

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 082**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07802441 .1**
96 Fecha de presentación: **31.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2057470**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2009**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad que implica un anticuerpo antirreceptor de la endotelina**

30 Prioridad:
04.08.2006 EP 06016297

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2012

73 Titular/es:
**CELLTREND GMBH
IM BIOTECHNOLOGIEPARK
14943 LUCKENWALDE, DE**

72 Inventor/es:
**SCHULZE-FORSTER, Kai y
HEIDECKE, Harald**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 388 082 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad que implica un anticuerpo antirreceptor de la endotelina.

5 La presente invención pertenece al ámbito biológico, químico, más particularmente, inmunológico, así como también al diagnóstico y terapéutico, más en particular al campo del diagnóstico del rechazo de un trasplante, y de la esclerosis sistémica.

10 Para el trasplante exitoso de los órganos, se requiere que el órgano del donante sea compatible histológicamente tanto como sea posible, con el tejido del receptor. Dicha coincidencia está determinada por el sistema HLA (antígeno leucocitario humano), que consiste en un sistema complejo de antígenos tisulares que se encuentra virtualmente en cualquier célula. Dicho sistema juega un papel fisiológico importante en las reacciones inmunológicas de defensa (reconocimiento del "mismo" y del "no mismo"). Antes de cada trasplante, por tanto, se lleva a cabo un denominado "tipaje tisular" en el órgano donador y receptor, de forma que se asegura lo más posible la complementación del HLA.

20 Como resultado del inmenso polimorfismo genético, existe un número excepcionalmente grande de diversas moléculas HLA. Sólo se observa una complementación completa en los gemelos monocigóticos. Por otro lado, las moléculas HLA son únicas para cada persona.

Sin embargo, existen problemas porque las reacciones de rechazo contra el órgano trasplantado no pueden ser descartadas, a pesar de la extensa complementación de HLA entre receptores y donantes.

25 WO 02/093171 da a conocer una invención que se refiere a la utilización de AT₁ o de sus péptidos funcionalmente análogos o proteínas para predecir (diagnosticar) el riesgo de rechazo del trasplante.

Es todavía necesario proporcionar un procedimiento eficiente y de confianza que permita una predicción rápida y positiva del riesgo de una reacción de rechazo al trasplante.

30 Colagenosis es un término para un grupo de enfermedades autoinmunes raras. En éstas el organismo crea anticuerpos contra partes del tejido conjuntivo. La colagenosis comprende enfermedades Comprende enfermedades como SLE, lupus sistémico, granulomatosis de Wegener y síndromes CREST y SHARP. La colagenosis es difícil de diagnosticar. Por tanto, es necesaria una herramienta para diagnosticarla.

35 Aproximadamente, 100 millones de personas en Europa sufren de alguna forma de enfermedad reumatoide degenerativa o inflamatoria, lo que provoca que el impacto de estas enfermedades en las sociedades europeas sea arrollador para éstas. Las enfermedades de las articulaciones significan la mitad de la totalidad de las situaciones crónicas en las personas de 65 años y mayores.

40 La calidad de vida de aproximadamente el 7,5% de la población europea es grave y se ve permanentemente reducida por el dolor y la incapacidad funcional provocados por las enfermedades reumáticas. Las consecuencias más notables de estas enfermedades, por el momento, incurables, son la inmovilidad y la esperanza vital disminuida. Sólo en Europa, las enfermedades reumáticas imponen una carga económica de más de 200 billones de euros al año. En verdad, el impacto de las enfermedades reumáticas como una carga económica y social aumentará notablemente cuando la población europea envejezca. Una nueva terapia que consiste en poner el énfasis en las moléculas implicadas en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas, se ha desarrollado recientemente. A pesar de estos esfuerzos, no es posible todavía curar la mayoría de las enfermedades reumáticas. Un reto terapéutico incluye la cronicidad de la inflamación, la autoinmunidad, y la degeneración del sistema muscular esquelético. Aunque las enfermedades reumáticas difieren en su inmunoenfermedad, comparten mecanismos comunes de iniciación y perpetuación. Además, existe una potencial translacional considerable para la comprensión de otras enfermedades que implican al sistema inmune, por ejemplo, las enfermedades autoinmunes, las alergias y las infecciones. La diversidad de enfermedades reumáticas, la multiplicidad de los tejidos implicados, es decir, los huesos, cartílagos, articulaciones, riñón, piel, vasos sanguíneos, así como el enfoque multidisciplinario, requieren entender la base molecular de estas enfermedades y esto hace que su diagnóstico sea muy difícil de llevar a cabo.

55 El diagnóstico de la artritis y de otras enfermedades reumáticas es a menudo difícil, pues, entre las diversas enfermedades, muchos síntomas son similares. Para llevar a cabo un diagnóstico fiable, un médico puede necesitar llevar a cabo una revisión del historial médico, realizar un examen físico, obtener análisis de laboratorio, pruebas con rayos X y otros ensayos de obtención de imágenes. Las enfermedades reumáticas, son por ejemplo, la artritis reumatoide, la fibromialgia, el lupus eritematoso, la polimialgia reumática, la esclerosis sistémica progresiva, el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico y la inflamación de las articulaciones.

65 El American College of Rheumatology ha definido (1987) varios criterios para el diagnóstico de, por ejemplo, artritis reumatoide; rigidez matutina de más de una hora, artritis y el hinchamiento del tejido blando de más de 3 de 14 grupos de articulaciones/articulación, la artritis de los dedos de la mano, la artritis simétrica, los nódulos subcutáneos en señalizaciones específicas, un factor reumatoide superior a un nivel de 95 th/% y cambios radiológicos que

sugieren erosión de la articulación. Al menos, deben cumplirse cuatro criterios para establecer el diagnóstico, aunque muchos pacientes son tratados a pesar de no cumplir con estos criterios. Cuando se sospecha clínicamente de artritis reumatoide son necesarios estudios inmunológicos tales como el factor reumatoide (RF, un anticuerpo específico). Un RF negativo no descarta la artritis reumatoide. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo ensayo serológico, que detecta la presencia de anticuerpos de una proteína denominada anti-citrulinada (ACP). Como RF, este ensayo puede detectar aproximadamente el 80% de todos los pacientes RA, pero es raramente positiva en los pacientes no-RA. Asimismo, se llevan a cabo habitualmente otros varios análisis de sangre para investigar otras causas de la artritis, tal como el lupus eritematoso. Dichos análisis incluyen la velocidad de sedimentación globular (ESR), la proteína c-reactiva, el conteo sanguíneo total, la función renal, ensayos inmunológicos y de enzimas hepáticas, por ejemplo, se llevan a cabo en esta etapa todos los ensayos para anticuerpos antinucleares/ANA.

