticas de las reactividades IgG del conjunto de los sujetos sanos.

30 Por "antígeno de captura", se entiende un antígeno, preferentemente fijado sobre una fase sólida, que es capaz de retener el anticuerpos anti-TN-C presente en una muestra biológica, por enlace afin. El antígeno de captura se puede marcar.

35 El término "marcado" se refiere tanto a un marcado directo (por medio de enzimas, radioisótopos, fluorocromos, compuestos luminiscentes, etc...) como a un marcado indirecto (por ejemplo, por medio de anticuerpos ellos mismos marcados de manera directa o con la ayuda de reactivos de un "par de afinidad" marcado, tal cual, pero no exclusivamente, el par avidina marcada-biotina, etc...).

Dosificación de los anticuerpos:

La muestra biológica es preferentemente una muestra de suero, diluida a 1/100, o más, por ejemplo a 1/200 o a 1/400.

40 De manera ventajosa, la cantidad de anticuerpos anti-TN-C puede venir determinada por un inmunoensayo.

La muestra biológica se puede tratar eventualmente en una etapa previa, o se pone directamente en presencia de al menos un antígeno de captura.

45 El procedimiento según la invención se puede realizar según distintos formatos bien conocidos por el experto en la técnica: en fase sólida o en fase homogénea; en un tiempo o en dos tiempos; en método competitivo, como ejemplos no limitativos.

50 Según un modo de realización preferido, el antígeno de captura se inmoviliza sobre una fase sólida. Se puede utilizar, como ejemplos no limitativos de fase sólida, microplacas, en particular, microplacas de poliestireno, tales como las comercializadas por la sociedad Nunc, Dinamarca. Se pueden también utilizar partículas o bolas sólidas, bolas paramagnéticas, tales como las proporcionadas por Dynal o Merck-Eurolab (Francia) (bajo la marca EstaporTM), o también tubos de ensayo de poliestireno o polipropileno, etc.

Un formato de inmunoensayo de detección de los anticuerpos por competición es también posible. Otras modalidades de inmunoensayo son también posibles y bien conocidas por el experto en la técnica.

Dosificaciones ELISA, radioinmunoensayos, o cualquier otra técnica de detección se pueden emplear para revelar la presencia de los complejos antígenos-anticuerpos formados.

- 5 Según un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención incluye la puesta en contacto de una muestra biológica con una proteína que incluye el fragmento de aminoácidos 181 a 290 de la secuencia TN-C humana tal como se representa en SEQ ID N: 1.

10 En un ejemplo particular, el antígeno de captura, que puede ser una proteína que incluye el fragmento de aminoácidos 181 a 290 de la secuencia TN-C humana, se puede acoplar a un glutatión S transferasa (GST), antes de ser depositado sobre una microplaca.

Se ponen a incubar algunas muestras de suero que se deben probar, previamente diluidos a 1/100, sobre la microplaca. Después del lavado, se añaden algunos anticuerpos anti F α humano marcados (por ejemplo con una fosfatasa alcalina), siendo los complejos revelados (por ejemplo por adición de un sustrato de la fosfatasa cuya incisión se puede detectar por lectura de la absorbancia).

- 15 *Pacientes contemplados:*

Los pacientes contemplados son los susceptibles de desarrollar una HAP.

Se puede tratar de un paciente que sufre un conectivo, tal como una esclerodermia sistémica, de un síndrome de Sharp (que es un conectivo mixto), de un lupus eritematoso sistémico.

El paciente puede también sufrir una HAP idiopática o familiar.

- 20 Más generalmente, cualquier paciente afectado por una enfermedad vascular pulmonar puede ser sometido ventajosamente al procedimiento de detección de una HAP tal como se define en la invención.

25 Por otra parte, la HAP detectada puede ser también una hipertensión porto-pulmonar (es decir, una HAP asociada a una hipertensión portal), o puede estar asociada a una cardiopatía congénita, o a una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o también puede ser una hipertensión pulmonar post embólica, que complica la evolución de una bronquitis crónica obstructiva o de una cardiopatía cianógena.

