

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 102**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03709720 .1**
- 96 Fecha de presentación: **25.02.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1478929**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Procedimiento para detectar enfermedades que se basan en defectos de la proteína CFTR, reguladora de la conductancia a través de la membrana de la fibrosis quística**

30 Prioridad:
26.02.2002 DE 10208293
12.04.2002 DE 10216160

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2012

73 Titular/es:
SCHILLERS, HERMANN (50.0%)
CASTELLEWEG 7
48155 MUNSTER, DE y
OBERLEITHNER, HANS (50.0%)

72 Inventor/es:
SCHILLERS, HERMANN y
OBERLEITHNER, HANS

74 Agente/Representante:
No consta

ES 2 389 102 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 detectar enfermedades que se basan en defectos de la proteína CFTR, reguladora de la conductancia a través de la membrana de la fibrosis quística

5 La invención se refiere a procedimientos y a medios no genéticos de detección de enfermedades que se basan en defectos de la CFTR, en particular de la enfermedad fibrosis quística (en inglés, "cystic fibrosis" o CF) y reivindica la prioridad de los documentos de solicitudes de patentes alemanas 10208293.6 y 10216160.7 que se incorporan en esta memoria como referencia.

10 Diferentes enfermedades que se basan en defectos de la CFTR, como por ejemplo la fibrosis quística, la ausencia congénita del conducto deferente y algunas formas de pancreatitis, son bien conocidas. La fibrosis quística, también conocida como mucoviscidosis, representa una de las enfermedades más frecuentes de origen genético. La enfermedad se manifiesta con una frecuencia que varía regionalmente, de aproximadamente 1:2500 recién nacidos.

15 La fibrosis quística se hereda de forma autosómica recesiva y se debe a un defecto en el brazo largo del cromosoma 7. Está afectado el gen que codifica la proteína CFTR (reguladora de la conductancia a través de la membrana de la fibrosis quística), una proteína de transporte a través de la membrana. El principal síntoma de esta enfermedad grave es un funcionamiento incorrecto general de los epitelios, de todas las glándulas exocrinas, de los pulmones y del tracto digestivo. La enfermedad se manifiesta por un aumento de la viscosidad de las secreciones de las glándulas mucosas en el pulmón y en el páncreas. En el curso progresivo de la enfermedad tienen lugar importantes cambios anatómicos, que tienen como consecuencia graves complicaciones en la región de las vías respiratorias, como por ejemplo infecciones crónicas con enfisema pulmonar y trastornos graves de la digestión (malabsorción), con pérdidas de líquido y de electrolitos. El tratamiento de la fibrosis quística se lleva a cabo mediante sustitución enzimática, tratamiento específico con antibióticos y fisioterapia (masajes de percusión). La enfermedad no es curable. Los pacientes con fibrosis quística padecen una limitación sustancial de su calidad de vida y, por lo general, llegan a una edad de aproximadamente 40 años, a pesar de la buena asistencia sanitaria actual.

25 La aparición de la enfermedad todavía no está determinada claramente. El gen afectado codifica un canal de cloruro localizado principalmente en la membrana de las células epiteliales. Se describe una variedad de mutaciones diferentes, que conducen a un aumento de la viscosidad de la mucosidad y a un cambio de la composición de las secreciones (Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258ª edición). La mutación más frecuente es la delección de fenilalanina en la posición 508 ($\Delta F508$). Además de la forma homocigota de la fibrosis quística, la enfermedad también se puede desarrollar en portadores de genes heterocigotos con diferentes grados de gravedad y también se puede desarrollar a una edad avanzada. Aproximadamente el 4% de la población blanca de Europa y de los EE.UU. es portadora de una mutación de CFTR heterocigota.

30 Por la bibliografía es conocido que en pacientes con FQ con la mutación homocigota $\Delta F508$, la proteína CFTR no llega a la membrana plasmática de las células o se ancla de manera insuficiente en la membrana. Una proteína CFTR tal, es por ello incapaz de funcionar.