Tal como se ha indicado, para la artritis reumatoide, como una enfermedad entre las de la familia de las reumáticas, el diagnóstico en este ámbito de enfermedades, es difícil. Por tanto es necesarios disponer de un diagnóstico más seguro y fiable.

La presente invención muestra la necesidad de una herramienta diagnóstica para el rechazo del injerto y la esclerosis sistémica.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad en la que, la presencia o ausencia del anticuerpo antirreceptor de la endotelina se determina en una muestra procedente de un paciente que va a diagnosticarse. La presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina indica la enfermedad. En una forma de realización de la invención, el anticuerpo antirreceptor de la endotelina es un anticuerpo A antirreceptor de la endotelina. La enfermedad es seleccionada a partir del grupo de rechazo del injerto y de la esclerosis sistémica.

Los inventores encontraron que el 95% de los pacientes con rechazo del injerto, fueron positivos respecto a la presencia del anticuerpo de la antiendotelina, mientras que en los pacientes sin rechazo del injerto sólo el 6,2% mostraron un anticuerpo de la antiendoletina detectable.

En una forma de realización preferida de la invención, la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina se lleva a cabo detectando uno o más de los anticuerpos seleccionados de entre el grupo constituido por los anticuerpos IgA; anticuerpo IgG y anticuerpo IgM y más particularmente los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.

En una forma de realización de la invención, ésta se refiere a un inmunoensayo. Existen varias formas de llevar a cabo un inmunoensayo en una forma de realización preferida de la invención, siendo el inmunoensayo uno de entre la luciferasa y/o un ELISA.

La invención se refiere además a la utilización de un péptido receptor de la endotelina o de su análogo funcional para el diagnóstico de una enfermedad, seleccionándose a partir del grupo del rechazo al injerto y de la esclerosis sistémica.

En una forma de realización preferida, el péptido receptor de la endotelina es un péptido A receptor de la endotelina.

La invención se refiere a la utilización de un kit de investigación y/o diagnóstico de una enfermedad seleccionada a partir del grupo de rechazo del injerto y de la esclerosis sistémica, en el que el kit incluye un péptido receptor de la endotelina o su análogo funcional.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la utilización de un inhibidor de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina o a un inhibidor de un receptor de la endotelina para la producción de un medicamento, siendo el anticuerpo antirreceptor de la endotelina, en una forma de realización preferida, un anticuerpo A antirreceptor de la endotelina o un inhibidor de un receptor A de la endotelina.

Descripción detallada de la invención

Los inventores encontraron que las enfermedades pueden diagnosticarse detectando la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina en una muestra procedente de un paciente que va a ser diagnosticado. De hecho, los inventores encontraron que el 95% de los pacientes que presentan un rechazo al trasplante son positivos para el anticuerpo de la antiendoletina. El mismo anticuerpo de la antiendoletina puede detectarse sólo en el 6,2% delos casos, en pacientes sin rechazo.

De este modo, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad, en el que, en una muestra procedente de un paciente que va a diagnosticarse, se determina la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina, en el cual la enfermedad es seleccionada de entre el grupo constituido por rechazo al injerto y esclerosis sistémica.

Ha sido posible demostrar que existe una relación entre la presencia de dicho anticuerpo antirreceptor de la endotelina y la posibilidad de que se presente un rechazo al trasplante y en la esclerosis sistémica. En estudios citobiológicos e inmunohistoquímicos, así como investigando materiales biópsicos, se ha encontrado que no existen factores inmunológicos de riesgo añadidos al rechazo del trasplante. Se ha demostrado que la presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina da lugar a reacciones de rechazo en un receptor con órganos trasplantados. Además, se ha demostrado que la presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina es diagnóstico para la pre-eclampsia, hipertensión, vasculitis, colagenosis y enfermedades reumáticas inflamatorias y arteriosclerosis.

En relación con la presente invención, se utilizarán diversos términos generales, de la forma siguiente: "injerto" según el significado de la invención, es un órgano o tejido que se ha trasplantado a, o va a serlo. En el significado de la invención, sin embargo, los injertos pueden constituir también implantes particulares que están compuestos de materiales o componentes que se incorporan a un organismo durante un tiempo limitado, o durante la vida, para que asuman funciones sustitutivas específicas. Por ejemplo, tales injertos pueden realizarse con material inorgánico revestido con sustancias orgánicas tales como células cartilaginosas u óseas.

Según la invención, "por rechazo al injerto" se entiende de inducción de una reacción inmune al injerto en el receptor. Una reacción inmune en el receptor es una reacción de defensa o protectora específica del organismo contra los antígenos del trasplante.

El "receptor de la endotelina" puede encontrarse en su entorno celular natural y puede utilizarse junto con material asociado al receptor en su estado natural, así también como en una forma aislada con respecto a sus estructuras primarias, secundarias o terciarias, siendo bien conocido por los expertos en la materia. Basándose en el peso del receptor completo en la preparación, que va a utilizarse según la invención, el receptor aislado representaría por lo menos el 0,5%, preferentemente, por lo menos, el 5%, más preferentemente al menos el 25%, y en una forma de realización particularmente preferida, por lo menos, el 50%. El receptor se utiliza preferentemente en forma aislada, es decir, esencialmente libre de otras proteínas, lípidos, hidratos de carbono u otras sustancias que se asocien naturalmente con el receptor. "Esencialmente libre de" significa que el receptor está preferente y especialmente libre de otras proteínas, lípidos, hidratos de carbono o de otras sustancias asociadas naturalmente con el receptor, por lo menos en un 75%, preferentemente, por lo menos, en un 85%, más preferentemente, por lo menos, en un 95% y especialmente y preferentemente por lo menos, en un 99%.