Otros pacientes contemplados son los expuestos a algunos medicamentos supresores del apetito tal como la fenfluramina cuya prescripción puede contribuir a la aparición de una HAP.

- 30 Otras personas susceptibles de beneficiarse de este tipo de ensayo son las portadoras de una mutación en el gen codificador para BMPRII y que eventualmente no presentan HAP detectable con la ecografía, de tal modo que detecten a los individuos susceptibles de desarrollar posteriormente una HAP.

Evaluación de la eficacia de un tratamiento

35 Otro objeto de la invención es un procedimiento *in vitro* de evaluación de la eficacia de un tratamiento hacia una HAP, que incluye la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos anti-TN-C en una muestra biológica procedente de un paciente, en distintos tiempos antes, a lo largo o después del tratamiento, siendo la disminución de la cantidad de anticuerpos anti-TN-C a lo largo del tiempo indicativo de una mejora de la HAP.

40 El tratamiento clásico actual de la HAP asocia un tratamiento sintomático y un tratamiento vasodilatador. El tratamiento sintomático asocia anticoagulantes, una oxigenoterapia y diuréticos. El tratamiento vasodilatador se basa en las siguientes moléculas: bloqueadores de canales calcio, epoprostenol (prostaciclina) prescrito por vía intravenosa en perfusión continua, los inhibidores de los receptores de la endotelina, selectivos o no, en particular el bosentan, el sitaxentan y el ambrisentan, los inhibidores de las fosfodiesterasas de tipo 5 en particular el sildenafil, siendo el conjunto de estos medicamentos administrados por vía oral, el iloprost inhalado, similar a la prostaciclina administrado por vía inhalada. Estos tratamientos se pueden combinar eventualmente. En caso de fracaso de estas terapias, se puede proponer un trasplante pulmonar o de corazón-pulmón.

Las figuras y ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar el alcance.

- 45 **Leyenda de las figuras:**

50 La figura 1 es un gráfico que muestra la detección de los anticuerpos anti-TN-C por dosificación ELISA. Los IgG serosos de los pacientes afectados por HAP idiopática, de los pacientes afectados por esclerodermia sistémica y los sujetos sanos apareados por sexo y edad, se ensayaron frente a un fragmento de TN-C que recombinante, a una dilución de 1/100. Los límites inferiores y superiores de la zona en punteado representan los umbrales definidos por dos y tres veces la desviación tipo por encima de la media de las densidades ópticas obtenidas en los sujetos sanos.

Se estiman las diferencias significativas entre los grupos de enfermos y los sujetos sanos con la ayuda de un ensayo de rango de Mann Whitney y se indican como:

*: $p < 0,01$

** : $p < 0,001$.

- 5 La figura 2 representa curvas de supervivencia según Kaplan y Meier en función de la presencia o la ausencia de anticuerpos anti-TN-C. En abscisa, el tiempo en meses; en ordenada, la supervivencia acumulada en porcentaje.

Ejemplo: Detección de anticuerpos anti-Tenascina C en pacientes afectados de hipertensión arterial pulmonar.

Materiales y procedimientos:

10 *Pacientes*

La HAP fue detectada por la puesta en evidencia por ecografía cardíaca trans-torácica de una presión arterial pulmonar sistólica superior a 40 mm de Hg. En todos los casos, la HAP fue confirmada por la realización de un cateterismo derecho y la puesta en evidencia de una presión arterial pulmonar media superior o igual a 25 mm de Hg en reposo y a 30 mm de Hg en esfuerzo. Por convenio, se calificaba la HAP de idiopática si el paciente no mostraba ninguna patología asociada, pudiendo la HAP entonces corresponder a una HAP esporádico, familiar o asociada a una exposición a la fenfluramina. Se incluyeron 91 pacientes en el estudio que comprendía a 66 (72,5%) pacientes que tenían una HAP idiopática (IHAPI) y 25 pacientes que tenían una esclerodermia sistémica que respondía a los criterios del American College of Rheumatology (ACR) y/o a los criterios de LeRoy y Medsger (Masi et al, 1980; LeRoy et al, 2001).