35 Por la bibliografía es conocido además, que la CFTR tiene una influencia sustancial sobre la regulación del volumen celular. En las células, en las que la función de la CFTR no está alterada, esta interviene en un mecanismo autocrino, que está dirigido por la liberación de ATP y la transmisión de la señal mediante ATP (adenosín trifosfato), a través de un canal de iones separado. Un medio hipotónico produce un flujo de agua hacia adentro de la célula. La inflamación celular resultante, activa la CFTR, que a su vez libera un transporte de ATP desde la célula hacia afuera. El ATP extracelular activa los receptores purinérgicos, que impulsan en la célula a la fosfolipasa C (PLC) para la formación de inositol trifosfato (IP_3). El inositol trifosfato aumenta la concentración intracelular de iones calcio (Ca^{2+}). Una concentración intracelular elevada de iones calcio activa los canales de potasio y cloruro, dependientes de calcio, así como los canales para osmolitos, como por ejemplo taurina. Acto seguido, los iones de potasio y cloruro salen de la célula. Debido a esta pérdida neta de sales, el agua fluye detrás de forma osmótica. Como consecuencia, la célula se contrae (Braunstein, G. B. y col. The Journal of Biological Chemistry, vol. 276, nº 9, edición del 2 de marzo, págs. 6621 a 6630, 2001). Este proceso se denomina disminución regulada del volumen, del inglés: "regulatory volumen decrease" (RVD). Se ha mostrado que los glóbulos rojos humanos después de una deformación mecánica, liberan ATP de forma dependiente de CFTR. (Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME, Lonigro AJ, "Deformation-induced ATP release from red blood cell requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity". American Journal of Physiology, 275:H1726-H1732, 1988). Se ha mostrado que en los medios hipotónicos, los glóbulos rojos de algunas especies regulan su volumen en función del ATP, sin embargo, los glóbulos rojos humanos no. (Light DS, Capes TL, Gronau RT, Adler MR. "Extracellular ATP stimulates volumen decrease in Necturus red blood cell". American Journal of Physiology, septiembre, 277 (3 pt 1):C480-91. 1999).

Métodos de diagnóstico de la fibrosis quística:

55 1) Hasta ahora, el diagnóstico de la fibrosis quística se ha llevado a cabo, entre otros métodos, a través de una prueba de sudor en la que se determina la reabsorción de cloruro dependiente de CFTR de las células epiteliales de los conductos sudoríparos, mediante la medición de la concentración de cloruro en el sudor (documento de patente nº: WO00/13713 título: "Macroscopic sweat test for cystic fibrosis). En pacientes con FQ, se encuentra un aumento de la concentración de cloruro. La prueba del sudor ofrece con frecuencia resultados poco claros. Además, es muy

larga y laboriosa y por lo tanto costosa.

2) Otros métodos son la medición de la tripsina inmunorreactiva que llega a la sangre por la insuficiencia pancreática de los pacientes con FQ (documento de Patente n°: AU 6445186. Título: "Detection of immunoreactive trypsin and cystic fibrosis using monoclonal antibody" y

5 3) la detección de un aumento del contenido en albúmina en el meconio (materia fecal infantil) de bebés (documento de Patente de EE.UU. n°: 3.902.847, título: "Diagnostic device and method for the diagnosis of mucoviscidosis (cystic fibrosis)").

4) Además, el diagnóstico de la FQ se puede realizar mediante el análisis de la secreción de las glándulas salivales y por

10 5) la medición exacta, pero compleja, y por lo tanto poco aplicada hasta el momento, del potencial transepitelial en la mucosa nasal.

6) Una posibilidad adicional para el diagnóstico de la fibrosis quística es el reconocimiento de la mutación mediante el análisis directo del gen (documento de Patente n° WO94/15216. Título: "Detection of cystic fibrosis or a gene mutation"). La investigación genética solo permite ciertamente unas conclusiones muy limitadas en relación con alteraciones funcionales. Hasta la fecha se conocen cientos de mutaciones diferentes de la CFTR, que conducen a un cuadro clínico más o menos definido. Sin embargo, en los análisis genéticos, solo se examinan aproximadamente 15 mutaciones diferentes, que causan solo un 80% de todas las enfermedades de FQ.

7) Se propuso un ensayo de FQ, en el que se tenía que medir el ATP liberado por eritrocitos mediante deformación mecánica, con un ensayo de luciferín-luciferasa. Este se basa en la observación de una relación entre CFTR y la secreción de ATP. (Verloo, P. y col., Pediatric Pulmonology, supl. 20:72 (2000)).

8) Otros métodos se basan en las diferencias entre FQ y no FQ, en la cinética de algunas enzimas, como por ejemplo, la deshidrogenasa de NADH de las mitocondrias (documento de Patente: PCT/US80/00370, título: "Cystic fibrosis detection method"), que se puede medir por ejemplo en el material homogeneizado de linfocitos.