En relación con la presente invención, puede utilizarse el receptor que se encuentra de forma natural, así como también todas las modificaciones, mutantes o derivados del receptor de la endotelina. De modo similar, un receptor de la endotelina obtenido mediante técnicas recombinantes, el cual incluye modificaciones aminoácidas, tales como inversiones, deleciones, inserciones, adiciones, etc., puede utilizarse según la invención, siempre que esta parte de la función esencial del receptor de la endotelina esté presente, principalmente la capacidad de unirse a anticuerpos. El receptor de la endotelina que se utilice puede también incluir aminoácidos excepcionales y/o modificaciones tales como alquilación, oxidación, modificaciones tiólicas, desnaturalización, oligomerización y similares. El receptor puede también sintetizarse mediante medios químicos. Según la invención, el receptor de la endotelina puede particularmente una proteína y/o péptido o una proteína de fusión, que además de otras proteínas, péptidos o sus fragmentos, incluye el receptor de la endotelina como un todo o en parte. Utilizando procedimientos convencionales por los expertos en la materia, pueden determinarse propiedades análogas a las de los péptidos o polipéptidos del receptor de la endotelina que tienen análogos funcionales. Por ejemplo, dichos polipéptidos o péptidos tienen una homología del 50-60%, 70% o 80% preferentemente 90%, más preferentemente 95%, y muy preferentemente del 98%, con respecto a los péptidos identificados como receptores de la endotelina, pudiéndose determinar dicha homología, por ejemplo, mediante el algoritmo de búsqueda de la homología de Smith-Waterman, utilizando el Programa MPFRCH (Oxford Molecular), por ejemplo.

El término "péptido" de un receptor de la endotelina que se utiliza en la presente invención, comprende también moléculas que difieren de la secuencia original por deleción o deleciones, inserción o inserciones, sustitución(s), y/o otras modificaciones bien conocidas en la técnica anterior y/o que comprenden un fragmento de la molécula del aminoácido original, exhibiendo todavía el receptor de la endotelina las propiedades anteriormente mencionadas. También se incluyen variantes alélicas y modificaciones. Los procedimientos para producir los cambios mencionados en la secuencia aminoácida son bien conocidos por los expertos en la materia y se han descrito en los libros de texto estándar de biología molecular, por ejemplo, Sambrook *et al.* supra. Estos expertos en la materia podrán también determinar si un receptor de la endotelina, por tanto, modificado, posee todavía las propiedades mencionadas anteriormente. Posibles péptidos receptores de la endotelina que se utilizan según la invención pueden ser, por ejemplo, la secuencia de cinco aminoácidos (140-KLLAG-144 (SEC ID nº. 1)), en el asa B. En la presente especificación a todas las modificaciones anteriormente ilustradas del receptor de la endotelina se hará referencia brevemente como "péptidos o proteínas funcionalmente análogos".

El término "muestra", según el significado de la invención puede referirse a todos los tejidos y líquidos biológicos tales como sangre, linfa, orina, líquido cerebral. La muestra se recupera del paciente y se somete a diagnóstico según la invención.

El "anticuerpo antirreceptor de la endotelina", según la invención, que va a detectarse, se une al receptor endotélico de forma específica. El anticuerpo puede también modificarse (por ejemplo, anticuerpos oligoméricos, reducidos, oxidados y marcados). El término anticuerpo antirreceptor de la endotelina, tal como se utiliza en la presente memoria comprende dos moléculas intactas y también fragmentos del anticuerpo antirreceptor de la endotelina, tales como Fab, $F(ab')_2$ y Fv, capaces de unirse al epítipo específico que determina el receptor de la endotelina. En estos fragmentos, la capacidad del anticuerpo o anticuerpos antirreceptores de la endotelina de unirse selectivamente a su antígeno o receptor se conserva en parte, definiéndose los fragmentos de la forma siguiente: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión antigénica de una molécula de anticuerpo, puede generarse por la fragmentación de un anticuerpo entero, utilizando la enzima papaína, obteniendo de este modo una cadena ligera intacta y parte de una cadena pesada; (2) el fragmento Fab de una molécula de anticuerpo, puede producirse mediante tratamiento de un anticuerpo entero con papaína y una reducción subsiguiente, obteniendo por tanto una cadena ligera intacta y parte de una cadena pesada, obteniéndose dos fragmentos Fab por molécula de anticuerpo; (3) $F(ab')_2$, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse por tratamiento de un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin subsiguiente reducción siendo $F(ab')_2$ un dímero formado por dos fragmentos Fab unidos juntos mediante dos enlaces disulfato; (4) Fv se define como un fragmento modificado mediante ingeniería genética que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada se expresa en forma de dos cadenas; y (5) anticuerpo de cadena única (SCA) definido como una molécula modificada mediante ingeniería genética, que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada unida mediante un engarce polipeptídico apropiado para obtener una molécula de cadena única fusionada genéticamente.

El término "epítipo", tal como se utiliza en la presente invención, representa cualquier antígeno determinante sobre el receptor de la endotelina. La determinación epitópica consiste normalmente en grupos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas con lados azucarados, presentando normalmente características específicas de la estructura dimensional libre, así como propiedades esquemáticas específicas.

El anticuerpo antirreceptor de la endotelina se une específicamente al receptor endotélico, o, llevando este a cabo, muestra una reactividad inmunoespecífica cuando el anticuerpo antirreceptor de la endotelina asume su función en una reacción de unión, en presencia de una población heterogénea de receptores endotélicos o sus fragmentos, permitiendo de este modo una conclusión sobre si se encuentra presente el receptor endotélico u otra estructura biológica. Bajo estas condiciones de un inmunoensayo, los anticuerpos antirreceptores de la endotelina anteriormente mencionados, se unirán preferentemente a una parte específica del receptor de la endotelina, mientras que no se lleven a cabo uniones significativas a otras proteínas presentes en la muestra.

Por "pacientes", según la invención, se entienden todas las personas, animales, plantas o microorganismos, tanto si muestran o no cambios patológicos. Según la invención cualquier muestra recogida de células, tejidos, órganos, organismos o similares, puede ser una muestra de un paciente, que va a diagnosticarse. En una forma de realización preferida, el paciente según la invención, es un hombre. En otra forma preferida de realización, el paciente según la invención es un hombre sospechoso de tener una enfermedad seleccionada del grupo de rechazo de trasplante y de esclerosis sistémica.

Una "reacción inmune" según la invención consiste en una interacción específica entre el receptor endotélico o los péptidos o proteínas de función análoga y los anticuerpos antirreceptor de la endotelinas. La reacción inmune puede detectarse utilizando diversos inmunoensayos.

"Inmunoensayos" según la invención, son ensayos que utilizan la interacción específica entre el receptor de la endotelina y péptidos o proteínas de función análoga, y los anticuerpos antirreceptores de la endotelina, para detectar la presencia o determinar la concentración de los anticuerpos antirreceptor de la endotelinas. Por ejemplo, una detección en la cuantificación de los anticuerpos antirreceptores de la endotelina, puede realizarse con la ayuda de dichos péptidos o proteínas de función análoga, por ejemplo, mediante inmuno precipitación o inmuno transferencia.