- 15
20 Todos los pacientes que tenían una esclerodermia sistémica difusa sin HAP tenían un ataque intersticial pulmonar puesto en evidencia por un escáner torácico de alta resolución y una capacidad vital inferior al 80% del valor predicho y/o un coeficiente de transferencia del monóxido de carbono (KCO) inferior a 75% del valor predicho. Ninguno de los pacientes que no recibió corticoides o inmunosupresores en el momento de las extracciones, ningún de ellos tenían tumor sólido u otro conectivo asociado. Se utilizaron 46 sujetos sanos apareados por sexo y edad como controles.

25 *Dosificación ELISA*

La Tenascina C (TN-C) se obtuvo ante la sociedad Abnova (Abnova Corporation, Taipei City, Taiwán). El antígeno utilizado fue constituido del fragmento 181 a 290 de la TN-C (SEQ ID n° 1), acoplado a un resto GST. Se diluyó la TN-C en un tampón de bicarbonato y se depositó sobre placas 96 pocillos (Maxisorb, NalgeNunc Int. Rochester, NY, EE.UU.) a una concentración final de 4 $\mu\text{g/mL}$ a 4°C. Los sueros de pacientes y sujetos sanos se diluyeron a 1/100 en un tampón fosfato (PBS) a 1% de albúmina y se incubaron durante una hora a 37°C. Después de un lavado, de los anticuerpos de conejo antiFcy humano conjugados con fosfatasa alcalina (Dakocytomation, Golstrup, Dinamarca), se han añadido y se han incubado durante una hora a temperatura ambiente. Las reactividades fueron reveladas por adición de p-nitrofenilfosfato a 0,05 M en un tampón de carbonato de magnesio (pH 9,8) y se determinó la absorbencia a 405 nm utilizando un lector de placas ELISA (Fusión, Packard BioScience, Meriden, CT, EE.UU.). Con el fin de tener en cuenta la variabilidad entre los pocillos, la densidad óptica de un suero de referencia se definía arbitrariamente como un 100% de la actividad anti-TN C. los resultados de las muestras ensayadas se calculó a partir de la media de la absorbencia de pocillos duplicados y expresada como un porcentaje de este valor de referencia. Se ensayaron todas las muestras por duplicado.

40 *Análisis estadísticos*

Se efectuaron todos los análisis estadísticos utilizando el programa informático Systat (versión 11.0 Systat Software Inc, Point Richmond, CA, EE.UU.). Se utilizó un ensayo de Mann-Whitney para comparar las densidades ópticas relativas de los distintos grupos. Se consideran algunos valores de P inferiores a 0,05 como estadísticamente significativos. La supervivencia fue calculada por el método de Kaplan y Meier (Kaplan and Meier, 1958).

45 *Resultados:*

Las reactividades de los IgG de los pacientes afectados por HAP idiopática, de los pacientes afectados por esclerodermia sistémica con o sin HAP y de los sujetos controles frente a la TN-C se han estudiado por ELISA. Al utilizar un umbral definido por dos desviaciones estándares por encima de la media de las densidades ópticas de las reactividades IgG del conjunto de los sujetos sanos, 36/66 (54,5%) pacientes que tienen una HAP idiopática y 2/25 (8%) de los pacientes esclerodérmicos tenían IgG anti-TN-C. Ningún de los sujetos sanos tenía IgG anti-TN-C (Figura 1). Cuando el umbral se desplazaba a tres desviaciones estándares por encima de la media de las reactividades IgG de los individuos sanos, 12/66 (18,1%) de los pacientes que tenían una HAP idiopática tenía IgG anti TN C y ningún paciente esclerodérmico tenía IgG anti TN C. Las reactividades del IgG séricas de los anticuerpos anti TN C de pacientes que tenían una HAP idiopática eran significativamente más elevadas que las de

los pacientes esclerodérmicos ($p < 0,001$), y que las de los sujetos sanos ($p < 0,001$). De la misma forma, las reactividades de los IgG séricas de los anticuerpos anti TN C de pacientes esclerodérmicos eran significativamente más elevadas que las de los individuos sanos ($p = 0,021$) (Figura 1).