9) La enzima hidrolasa de los pacientes con FQ muestra una cinética de inactivación más rápida que la hidrolasa de las personas sanas sometidas a ensayo, bajo determinadas condiciones de ensayo (documento de Patente de EE.UU. n° 4.469.788, título: "In vitro diagnosis of cystic fibrosis").

Los procedimientos de detección conocidos son, p. ej., costosos y tienen el inconveniente de que ofrecen poca fiabilidad y, por lo tanto, no permiten una detección fiable de la fibrosis quística en recién nacidos. El análisis genético es posible en niños recién nacidos, pero en caso de una mutación heterocigota no ofrece ninguna información sobre el alcance funcional del defecto de la CFTR. La prueba del sudor está ligada a fluctuaciones considerables. La medición de la tripsina inmunorreactiva y la medición de la albúmina en el meconio no son muy fiables.

Gracias a un diagnóstico de la fibrosis quística fiable, realizado tan pronto como sea posible, lo más eficaz en recién nacidos, un tratamiento específico desde el primer día de vida, podría mejorar la situación sanitaria de los pacientes, y aumentar claramente de este modo la esperanza de vida, ya que en este caso los cambios anatómicos graves, causados por la enfermedad, se desarrollarían con menos intensidad.

Puesto que los procedimientos convencionales no permiten un diagnóstico precoz seguro de la fibrosis quística, las enfermedades de la FQ se pueden reconocer con seguridad sólo en una fecha posterior. En la práctica clínica, los bebés se tratan especialmente con antibióticos, en caso de sospecha justificada, lo que provoca gastos y puede conducir a trastornos de la salud. En caso de mutaciones heterocigotas de FQ, es posible que la enfermedad se manifieste por primera vez con distintos grados de gravedad en la juventud o incluso más tarde, en la edad adulta, por lo que un tratamiento temprano con éxito no es posible. Además, hay cuadros clínicos, como por ejemplo determinadas enfermedades pancreáticas, que están asociados con mutaciones del gen CFTR.

Es un objeto de la invención poner a disposición un método adecuado para detectar de manera fiable y lo antes posible, las enfermedades que se basan en defectos de la CFTR, especialmente la fibrosis quísticas.

45 Este objeto se logra mediante un procedimiento de detección de acuerdo con la reivindicación 1. La identificación tiene lugar mediante la desestabilización de la regulación del volumen dependiente de CFTR, en células sanguíneas y la discriminación siguiente entre células con CFTR defectuosa o CFTR intacta. Esto es posible mediante la presentación de la lisis celular de las células con CFTR intacta.

Una célula no defectuosa es capaz de controlar y dirigir su volumen celular mediante mecanismos de interconexión, a través de la entrada y salida de iones y de agua, en condiciones fisiológicas. En las células sanguíneas no defectuosas, después de la aplicación de un medio de cloruro potásico 155 mM, el cloruro entra en la célula, entre otros, a través de la CFTR funcional. La invención se basa en la idea de inhibir la disminución regulada del volumen (RVD), influyendo, por ejemplo, mediante bloqueo de los canales dependientes de CFTR que transportan ATP, expresados en la membrana celular. Los iones de potasio y de cloruro que fluyen hacia dentro, se acumulan en la célula funcional sin defectos, que, debido a la entrada de agua acompañante, conduce a la lisis de las células sanguíneas, mien-

tras que una lisis de las células sanguíneas defectuosas que carecen del transporte hacia el interior de los iones, no se produce. Esto es especialmente el caso de las células sanguíneas con FQ, que debido al defecto de CFTR no tienen una entrada de los iones cloruro a través de la CFTR y cuya RVD es independiente de la CFTR. Por lo tanto, no se acumula ningún tipo de presión positiva en las células, las células sanguíneas con canales iónicos defectuosos, especialmente las células sanguíneas de pacientes con FQ, no sufren lisis.

Por el estado de la técnica se sabe ya que un fenotipo FQ suave se correlaciona con la funcionalidad de los canales de CFTR y esta correlación se puede demostrar por una secreción de Cl⁻. (Bronsveld Inez y col.: "Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of $\Delta F508$ homozygous twins and siblings", Journal of Clinical Investigation, vol. 108, nº 11, diciembre de 2001, 1705-1715). También es conocido que la disminución regulada del volumen defectuosa, acompañada de una CFTR defectuosa, contribuye a la patogénesis de la fibrosis quística (Reddy M. M. y col. "Effect on Anion Transport Blockers on CFTR in the Human Sweat Duct", Journal of Membrane Biology, 189, 2002, 15-25). Hasta la fecha no se había reconocido que esta relación también existe en las células sanguíneas y la determinación de la presencia de células sanguíneas con un cambio de volumen diferente, se puede utilizar para la determinación de enfermedades basadas en defectos de la CFTR.