En una forma de realización preferida de la invención, ésta se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades, en el que dicho anticuerpo antirreceptor de la endotelina es un anticuerpo A antirreceptor de la endotelina.

Las endotelinas juegan un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular (Watson, S. *et al.*, Endothelin, the G-protein link receptor facts book, 1994). Constituyen los vasoconstrictores más potentes identificados, estimulan la contracción cardíaca, regulan la liberación de sustancias vasoactivas y estimulan la nitrogénesis en los vasos sanguíneos en los cultivos primarios. También estimulan la contracción en casi todos los otros músculos lisos (por ejemplo, útero, bronquios, estómago) y estimulan la secreción en varios tejidos (por ejemplo, riñón, hígado y adrenales). En el cerebro también se han encontrado receptores de la endotelina, por ejemplo en el córtex cerebral y en el cerebelo. Las endotelinas se han implicado en varias situaciones patofisiológicas asociadas con el estrés. Se cree que los receptores ETB juegan un papel significativo en la vasodilatación dependiente del endotelio y un papel menos importante en la vasoconstricción. En el SNC, el receptor se ha encontrado en el córtex cerebral, hipocampo, cerebelo y astrositos. Los receptores ETB activan la vía

fosfoinositida a través de una proteína G no sensible a la toxina pertussis, y por tanto, algunas acciones son sensibles a pertussis (Watson *et al.*, 1994). El receptor ETA es el tipo predominante de receptor de la endotelina. Media la contracción en vasos sanguíneos, bronquios, útero y corazón; también inhibe la secreción de aldosterona. Los receptores se han identificado en células gliales en SNC. Activan la vía fosfoinositida mediante una proteína G no sensible a la toxina pertussis, probablemente del tipo Gq/G11 (Watson *et al.*, 1994).

La endotelina en sí misma, endotelina-1 (ET-1), es un péptido vasoconstrictor potente derivado del endotelio, aislado originariamente del medio de cultivo de células endoteliales vasculares (EC) (Yanigisawa, M.H. *et al.*, 1988, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, Nature (Londres) 332:411-415). La clonación subsiguiente del ADNc genómico humano, reveló tres isopéptidos ET diferentes denominados ET-1, ET-2 y ET-3 (Inoue, A.M. *et al.*, 1989, The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 2863-2867), sugiriendo la existencia de subtipos del receptor. La clonación ADNc de los receptores ET a partir de los pulmones bovinos reveló por lo menos los dos distintos subtipos antes mencionados. El receptor endotelínico A parece ser selectivo para ET-1 y ET-2 y el otro receptor endotelínico B parece no ser isopéptido selectivo. Ambos subtipos receptores incluyen siete dominios transmembranosos comunes a los receptores unidos a la proteína G.

Según la invención, la enfermedad se selecciona del grupo del rechazo del injerto y de la esclerosis sistémica.

En una forma de realización preferida de la invención, la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina se lleva a cabo detectando uno o varios de los anticuerpos seleccionados de entre el grupo constituido por el anticuerpo IgA, IgB e IgM.

Los anticuerpos humanos pueden dividirse en cinco tipos de inmunoglobulinas. El tipo A de inmunoglobulina (IgA) existe en una forma que se disuelve en la sangre, así como también en una variante secretoria. IgA comprende dos tipos básicos. El IgA secretorio consiste en dos moléculas inmunoglobulínicas básicas junto a una cadena J y un componente secretorio. Más moléculas específicamente IgA pueden prevalecer en las secreciones corporales.

El tipo IgG de inmunoglobulinas representa la parte más importante entre las inmunoglobulinas. Los anticuerpos de la segunda respuesta inmunitaria que tiene lugar después del contacto del sistema inmune de un antígeno particular pertenecen ampliamente al tipo IgG.

En una forma de realización particularmente de la invención, el anticuerpo antirreceptor de la endotelina, se selecciona a partir del grupo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

"Inmunoensayos" según la invención, son ensayos que utilizan la interacción específica entre el receptor endotelínico y péptidos o proteínas de función análoga, y los anticuerpos antirreceptores de la endotelina, para detectar la presencia o determinar la concentración de los anticuerpos antirreceptor de la endotelina. Por ejemplo, una detección y la cuantificación de los anticuerpos antirreceptores de la endotelina, puede realizarse con la ayuda de dichos péptidos o proteínas de función análoga, por ejemplo, mediante inmuno precipitación o inmuno transferencia. Por ejemplo, los inmunoensayos, según la invención, pueden subdividirse en las siguientes etapas: (1) reacción anticuerpo antirreceptor de la endotelina /receptor de la endotelina, (2) si se requiere la separación del complejo anticuerpo antirreceptor de la endotelina de otros componentes de la mezcla reactiva, especialmente de los anticuerpos no unidos a los anticuerpos antirreceptores de la endotelina y al receptor de la endotelina y (3) midiendo la respuesta. Así para la reacción anticuerpo antirreceptor de la endotelina/receptor de la endotelina pueden utilizarse varias configuraciones, por ejemplo (a) precipitación de una reacción con un acceso de la otra, o (b) la competición entre cantidades conocidas de anticuerpos antirreceptor-endotelina o receptor de la endotelina y el material que va a investigarse.

Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo para los anticuerpos antirreceptores de la endotelina, mediante a) utilización del acceso receptores-endotelina/péptidos o proteínas de función análoga; o b), competición entre un anticuerpo marcado antirreceptor de la endotelina de cantidad conocida y un anticuerpo no marcado de cantidad desconocida para una cantidad definida de receptor endotelina o de péptidos de proteínas de función análoga.

El receptor endotelina puede inmovilizarse sobre un soporte sólido para permitir la separación de un complejo anticuerpo antirreceptor de la endotelina/receptor endotelina. Por ejemplo, el material de soporte sólido puede ser nitrocelulosa, cloruro de polivinilo o poliestireno, por ejemplo, el pocillo de una placa de microtitulación. El inmunoensayo puede llevarse a cabo en un entorno microfluido. Para medir la interacción anticuerpo antirreceptor de la endotelina/receptor-endotelina, es posible utilizar anticuerpos antirreceptor-endotelina marcados, receptores-endotelina marcados o reactivos secundarios, por ejemplo. El receptor endotelina puede marcarse radioactivamente o con enzimas, o con compuestos fluorescentes, por ejemplo. Cualquiera que sea la marca que se utilice, la respuesta de la interacción anticuerpo antirreceptores de la endotelina/receptor-endotelina, puede potenciarse utilizando la afinidad de las proteínas avidina o estreptoavidina por la biotina. Los inmunoensayos utilizados según la invención, pueden ser: (1) inmunoensayos que utilicen marcadores radioactivos: (a) radioinmunoensayos con unión competitiva (RIA) y (b) ensayo inmunoradiométrico (IRMA); (2) inmunoensayos que utilicen un marcador enzimático: (a) inmunoensayos enzimáticos (EIA) y (b) enzima inmunoanálisis de absorción (ELISA); (3) inmunoensayos que

utilicen una combinación de marcadores radioisotópicos y enzimáticos (inmunoensayo radio-enzimático ultrasensible) (USERIA). Además, el inmunoensayo según la invención puede ser un inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, un ensayo nefelométrico, un ensayo turbidimétrico, un ensayo Western Blot, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogénico, un inmunoensayo heterogénico, un ensayo delator, por ejemplo, un ensayo de luciferasa.