5 No se puso en evidencia una diferencia significativa en la presentación clínica y los datos de la ecografía cardíaca, el cateterismo derecho y el ensayo de marcha de 6 minutos entre los dos grupos de pacientes. La supervivencia disminuyó en el grupo de los enfermos que tenían anticuerpos anti TN C comparativamente con los enfermos que no tenían anticuerpos anti TN C sin que por ello esta diferencia no sea significativa aquí ($p = 0,17$).

10 La aparición de una respuesta inmune dirigida contra la TN C podría resultar de los mismos mecanismos que la que conduce a la inducción de la expresión de la TN C y a la proliferación de las células musculares lisas. La presencia de anticuerpos anti TN C se correlacionaría por lo tanto con la aparición de un remodelado vascular, que constituye un marcador de la aparición de una HAP.

Referencias bibliográficas

- Dorfnuller et al, 2003, Eur Respir J, 22 (2): 358-63
- Hachulla et al, 2005, Arthritis Rheum 52 (12): 3792-3800
- 15 - Ihida-Stansbury et al, 2006, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291 (4): L694-702
- Jones et al, 1996, Circ Res 79 (6): 1131-42
- Kaplan and Meier, 1958, J Am Stat Assoc 53: 457-81
- LeRoy et al, 2001, J Rheumatol 28 (7): 1573-76
- Masi et al, 1980, Arthr Rheum 23: 581-90
- 20 - Mouthon et al, 2005, Eur Respir J 26 (6): 986-8
- Nicolls et al, 2005, Eur Respir J 26 (6) 1110-8
- Rettig et al, 1994, J Cell Sci; 107 (Pt 2): 487-97
- Rubin, 1997, N Engl J Med, 336 (2): 111-7
- Tamby et al, 2005, Thorax 60 (9): 765-72
- 25 - Tamby et al, 2006, Eur Respir J 28 (4): 799-807

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Asistencia pública Hospitales de Paris
- 5 <120> Procedimiento de diagnóstico de una hipertensión arterial pulmonar
- <130> B0700
- <160> 1
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 2201
- <212> PRT
- 15 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (181)... (290)
- 20 <223> fragmento antigénico
- <400> 1

```

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu
 1           5           10           15

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys
          20           25           30

Arg Gln Ser Gly Val Asn Ala Thr Leu Pro Glu Glu Asn Gln Pro Val
          35           40           45

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys
 50           55           60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro
65           70           75           80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn
          85           90           95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly
          100          105          110

Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu
          115          120          125

Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala
130           135           140
    
```

ES 2 376 459 T3

Gly Cys Cys Leu Gln Pro Ala Thr Gly Arg Leu Asp Thr Arg Pro Phe
 145 150 155 160

Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys
 165 170 175

Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly
 180 185 190

Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp
 195 200 205

Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp
 210 215 220

Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu
 225 230 235 240

Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys
 245 250 255

Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp
 260 265 270

Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys
 275 280 285

Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly
 290 295 300

Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe
 325 330 335

Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr
 340 345 350

Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala
 355 360 365

Gly Leu Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg
 370 375 380

Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly

ES 2 376 459 T3

Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val Tyr
 645 650 655
 Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro Gly
 660 665 670
 Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu Tyr
 675 680 685
 Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro Val
 690 695 700
 Ser Ala Arg Val Ala Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe
 705 710 715 720
 Lys Ser Ile Lys Glu Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp
 725 730 735
 Ile Ala Phe Glu Thr Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu
 740 745 750
 Asp Glu Gly Glu Ile Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr
 755 760 765
 Arg Gln Thr Gly Leu Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His
 770 775 780
 Ile Val Lys Asn Asn Thr Arg Gly Pro Gly Leu Lys Arg Val Thr Thr
 785 790 795 800
 Thr Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp
 805 810 815
 Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly
 820 825 830
 Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr
 835 840 845
 Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys
 850 855 860
 Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met
 865 870 875 880