En pacientes con fibrosis quística con una mutación homocigota $\Delta F508$, la CFTR no está en la membrana celular. En caso de mutaciones heterocigotas y otras mutaciones diferentes de $\Delta F508$, pequeñas cantidades de CFTR funcional, pueden estar en la membrana, que transportan cloruro y están involucradas en la regulación del volumen. La cantidad de moléculas de CFTR funcionales presentes en la membrana celular es inversamente proporcional a la gravedad de la enfermedad. Los análisis de sangre de personas sanas, de pacientes con fibrosis quística y de muestras de sangre tomadas de forma postnatal del cordón umbilical de recién nacidos (sangre del cordón umbilical) confirman la viabilidad y el valor informativo del procedimiento del ensayo, en el que Gd³⁺ se utiliza para el bloqueo de la regulación del volumen. La evaluación estadística de los resultados previos de una investigación con 22 pacientes con FQ y 87 voluntarios sanos y 59 recién nacidos (sangre del cordón umbilical), muestra un aumento inequívoco del grado de hemólisis después de la adición de Gd³⁺ en los voluntarios sanos y en la sangre del cordón umbilical. En los pacientes con FQ, sólo se registra un ligero aumento del grado de hemólisis después de la aplicación de Gd³⁺. Entre los 87 voluntarios sanos, 75 se identificaron como no FQ, es decir, verdaderos negativos (86%), y 12 se identificaron como FQ, es decir, falsos positivos (14%). De los 22 pacientes con FQ, 18 se identificaron como FQ, es decir, verdaderos positivos (82%), y 4 se identificaron como no FQ, es decir, falsos negativos (18%). 57 de los 59 recién nacidos se identificaron como no FQ, es decir, verdaderos negativos (97%), y dos fueron identificados como FQ, es decir, falsos positivos (3%) (Fig. 1).

Ejemplo de un procedimiento de detección para células sanguíneas, de acuerdo con la reivindicación 3:

El objetivo se logra mediante un procedimiento de detección, según la reivindicación 3, que es especialmente adecuado para el diagnóstico de enfermedades basadas en CFTR y permite el diagnóstico de células sanguíneas defectuosas, mediante la identificación de células sanguíneas no defectuosas para la lisis celular, a través de la activación (apertura) de determinados canales iónicos de las células sanguíneas no defectuosas.

La invención de acuerdo con la reivindicación 3, se basa en la idea de evocar una lisis de las células sanguíneas no defectuosas a través de la activación de ciertos canales iónicos dependientes de CFTR en las células sanguíneas no defectuosas, a través de la entrada de aniones dentro de las células no defectuosas, por ejemplo, yoduro (I⁻), bromuro (Br⁻), cloruro (Cl⁻), fluoruro (F⁻), gluconato (anión de ácido glucónico), rodanato (SCN⁻) y taurina. En las células sanguíneas defectuosas, estos canales iónicos dependientes de CFTR no existen o no son activables. Por lo tanto, el flujo de entrada de aniones, como por ejemplo: yoduro, bromuro, cloruro, fluoruro, gluconato, rodanato y taurina dentro de la célula defectuosa, no se produce. Por ello, no se puede acumular una presión elevada en la célula, las células sanguíneas defectuosas para CFTR, especialmente las células sanguíneas de pacientes con FQ, no están sujetas a lisis.

Ya que este canal iónico dependiente de CFTR en las células sanguíneas no defectuosas, permite el paso de aniones, tales como por ejemplo: yoduro, bromuro, cloruro, fluoruro, gluconato y rodanato, así como taurina, la diferenciación entre células sanguíneas defectuosas y no defectuosas también puede llevarse a cabo en soluciones 155 mM que contienen como anión yoduro, bromuro, cloruro, fluoruro, gluconato, rodanato o taurina.

Las células sanguíneas con canales iónicos defectuosos, especialmente las células sanguíneas de pacientes con FQ, no están sujetas a lisis.