En una forma de realización preferida de la invención, el inmunoensayo es un ELISA.

La invención se refiere también a la utilización de un péptido receptor de la endotelina, o su análogo funcional, para el diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo formado por el rechazo de un injerto y la esclerosis sistémica.

En una forma de realización preferida, el péptido receptor de la endotelina es un péptido A receptor de la endotelina.

La invención se refiere además a la utilización de un kit de investigación y/o diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por el rechazo de un injerto y de la esclerosis sistémica, en el que el kit incluya un péptido receptor de endotelina o su grupo análogo funcional.

En una forma preferida, el kit de investigación o de diagnóstico, comprende un péptido A receptor de la endotelina o su análogo funcional.

El kit de ensayo inmunológico utilizado según la invención comprende el receptor endotelina o un análogo funcional suyo, o el receptor A de la endotelina o un análogo funcional suyo, o péptidos o proteínas de función análoga per se. El kit de ensayo de la invención comprende, por lo menos, un receptor endotelina completo, o péptidos o proteínas funcionalmente análogos de dicho receptor, unidos opcionalmente a una fase sólida. Además, el kit de ensayo puede también incluir tampones, conjugados específicos con una enzima, solución limpiadora, solución del sustrato, para detectar la reacción inmune y/o una solución de extinción. Utilizando estas sustancias, un experto en la materia podrá llevar a cabo, por ejemplo, un ELISA, para detectar los anticuerpos antirreceptores de la endotelina. Los tampones, el conjugado específico más la enzima, la solución limpiadora, la solución del sustrato para detectar la reacción inmune y la solución de extinción, son bien conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, será suficiente tener el ensayo incluyendo un receptor de la endotelina liofilizado, o péptidos o proteínas de función análoga al receptor de la endotelina con función análoga, liofilizados, y añadir los tampones y otras soluciones inmediatamente antes de ensayar el material biológico. Sin embargo, también es posible proporcionar el kit de ensayo con el receptor de la endotelina o sus péptidos funcionalmente análogos de proteínas unidas a una fase sólida. Para detectar los anticuerpos antirreceptores de la endotelina, el conjugado específico, la solución de lavado, la solución de sustrato y la solución de extinción que pueden ser componentes del kit de ensayo, tienen que añadirse según un modo bien conocido por los expertos en la materia.

En otra forma de realización ventajosa de la invención, se contempla que el kit de ensayo es una cinta que incluye el receptor endotelina o sus proteínas o péptidos funcionalmente análogos inmovilizados sobre una fase sólida. Por ejemplo, la cinta de ensayo puede sumergirse en suero u otra muestra de un paciente, e incubarse. Utilizando una reacción bioquímica específica sobre la cinta de ensayo después de la formación del complejo anticuerpo antirreceptor de la endotelina/receptor endotelina, puede desencadenarse una reacción colorimétrica específica mediante la cual puede detectarse el anticuerpo antirreceptor de la endotelina.

El sistema de ensayo que se utiliza en la invención, permite la cuantificación directa de los anticuerpos antirreceptores de la endotelina en una muestra, por ejemplo, en el plasma de los pacientes. El procedimiento de detección según la invención ahorra tiempo y es rentable. Pueden ensayarse grandes cantidades de muestras, y, contando con la pequeña cantidad del kit requerido, pueden utilizarse rutinas de laboratorio.

Ejemplos

Ejemplo I: ELISA del receptor de la endotelina

Una placa de microtitulación apropiada revestida con una estreptavidina se carga con el péptido biotinilado que codifica el receptor endotelina. Entonces 100 µl de una solución por pocillo en la placa de microtitulación se incuba con 5 µl/ml en un tampón de dilución apropiada. Para medir la unión no específica, los pocillos se rellenan también con 100 µl de tampón de dilución. El tampón de dilución puede incluir albúmina sérica bovina al 0,5%, 10 mM de tampón fosfato (pH 7,4), 140 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05%.

Consecutivamente al tiempo de reacción, la solución peptídica se traslada por decantación y cada pocillo se lava tres veces con 250 µl de un tampón apropiado para lavado. Un tampón apropiado, para lavado puede incluir 10 mM de tampón fosfato (pH 7,4), 140 mM de NaCl y Tween 20 al 0,1%. Entonces, 100 µl por pocillo de suero son diluidos en un tampón de dilución y se sitúan en ambas placas cargadas con péptidos, incubándose placas comparativas. A continuación, los pocillos se lavan tal como se describió anteriormente.

Los anticuerpos unidos se detectan utilizando anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulínicos G humanos, con una peroxidasa conjugada. A continuación el anticuerpo se diluyó en un tampón para dilución y se incubó (100 µl/pocillo), siguiéndose esto de tres etapas de lavado (véase anteriormente).

- 5 Después de la adición de 100 µl sobre una solución de sustrato preparada para el uso, (por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina), el color se desarrolla dependiendo de la cantidad de peroxidasa en el pocillo. La reacción del sustrato se determina añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 0,5 M. La absorción se mide a 450 nm. Para la evaluación, se busca la diferencia entre las absorciones de la placa de microtitulación cargada con péptidos y las de la placa sin péptidos. Las muestras que poseen una absorción más alta, muestran, entonces, que la extinción es positiva. Ésta se calcula a partir del valor promedio de la absorción de donadores negativos más tres veces la desviación estándar. En general, en el ensayo se co-realiza un control de la extinción o una serie de diluciones estándar que permiten la cuantificación en unidades relativas.

15 Ejemplo II

Varios grupos de pacientes (con diagnóstico positivo), así como los controles, se ensayaron con respecto a la presencia o ausencia del anticuerpo antirreceptor de la endotelina. La tabla I muestra los resultados obtenidos.