ES 2 376 459 T3

Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Leu Asp Ala Pro
885 890 895

Arg Asn Leu Arg Arg Val Ser Gln Thr Asp Asn Ser Ile Thr Leu Glu
900 905 910

Trp Arg Asn Gly Lys Ala Ala Ile Asp Ser Tyr Arg Ile Lys Tyr Ala
915 920 925

Pro Ile Ser Gly Gly Asp His Ala Glu Val Asp Val Pro Lys Ser Gln
930 935 940

Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly Leu Arg Pro Gly Thr Glu
945 950 955 960

Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu Asp Lys Glu Ser Asn Pro
965 970 975

Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln
980 985 990

Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro
995 1000 1005

Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu Asn Tyr Ser Leu Pro Thr
1010 1015 1020

Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asn Thr Thr Ser Tyr
1025 1030 1035

Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu
1040 1045 1050

Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys
1055 1060 1065

Ala Ser Thr Glu Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr
1070 1075 1080

Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp
1085 1090 1095

Gln Ala Tyr Glu His Phe Ile Ile Gln Val Gln Glu Ala Asn Lys
1100 1105 1110

ES 2 376 459 T3

Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala
 1115 1120 1125

Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser
 1130 1135 1140

Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg Thr Pro Val Leu Ser Ala
 1145 1150 1155

Glu Ala Ser Thr Gly Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val
 1160 1165 1170

Ala Glu Val Gly Trp Asp Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro
 1175 1180 1185

Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp
 1190 1195 1200

Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg
 1205 1210 1215

Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr His Tyr Thr Ile
 1220 1225 1230

Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser Thr Thr Pro Leu Ser
 1235 1240 1245

Val Glu Val Leu Thr Glu Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr
 1250 1255 1260

Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr
 1265 1270 1275

Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala
 1280 1285 1290

Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu
 1295 1300 1305

Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr
 1310 1315 1320

Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu
 1325 1330 1335

Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu

ES 2 376 459 T3

1340		1345		1350
Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr	1355	1360		1365
Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu	1370	1375		1380
Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser	1385	1390		1395
Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr	1400	1405		1410
Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val	1415	1420		1425
Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn	1430	1435		1440
Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp	1445	1450		1455
Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe Thr Ile Glu Ile Ile	1460	1465		1470
Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr Asn Ile Ser Gly	1475	1480		1485
Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Thr Asp	1490	1495		1500
Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg Thr Lys	1505	1510		1515
Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu	1520	1525		1530
Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser	1535	1540		1545
Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val	1550	1555		1560
Val Asp Ser Gly Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser	1565	1570		1575

ES 2 376 459 T3

Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile
 1580 1585 1590

Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln Thr
 1595 1600 1605

Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val
 1610 1615 1620

Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp Gly Phe Arg Leu
 1625 1630 1635

Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe Val Leu Lys
 1640 1645 1650

Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile Thr Leu
 1655 1660 1665

Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Leu Thr Gly Leu Arg Glu Ala
 1670 1675 1680

Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg
 1685 1690 1695

Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met Gly Ser Pro
 1700 1705 1710

Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala Thr Val
 1715 1720 1725

Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile Thr
 1730 1735 1740

Tyr Val Pro Ile Thr Gly Gly Thr Pro Ser Met Val Thr Val Asp
 1745 1750 1755

Gly Thr Lys Thr Gln Thr Arg Leu Val Lys Leu Ile Pro Gly Val
 1760 1765 1770

Glu Tyr Leu Val Ser Ile Ile Ala Met Lys Gly Phe Glu Glu Ser
 1775 1780 1785

Glu Pro Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu Asp Gly Pro Ser
 1790 1795 1800