La evaluación estadística de los hallazgos del estudio en 48 pacientes con FQ y 148 voluntarios sanos, así como 82 recién nacidos (sangre del cordón umbilical), muestra un aumento inequívoco del grado de hemólisis después de la adición de sDIDS, (ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico, de aquí en adelante denominado sDIDS), en los voluntarios sanos y en la sangre del cordón umbilical. En los pacientes con FQ, sólo se puede registrar un ligero aumento del grado de hemólisis después de la aplicación de sDIDS. De los 148 voluntarios sanos, 119 se identificaron como no FQ, es decir, verdaderos negativos (80,4%), y 29 fueron identificados como FQ, es decir, falsos positivos (19,6%). De los 48 pacientes con FQ, los 48 fueron identificados como FQ, es decir, verdaderos positivos (100%). De los 82 recién nacidos, 80 fueron identificados como no FQ, es decir, verdaderos negativos (97,5%), y 2 fueron identificados como FQ, es decir, falsos positivos (2,5%), (Fig. 2).

La activación de un canal iónico determinado dependiente de CFTR, que permite el paso de aniones tales como, por ejemplo: yoduro, bromuro, cloruro, fluoruro, gluconato, rodanato y taurina, es posible con una sustancia que se origina a partir de DIDS (sal sódica de ácido 4,4'-diisotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico) mediante un tratamiento especial. DIDS se disuelve en DMSO (0,1 M) y se almacena durante 4 semanas a 4°C en el refrigerador. A través de este almacenamiento de DIDS, se produce un producto de la hidrólisis de DIDS a través del agua residual que contiene DMSO. Análisis de esta solución con métodos de espectrometría de masas, muestran que, además de DIDS, también están presentes el ácido 4,4'-diamino-estilben-2,2'-disulfónico (DADS) y el ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico en la solución (Fig. 3).

Mediante una hidrólisis parcial de DIDS, se forma el ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico, H₂S y CO₂ (Fig. 4):

Sal de Na⁺ de ácido 4,4'-diisotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico (DIDS) + 2H₂O => sal de Na⁺ de ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico + H₂S + CO₂.

Del mismo modo, un almacenamiento de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico (SITS) en DMSO hidratado a 4°C, durante semanas, produce productos de hidrólisis, de modo que en una solución tal, además de SITS también se puede encontrar DADS y ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico. Mediante una hidrólisis parcial de SITS, se forma ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico y ácido acético (Fig. 5):

Ácido 4-acetamido-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico (SITS) + H₂O => ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico + ácido acético.

El ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico se denomina en la presente invención sDIDS.

También el producto de la hidrólisis parcial de la sal sódica de ácido 4,4'-diisotiocianato-dihidroestilben-2,2'-disulfónico, (H₂DIDS), se comporta como sDIDS. Se diferencia de sDIDS sólo por un enlace sencillo de los átomos de carbono entre los anillos de fenilo, en contraste con un doble enlace en sDIDS.

Sal de Na⁺ de ácido 4,4'-diisotiocianato-dihidroestilben-2,2'-disulfónico (H₂DIDS) + 2H₂O

Sal de Na⁺ de ácido 4-amino-4'-isotiocianato-dihidroestilben-2,2'-disulfónico + H₂S + CO₂

La estructura de la fórmula se muestra en la Fig. 7.

Ya en 1987 describieron Horobin, Payne y Jakobsen (Horobin RW, Payne JN, Jakobsen P, "Histochemical implications of the biological properties of SITS and some related compounds". Journal of Microscopy, abril de 1987, 146(1):87-96), que SITS y DIDS se transforman en una solución acuosa mediante hidrólisis del grupo acetamido, por ejemplo un grupo isotiocianato, en ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico. Esto ocurre a temperatura ambiente en una semana. Después de tres semanas, se ha formado el DADS a través de la hidrólisis del grupo isotiocianato restante. Con el almacenamiento de DIDS o SITS en DMSO durante varios días a temperatura ambiente, se forman polímeros mediante la reacción de los grupos isocianato con grupos amino (Fig. 6). En la bibliografía, se describe la formación de polímeros de DIDS (Schultz BD, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. "Pharmacology of CFTR chloride channel activity". Physiol Rev. Enero de 1999, 79 (1 supl): págs. 109-44. Revisión).

En los experimentos para el desarrollo del ensayo, se mostró que la reacción observada de los glóbulos rojos no se podía explicar por los mecanismos conocidos en la bibliografía. Las reacciones de las células sanguíneas sólo son explicables por la existencia de una proteína del canal, que aún no se conoce en la bibliografía. Por medio de la tecnología de fijación de membrana (en inglés, "patch-clamp"), se pudo observar la capacidad de activación reversible de una conductividad (proteína del canal) a través de sDIDS, en una línea celular de epitelio humano de las vías respiratorias, (Calu-3) con la configuración de célula completa (Fig. 8).