- 20 Tabla 1: Detección del anticuerpo antirreceptor de la endotelina en muestras sanguíneas de controles saludables, enfermedades de control, pacientes SSc pacientes con enfermedades inflamatorias y pacientes con rechazo del injerto.

Enfermedad	Presencia del anticuerpo antirreceptor de la endotelina en porcentaje
Controles sanos	2,8
Enfermedades de control	10,8
SSc	57,5
Enfermedad inflamatoria	35
Pacientes con rechazo del injerto	95
Pacientes sin rechazo del injerto	6,2

25 Ejemplo III

- La invención se refiere también a un procedimiento para la extracción de los anticuerpos antirreceptores de la endotelina de la sangre aislada, en el que en una primera etapa, se determina la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptores de la endotelina en una muestra sanguínea de un paciente que va a diagnosticarse, en el que se cree que el paciente presenta una enfermedad seleccionada a partir del grupo de rechazo del injerto, el síndrome de Raynaud (Morbus Raynaud), diabetes, pre-eclampsia, hipertensión, vasculitis, colagenosis, una enfermedad reumática inflamatoria y arteriosclerosis y en el que, después de determinar la presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina, la sangre del paciente se somete a una plasmaféresis. Se analizó la sangre aislada de los pacientes que se pensaba presentaban esclerosis sistémica, en cuanto a la presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina. En ambos pacientes se confirmó la presencia de un anticuerpo antiendotelina. La sangre aislada se sometió a plasmaféresis. Entonces, la sangre aislada fue reinfundida a los pacientes. El título de anticuerpos disminuyó significativamente por debajo de la extinción del valor que podía determinarse según la invención. La síntesis de la esclerosis sistémica se redujo significativamente.

40 Ejemplo IV

- Mediante un ensayo en fase sólida, se analizan los sueros de 212 pacientes con esclerosis sistémica, 60 individuos sanos de control, 120 pacientes con artritis reumatoide y 124 individuos adicionales de control, con hipertensión pulmonar idiopática o escleroderma respecto a la presencia de anticuerpos dirigidos contra receptores tipo A de la endotelina-1 (ET_AR). También se evaluaron la implicación orgánica individual, la supervivencia de los pacientes y el efecto de las terapias celulares o inmunosupresoras. Se estudió *ex vivo* la Endotelina-1 en las arterias de resistencia pulmonar y la respuesta vascular a los ligandos receptores naturales.

- Se detectó ET_AR-AA en el 57,5% de los pacientes SSc, pero sólo en el 10,8% de los individuos con enfermedades de control, respectivamente, y en el 2,8% de los individuos normales. Los pacientes ET_AR-AA presentaban una enfermedad más severa. La posibilidad para ET_AR-AA predijo intensamente el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar y la mortalidad SSc-asociada. Los niveles de anticuerpos no fueron influenciados por la inmunosupresión habitualmente utilizada o por el trasplante de células troncales. La estimulación de los vasos de resistencia pulmonar con ET_AR-AA *ex vivo*, aumentó la respuesta con respecto a la Endotelina-1, que pudo bloquearse mediante los correspondientes antagonistas receptores.

55 Pacientes y evaluación de las manifestaciones clínicas.

Se recuperaron muestras séricas en 212 pacientes consecutivos con escleroderma entre enero del 2004 y noviembre del 2006. Los pacientes presentaban un síndrome limitado (n=89), SSc difuso (n=78), o uno solapado

(n=45) con otras enfermedades del tejido conjuntivo tal como se ha definido por LeRoy *et al.*, y que se corresponde con los criterios para la clasificación de SSc del American College of Rheumatology (21, LeRoy-EC, J. Rheumatol. 1988, Massi). Se obtuvieron sueros de control de 71 pacientes sanos y de 239 pacientes con enfermedades de control que incluían 115 pacientes con artritis reumatoidea, 33 pacientes con escleroderma, 38 con el fenómeno de Raynaud (PRP) y 60 pacientes con hipertensión pulmonar arterial idiopática. El diagnóstico en cada grupo de control se llevó a cabo según los criterios establecidos para cada situación. De cada paciente, se obtuvo por escrito un consentimiento respecto a la utilización de muestras séricas con propósitos de investigación.

También estudiamos 11 pacientes al azar con una temprana esclerosis sistémica difusa, antes del inicio de terapia pulsante con ciclofosfamida intravenosa (750 mg/m² por pulso), tratándose 3 pacientes con rituximab y receptores de trasplantes autólogos celulares troncales incluidos en el ensayo ASTIS (Laar). Las primeras muestras se obtuvieron antes del inicio de la terapia y hasta siete muestras de control, durante 24 meses de seguimiento.

Un procedimiento estandarizado por el grupo europeo de investigación y de ensayos clínicos para el escleroderma (EUSTAR), se utilizó para recoger datos sobre todos los pacientes, reuniéndose las variables siguientes durante los primeros meses de seguimiento después de obtener muestras séricas. Se evaluó la fibrosis dérmica mediante, por lo menos, dos investigadores independientes utilizando la clasificación modificada dérmica de Rodnan. El nivel de hemoglobina y ESR se derivaron a partir de muestras sanguíneas. Se analizó el suero con respecto a la presencia de anticuerpos anticentroméricos (ACA), anticuerpos antitopoisomerasa (Scl-70), anti AT₁R, y los autoanticuerpos anti-ET_AR. La función pulmonar se evaluó mediante la capacidad vital forzada predicha (FVC) y la capacidad de difusión se ajustó para la concentración de hemoglobina (DLCO) mediante un procedimiento respiratorio sencillo. Los pacientes con un ensayo de función pulmonar patológica se examinaron con un escáner CT de alta resolución, los restantes pacientes sufrieron un examen pulmonar mediante rayos X. La implicación cardiaca se confirmó por un médico si se encontraban presentes dos de los cambios siguientes disfunción diastólica, cambios en el ECG, fracción de eyección disminuida, o palpitaciones.

PAH secundaria a SSc se sospechó en pacientes con disnea progresiva con ejercicio moderado (NYHA III), > a una presión sistólica arterial pulmonar de 25 mmHg mediante ecocardiografía, > a un aumento de 1,4 veces de la relación FVC/DLCOcSB, o síntomas de fallo ventricular derecho tal como se evaluó mediante ecocardiografía (por ejemplo, efusión pericárdica, aumento de los diámetros del ventrículo derecho. Se consideró PAH probado por una presión arterial pulmonar (mPAP) media superior a 25 mmHg durante el descanso o ≥ 35 mmHg en ejercicio, en presencia de resistencia vascular pulmonar superior a 3 mmHg/L/min y una presión en cuña capilar < 15 mmHg mediante cateterizaciones del corazón derecho. Las muertes y las resucitaciones se incluyeron sólo en el estudio cuando se relacionaron con SSc.