ES 2 376 459 T3

Gly Leu Val Thr Ala Asn Ile Thr Asp Ser Glu Ala Leu Ala Arg
 1805 1810 1815

Trp Gln Pro Ala Ile Ala Thr Val Asp Ser Tyr Val Ile Ser Tyr
 1820 1825 1830

Thr Gly Glu Lys Val Pro Glu Ile Thr Arg Thr Val Ser Gly Asn
 1835 1840 1845

Thr Val Glu Tyr Ala Leu Thr Asp Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr
 1850 1855 1860

Thr Leu Arg Ile Phe Ala Glu Lys Gly Pro Gln Lys Ser Ser Thr
 1865 1870 1875

Ile Thr Ala Lys Phe Thr Thr Asp Leu Asp Ser Pro Arg Asp Leu
 1880 1885 1890

Thr Ala Thr Glu Val Gln Ser Glu Thr Ala Leu Leu Thr Trp Arg
 1895 1900 1905

Pro Pro Arg Ala Ser Val Thr Gly Tyr Leu Leu Val Tyr Glu Ser
 1910 1915 1920

Val Asp Gly Thr Val Lys Glu Val Ile Val Gly Pro Asp Thr Thr
 1925 1930 1935

Ser Tyr Ser Leu Ala Asp Leu Ser Pro Ser Thr His Tyr Thr Ala
 1940 1945 1950

Lys Ile Gln Ala Leu Asn Gly Pro Leu Arg Ser Asn Met Ile Gln
 1955 1960 1965

Thr Ile Phe Thr Thr Ile Gly Leu Leu Tyr Pro Phe Pro Lys Asp
 1970 1975 1980

Cys Ser Gln Ala Met Leu Asn Gly Asp Thr Thr Ser Gly Leu Tyr
 1985 1990 1995

Thr Ile Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Ala Gln Ala Leu Glu Val Phe
 2000 2005 2010

Cys Asp Met Thr Ser Asp Gly Gly Gly Trp Ile Val Phe Leu Arg
 2015 2020 2025

ES 2 376 459 T3

Arg Lys Asn Gly Arg Glu Asn Phe Tyr Gln Asn Trp Lys Ala Tyr
 2030 2035 2040

Ala Ala Gly Phe Gly Asp Arg Arg Glu Glu Phe Trp Leu Gly Leu
 2045 2050 2055

Asp Asn Leu Asn Lys Ile Thr Ala Gln Gly Gln Tyr Glu Leu Arg
 2060 2065 2070

Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe Ala Val Tyr Asp
 2075 2080 2085

Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Val
 2090 2095 2100

Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr His Asn
 2105 2110 2115

Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala Ile
 2120 2125 2130

Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn
 2135 2140 2145

Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His
 2150 2155 2160

Ser Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser
 2165 2170 2175

Ile Gln Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn
 2180 2185 2190

Leu Glu Gly Arg Arg Lys Arg Ala
 2195 2200

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento *in vitro* de detección de una hipertensión arterial pulmonar (HAP), o de un riesgo de desarrollar una HAP, que incluye la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos anti-Tenascina C en una muestra biológica procedente de un paciente, siendo la presencia de anticuerpos anti-Tenascina C indicadora de una HAP o de un riesgo de desarrollar una HAP.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la muestra biológica es una muestra de sangre o de suero.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el cual la presencia de anticuerpos anti-Tenascina C en la muestra biológica se compara con un valor de control, siendo la presencia de anticuerpos anti-Tenascina C en una cantidad superior al valor de control indicadora de una HAP o de un riesgo de desarrollar una HAP.
- 10 4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la cantidad de anticuerpos anti-Tenascina C viene determinada por un inmunoensayo.
- 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, en el cual el inmunoensayo es una dosificación ELISA.
- 15 6.- Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, que incluye la puesta en contacto de una muestra biológica con una proteína que incluye el fragmento de aminoácidos 181 a 290 de la secuencia Tenascina C humana tal como se representa en SEQ ID N: 1.
- 7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el paciente es un humano.
- 8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el paciente sufre de una esclerodermia sistémica.
- 20 9.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el paciente sufre de un síndrome de Sharp.
- 10.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el paciente sufre de un lupus eritematoso sistémico.
- 11.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el paciente sufre de una HAP idiopática.
- 25 12.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la HAP se asocia a una hipertensión portal, a una cardiopatía congénita o a una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o es una hipertensión pulmonar post embólica.
- 30 13.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el paciente es un sujeto predispuesto a desarrollar una HAP, siendo dicho sujeto preferentemente portador de una o varias mutación(ones) en el gen codificador para BMPRII.
- 14.- Procedimiento *in vitro* de pronóstico o seguimiento de una HAP, que incluye la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos anti-Tenascina C en una muestra biológica procedente de un paciente, en distintos tiempos, siendo el aumento de la cantidad de anticuerpos anti-Tenascina C a lo largo del tiempo indicativa de una agravación de la HAP.
- 35 15.- Procedimiento *in vitro* de evaluación de la eficacia de un tratamiento para una HAP, que incluye la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos anti-Tenascina C en una muestra biológica procedente de un paciente, en distintos tiempos antes, a lo largo o después del tratamiento, siendo la disminución de la cantidad de anticuerpos anti-Tenascina C a lo largo del tiempo indicativa de una mejora de la HAP.