Con la configuración de célula completa de la tecnología de fijación de membrana, se mide la corriente transmembranal de una célula, con un potencial predeterminado. El potencial endocelular se mantuvo durante 0,5 segundos en cada caso, con valores entre -90 hasta +10 mV y se incrementó a intervalos de 10 mV (8.d). Las corrientes que se producen en una célula con este intervalo de voltaje, se presentan en 8a-8c. En 8a, se muestra la corriente de base de una célula sin tratar (testigo). Mediante el tratamiento con sDIDS, aumenta la conductividad de la membrana celular de esta célula junto con la corriente (8b). Después de eliminar sDIDS del experimento (testigo posterior), disminuye la conductividad de la membrana celular de esta célula, junto con la corriente (8c). En 8e, la corriente se representa en función del potencial aplicado, por lo que la pendiente de la curva es una medida de la conductividad.

La nueva proteína del canal permite el paso a iones, tales como por ejemplo: yoduro, bromuro, cloruro, fluoruro, gluconato, rodanato y taurina. Además, esta proteína del canal depende de CFTR, ya que en las células sanguíneas de pacientes con FQ, no se puede activar con sDIDS una conductividad de iones, tales como por ejemplo: yoduro, bromuro, cloruro, fluoruro, gluconato, rodanato y taurina.

Esta conductividad se denomina en esta memoria "canal aniónico activable con sDIDS", abreviado SDAC, y de aquí en adelante denominado SDAC.

Los análisis anteriores de la sangre de personas sanas, de pacientes con fibrosis quística y de muestras de sangre del cordón umbilical de recién nacidos (sangre del cordón umbilical), confirmaron la viabilidad fácil y el valor informativo del procedimiento del ensayo de acuerdo con la invención.

5 El procedimiento de detección de acuerdo con la invención se puede utilizar preferentemente con células sanguíneas. El uso de reticulocitos y eritrocitos jóvenes es especialmente ventajoso.

10 Los reticulocitos son las células precursoras de los glóbulos rojos, los eritrocitos. Se producen en la médula ósea y se llaman reticulocitos desde el momento en que entran en la corriente circulatoria de la sangre. Poseen orgánulos celulares y sistemas de transporte a través de la membrana. Después de aproximadamente tres días, los reticulocitos maduran y se convierten en eritrocitos jóvenes por la pérdida de sus orgánulos celulares y de una parte de sus sistemas de transporte a través de la membrana. Los eritrocitos permanecen en la circulación sanguínea aproximadamente 100 días y pierden de forma continuada durante ese tiempo, sus proteínas unidas a la membrana. Dado que los eritrocitos no tienen núcleo celular, no es posible la nueva síntesis de proteínas. La porción de reticulocitos en la sangre es de 0,4 a 2% de las células sanguíneas en adultos y hasta un 10% en recién nacidos.

15 El procedimiento según la invención que influye en la regulación del volumen de las células sanguíneas mediante el bloqueo de proteínas transmembranales o mediante la activación de canales iónicos dependientes de CFTR, produce un fuerte aumento del volumen y la lisis de células sanguíneas no defectuosas, se puede aplicar a una multiplicidad de métodos de investigación para la identificación de otros defectos de canales, tales como por ejemplo, el síndrome de Bartter. El síndrome de Bartter es una enfermedad hereditaria, perjudicial para los riñones, que puede conducir a parálisis, hiperhidratación y debilitamiento general del cuerpo.

20 En comparación con los métodos convencionales utilizados hasta la fecha, el procedimiento de detección según la invención, tiene la ventaja de que se puede utilizar de forma rápida, sencilla, con alto rendimiento de las muestras y por lo tanto rentable. El material del análisis, en forma de pequeñas cantidades de sangre del paciente, se obtiene fácilmente y se puede procesar con las instalaciones y los instrumentos comunes de un laboratorio hospitalario. Con la sangre tomada del cordón umbilical posterior al parto, se puede realizar una detección en el recién nacido sin una acción invasiva.