Ensayo en fase sólida

Anticuerpos anti-AT₁R y autoanticuerpos anti-ET_AR se midieron mediante un ensayo ELISA celular. El ensayo utiliza extractos membranosos de células CHO que sobreexpresan AT₁R o ET_AR que sirven como fase sólida. La especificidad de los anti-AT₁R y de los anti-ET_AR-ELISA se demostró mediante experimentos de bloqueo utilizando extractos membranosos de las correspondientes progenies celulares que muestran una disminución antigénica restringida y dependiente de la dosis en la unión al anticuerpo para los antígenos respectivos. Contrariamente a esto, los extractos membranosos de las células CHO no transfectadas, no mostraban efecto de bloqueo sobre AT₁R y sobre la unión del anticuerpo anti-ET_AR.

Extinción y variabilidad inter-ensayos. Las muestras séricas se dispusieron al azar para el análisis y los ensayos se llevaron a cabo por personas que no sabían nada de la enfermedad de los pacientes. Todos los ensayos se realizaron por duplicado para ambos, el anticuerpo anti-AT₁R y el anticuerpo anti-ET_AR.

Estadística

Curvas características operantes de los receptores (ROC), se graficaron con respecto a la sensibilidad de los ensayos de detección de los anticuerpos AT₁R y ET_AR contra 1 menos la especificidad para todas las enfermedades estudiadas, determinándose los respectivos valores de extinción. Se dan a conocer datos continuos con valores medios (con intervalos). Llevamos a cabo comparaciones entre grupos, utilizando el ensayo Mann-Whitney para variables continuas. Además, mediante análisis Kaplan-Meyer se evaluaron proporciones perjudiciales para la primera manifestación de la hipertensión pulmonar, úlceras digitales, y muerte y resucitación durante el período de observación. Las proporciones extrañas y el riesgo relativo se calcularon para determinar asociaciones con implicaciones orgánicas individuales. Los datos miográficos de los pequeños vasos se analizaron por ANOVA. Se consideró significativo un valor P inferior a 0,05. Los resultados se expresan como promedios ± SEM, estando n relacionado con el número de los segmentos anulares arteriales pulmonares estudiados.

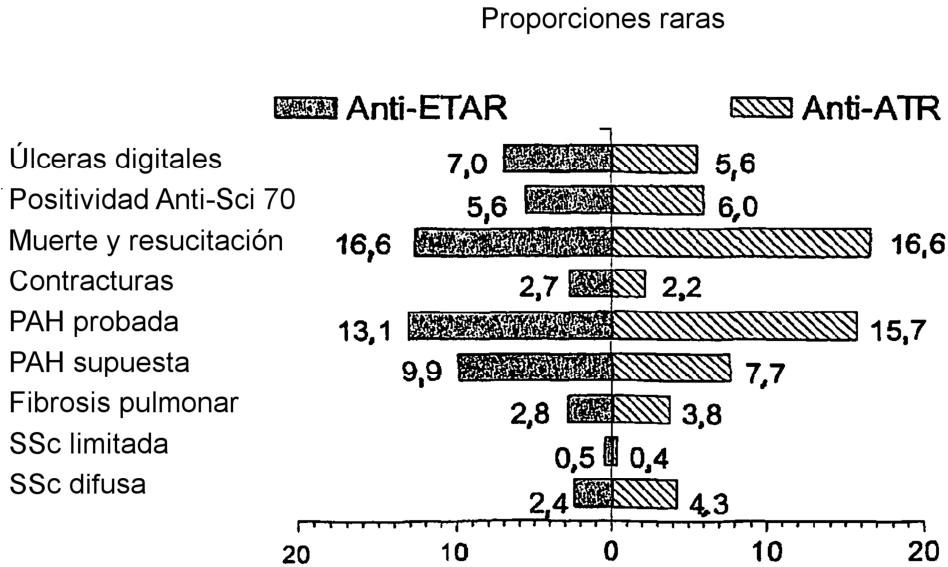
Autoanticuerpos ET_AR en diversas enfermedades.

ET_AR-AA (figura 1) se detectaron en 123 de los 212 SSc (57,5%), pero en sólo 2,8% de los individuos normales, en 8,7% de los pacientes RA y en el 9,1% de los pacientes con escleroderma. La mayoría de los pacientes (84%)

presentaban AT₁R-AA y ET_AR-AA (P<0,001, r² = 0,75, Fig. 1, cuadro B). La positividad singular para AT₁R-AA se detectó en el 6% de los pacientes SSc y en el 10% para ET_AR-AA solo.

5 Tabla 2: Positividad AT₁R-AA y ET_AR-AA y manifestaciones patológicas determinadas mediante parámetros clínicos y de laboratorio.

Riesgo para manifestaciones orgánicas en pacientes relacionados con anticuerpos anti-ETAR y anti AT1R



10 La asociación entre pacientes positivos al anticuerpo antirreceptor y la fibrosis pulmonar se vio también apoyada mediante el análisis de los parámetros de la función pulmonar. El porcentaje de FVC y DLCO predichas fue inferior en el grupo de pacientes positivos al anticuerpo cuando se compararon con los pacientes ensayados negativamente. El grado más alto de cambios fibróticos en la cohorte positiva al anticuerpo fue también corroborado por la clasificación dérmica de Rodnan muy modificada en el grupo positivo al anticuerpo. Los pacientes con anticuerpos antirreceptor presentan también un curso más largo de la enfermedad y presentan un ESR más alto cuando se comparan con el grupo negativo de anti-anticuerpos para el receptor vascular (Tabla 2).

Valor predictivo

20 Para determinar el valor predictivo de ambos anti-anticuerpos anti-AT₁R, y anti-ET_AR, llevamos a cabo un análisis prospectivo para la mortalidad relacionada con SSc y PAH después del análisis de anticuerpos (figura 3). Los anticuerpos anti-AT₁R y anti-ET_AR tienen ambos un valor predictivo para la mortalidad (P = 0,002 y P = 0,001 respectivamente) durante un período promedio de observación de 22 meses. 14 de los 110 pacientes SSc con anticuerpos anti-AT₁R o anti-ET_AR, murieron (N = 11) o resucitaron (N = 3), pero ningún paciente único en el grupo negativo de anticuerpos (P = 0,004, Figura 3a). Las causas de muerte relacionadas con SSc fueron un fallo multiorgánico con y sin PAH (N = 7), PAH (N = 3) e implicación cardíaca con taquicardia ventricular (N = 4).