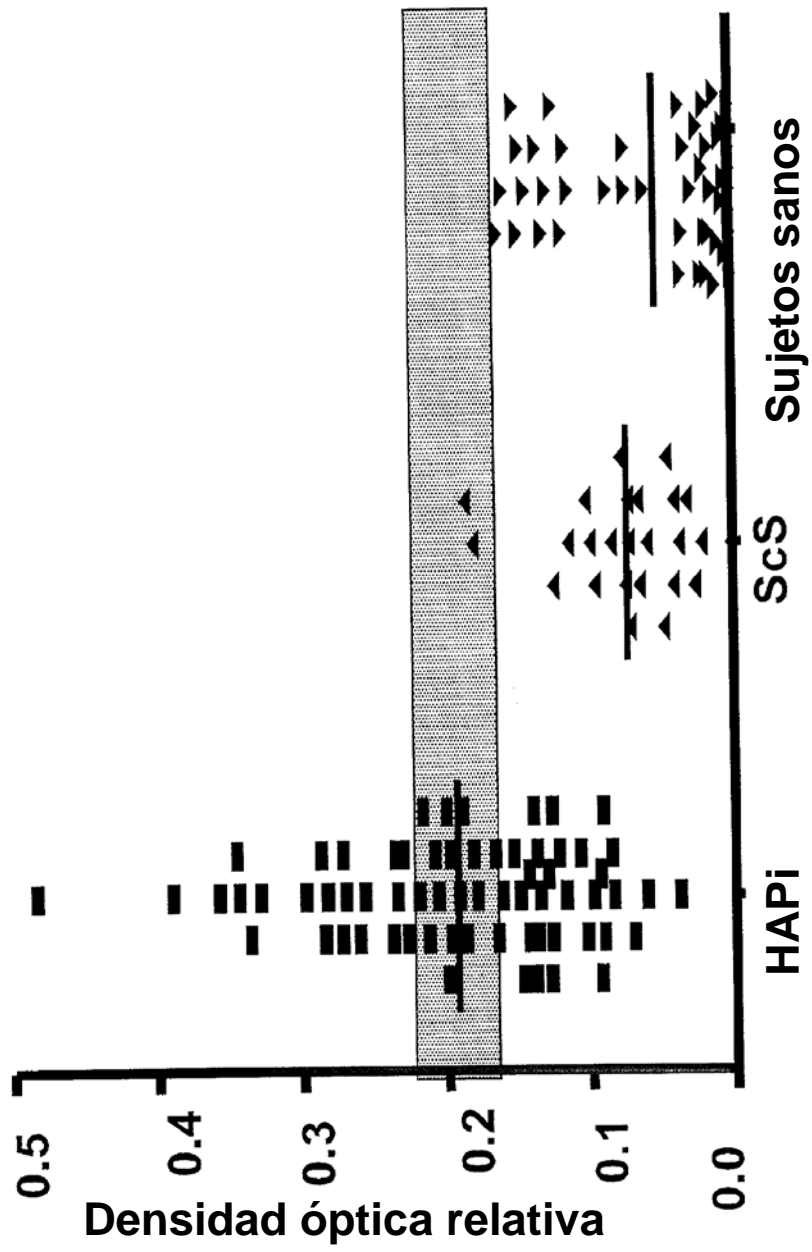


Figura 1

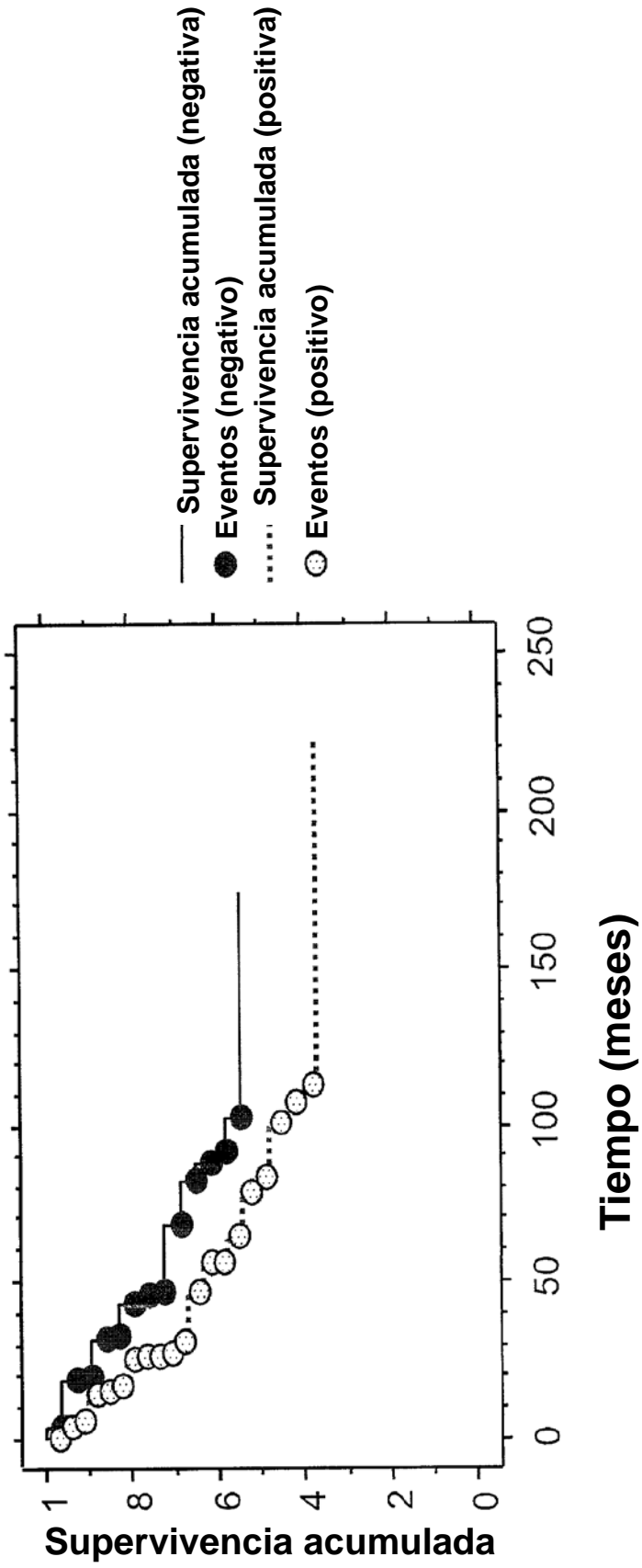


Figura 2