25 Realización preferida de acuerdo con el procedimiento 2:

De acuerdo con la invención, en primer lugar se obtienen las células sanguíneas a partir de la sangre completa por centrifugación. Las células sanguíneas se lavan una vez con una solución salina isotónica y después se suspenden de nuevo en una solución que consta de KCl 155 mM, tampón HEPES 10 mM (ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-etanosulfónico), (pH 7,4) y GdCl₃ 100 mM. Esta solución se incuba durante 60 minutos con agitación a 37°C. y a continuación se determina la hemoglobina liberada en la solución. Los reticulocitos y los eritrocitos jóvenes procedentes de la sangre de voluntarios sanos se rompen y se libera la hemoglobina, se someten a hemólisis bajo las condiciones especificadas. La hemólisis se determina mediante un examen visual y se cuantifica mediante la medición de la absorción a una longitud de onda de 546 nm. Además, también se puede realizar un recuento de reticulocitos en un frotis. De este modo, es posible que cualquier médico practicante pueda realizar el ensayo, el cual posiblemente no tenga el equipamiento de un laboratorio de hospital.

35 Mediante el uso descrito de Gd³⁺ como inhibidor de la liberación de ATP, se proporciona una sustancia química económica y de fácil manipulación. El ensayo puede proporcionar un resultado fiable al cabo de una hora. El tiempo de trabajo y los gastos de material son especialmente bajos en este caso.

40 Gracias a las condiciones del ensayo escogidas en la realización preferida del procedimiento según la invención, los iones cloruro fluyen dentro de la célula sanguínea. Las células sanguíneas sanas reaccionan al respecto con una cascada de señales autocrinas, que se inicia por la liberación de ATP dependiente de CFTR y conduce a la entrega de osmolitos. La entrada y la salida están en equilibrio. Esta liberación de ATP dependiente de CFTR se puede inhibir mediante la adición del producto químico, cloruro de gadolinio (GdCl₃), que tiene como consecuencia una acumulación de iones cloruro en la célula. Por otra parte, también se pueden utilizar otros inhibidores de esta liberación de ATP, por ejemplo, iones de lantano (La³⁺) en forma de cloruro de lantano (LaCl₃) y otros inhibidores de canales de cationes, activables por deformación (canal catiónico activable por extensión, SAC). La entrada de agua asociada con el flujo de entrada de iones conduce a la rotura de las células sanguíneas sanas. La hemólisis puede ser detectada por fotometría.

50 Realización preferida de acuerdo con el procedimiento 3:

El procedimiento de acuerdo con el procedimiento 2 se realiza de forma análoga a la realización según el procedimiento 1, sólo que las células sanguíneas se suspenden de nuevo en una solución que consta de KCl 155 mM, tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) y sDIDS 100 µM. Esta solución se incuba durante 60 minutos con agitación a 37°C y a continuación se determina la hemoglobina liberada en la solución.

55 A través de las condiciones seleccionadas de la realización preferida del procedimiento según la invención, los iones cloruro entran en las células sanguíneas no defectuosas a través del canal de aniones activado por sDIDS en la célula sanguínea. Esto conduce a la acumulación de iones cloruro en la célula sanguínea y la entrada de agua asociada con la entrada de iones, produce la rotura de la célula sanguínea sana. La hemólisis se puede detectar por

fotometría. Este procedimiento también se puede realizar con solución tamponada con HEPES 10 mM (pH 7,4), que contiene yoduro, bromuro, fluoruro, gluconato o rodanato 155 mM como anión.

La aplicación del ensayo de FQ también es posible en la sangre completa. De este modo el procedimiento del ensayo consigue otras posibilidades de aplicación, ya que se puede llevar a cabo de forma aún más sencilla y rápida.

- 5 Una ventaja particular del ensayo descrito es por primera vez la posibilidad de poder distinguir funcionalmente una proteína CFTR sana de una proteína CFTR enferma mutada, así como detectar de manera fiable mutaciones heterocigotas de CFTR, que conducen a cambios fisiológicos. En comparación con el análisis genético, el procedimiento de acuerdo con la invención es una prueba funcional, más económica y que permite un rendimiento elevado de las pruebas debido a su rápida viabilidad, que es particularmente importante para la detección.
- 10 En el contexto de la detección en un recién nacido a través del procedimiento de acuerdo con la invención, se pueden limitar por ejemplo los daños emergentes y, por lo tanto, los gastos resultantes de la fibrosis quística y se puede realizar una evaluación razonable de los riesgos para el paciente en cuestión. Mediante el diagnóstico precoz, se pueden evitar alteraciones patológicas de los pulmones y del tracto digestivo o al menos influir positivamente en su desarrollo, ya que en el primer año de vida, se observan frecuentemente complicaciones graves debidas a trastornos intestinales que con frecuencia tienen un desenlace mortal. En edades avanzadas, la muerte se produce más debido a una insuficiencia pulmonar, incluyendo insuficiencia cardíaca, debido a la sobrecarga de la circulación pulmonar. Además, una terapia adecuada, comenzada a tiempo y el evitar la administración de antibióticos inadecuados, permiten una clara mejora de la calidad de vida y, por lo tanto, un aumento de la esperanza de vida de los pacientes con FQ.
- 15
- 20 En las figuras se muestra:
- Fig. 1: Evaluación estadística de los experimentos de acuerdo con la reivindicación 2.
- Fig. 2: Evaluación estadística de los experimentos de acuerdo con la reivindicación 3.
- Fig. 3: Espectro de masas de la solución almacenada indebidamente de DIDS en DMSO (0,1 M).
- Fig. 4: Hidrólisis parcial de DIDS
- 25 Fig. 5: Hidrólisis parcial de SITS
- Fig. 6: Polimerización de DIDS y ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico
- Fig. 7: Sal disódica de ácido 4-amino-4'-isotiocianato-dihidroestilben-2,2'-disulfónico
- Fig. 8: Relación de tensión y corriente de células Calu-3, medida con la técnica de fijación de membrana con la configuración de célula completa.