30 Además, los anticuerpos antirreceptor también predicen la hipertensión arterial pulmonar. Durante el período de observación, el diagnóstico de PAH se realizó en 21 pacientes con anticuerpos anti-AT₁R, pero no en un paciente único sin anticuerpos anti-AT₁R (P < 0,001, Figura 4b). Resultados similares se obtuvieron también para los pacientes positivos a anticuerpos anti-ET_AR (P < 0,001). Los dos pacientes negativos para los anticuerpos anti-ET_AR, pero que desarrollaron PAH, fueron positivos para los anticuerpos anti-AT₁R y mostraban anticuerpos anti-ET_AR superiores a 16 U. Para los pacientes que tienen ambos anticuerpos antirreceptores, la incidencia de la PAH demostrada aumentó también (P < 0,001).

35 **Leyendas de las Figuras**

40 Figura 1: Niveles y valor diagnóstico de los auto anticuerpos anti-AT₁R-AA y anti-ET_AR-AA en distintas enfermedades autoinmunes. Niveles de autoanticuerpos AT₁R (cuadro A) y ET_AR (cuadro B) medidos en el suero de individuos sanos de control (N), pacientes con artritis reumatoide (RA), esclerosis sistémica (SSC), escleroderma (M), y fenómeno primario de Raynaud (PRP). Se muestran como líneas los niveles medios, las líneas con puntos representan los intervalos normales superiores. Comparados con los niveles de anticuerpos encontrados en la

esclerosis sistémica, todas las demás enfermedades revelaron niveles más bajos ($P < 0,001$).

Figura 2: Comparación de los niveles de autoanticuerpos AT₁R (cuadro A) y ET_AR en pacientes SSc con PAH, pacientes SSc sin PAH o con IPAH.

5
 10
 15
 20
 25
 30

Figura 3: Curvas Kaplan-Meier para analizar el valor prospectivo de anticuerpos anti-AT₁R y anti-ET_AR. Los pacientes SSc con anticuerpos anti-AT₁R, anti-ET_AR, o con ambos anticuerpos antirreceptor muestran un riesgo mayor para la mortalidad relacionada con SSc (cuadro a), definida por muerte (n = 12) o resucitación (n = 3) y muestran un riesgo mayor para PAH (cuadro b) durante un período promedio de observación de 22 meses. Téngase en cuenta que el eje Y empieza al 70%.

Listado de secuencias

<110> Celltrend GmbH

<120> Procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad que implica un anticuerpo antirreceptor de la endotelina

<130> N1224 PCT BLN

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Leu Leu Ala Gly
 1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para diagnosticar una enfermedad, en el que la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina es determinada en una muestra de un paciente que va a diagnosticarse y en el que la presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina indica la enfermedad, en el que la enfermedad se selecciona de entre el grupo constituido por el rechazo a un injerto y la esclerosis sistémica.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo antirreceptor de la endotelina es un anticuerpo A antirreceptor de la endotelina.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina se lleva a cabo detectando uno o más de los anticuerpos seleccionados de entre el grupo constituido por el anticuerpo IgA, el anticuerpo IgG y el anticuerpo IgM.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que uno o más de los anticuerpos se seleccionan de entre el grupo constituido por IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.
- 25 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el inmunoensayo se selecciona de entre el grupo constituido por inmunoprecipitación, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, un ensayo nefelométrico, un ensayo turbidimétrico, un ensayo Western Blot, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo de delator, tal como un ensayo de la luciferasa.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el inmunoensayo es un ELISA.
- 35 7. Utilización de un péptido receptor de la endotelina para el diagnóstico de una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por el rechazo al injerto y la esclerosis sistémica, siendo diagnosticada la enfermedad mediante la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina en una muestra procedente de un paciente que va a diagnosticarse.
8. Utilización según la reivindicación 7, en la que el péptido receptor de la endotelina es un péptido A receptor de la endotelina.
9. Utilización de un kit de investigación y/o diagnóstico destinado al diagnóstico *in vitro* de una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por el rechazo a un injerto y la esclerosis sistémica, en el que el kit incluye un péptido receptor de la endotelina o su análogo funcional.

Fig. 1 A

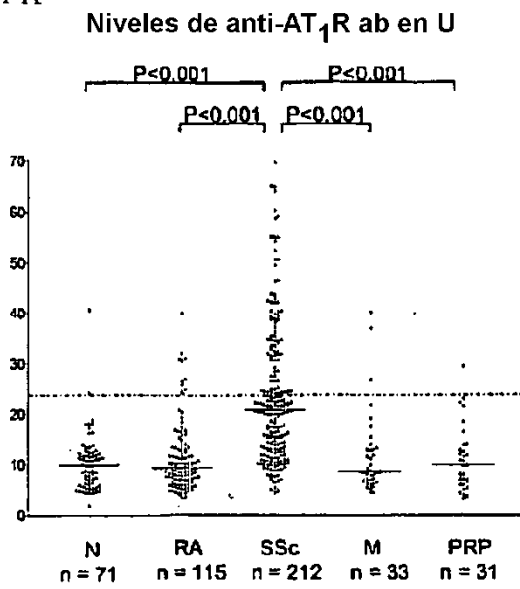


Fig. 1 B

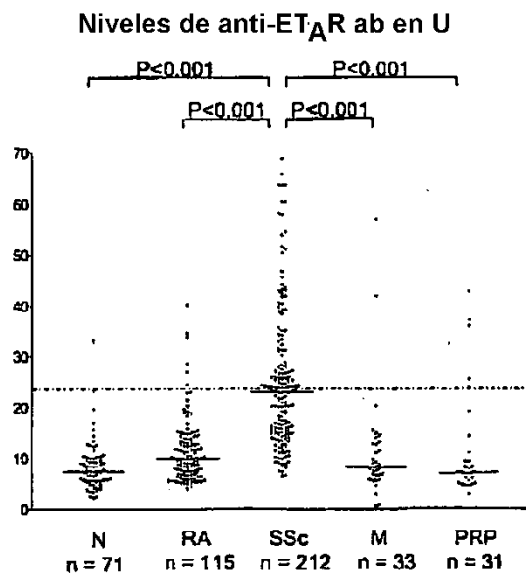


Fig. 2