30

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento *in vitro* para el diagnóstico de defectos en CFTR en una muestra de células sanguíneas que comprende las siguientes etapas:
- 5 - desestabilización de la regulación del volumen dependiente de CFTR y
- discriminación entre células que presentan un defecto de la CFTR y células con CFTR intacta, por detección de la regulación del volumen de las células sanguíneas con CFTR intacta mediante la representación de la lisis celular.
- 2.- Procedimiento para el diagnóstico de defectos de CFTR de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por la activación (apertura) o la inhibición de un canal de la membrana dependiente de CFTR.
- 10 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por una hemólisis de las células sanguíneas con CFTR intacta y por una falta de hemólisis en las células sanguíneas que presentan un defecto de la CFTR.
- 4.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por un procedimiento óptico luminoso para la cuantificación de la hemólisis.
- 15 5.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por un recuento de los reticulocitos en el frotis para el registro de la hemólisis.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el uso de un inhibidor de la liberación de ATP para inhibir la regulación del volumen.
- 20 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el uso de un inhibidor de los canales catiónicos activables por extensión (SAC).
- 8.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por el uso de Gd^{3+} como inhibidor.
- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por un agente de activación (apertura) del canal iónico dependiente de CFTR (SDAC).
- 25 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por un derivado de estilbeno como agente de activación.
- 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico del mismo como agente de activación.
- 12.- Uso de un derivado de estilbeno para activar el canal iónico dependiente de CFTR, SDAC, en células sanguíneas *in vitro*.
- 30 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 11, caracterizado por la determinación del grado de gravedad de la fibrosis quística mediante comparaciones cuantitativas.
- 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores 9-10, 13, caracterizado por el uso de ácido 4-amino-4'-isotiocianato-dihidroestilben-2,2'-disulfónico como agente de activación.
- 35 15.- Equipo de reactivos para diagnóstico que contiene ácido 4-amino-4'-isotiocianato-dihidroestilben-2,2'-disulfónico.
- 16.- Compuesto químico de fórmula general

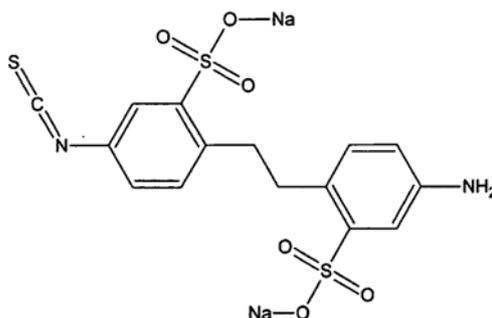


Fig. 1

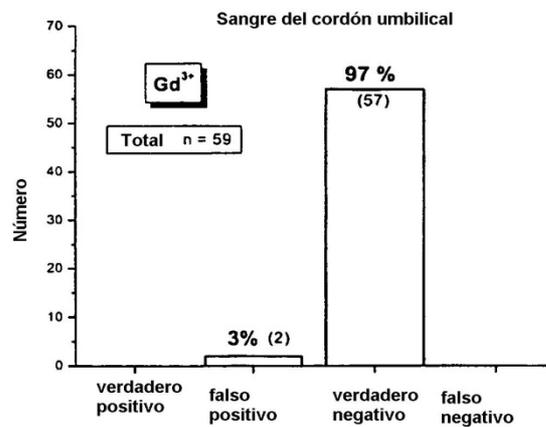
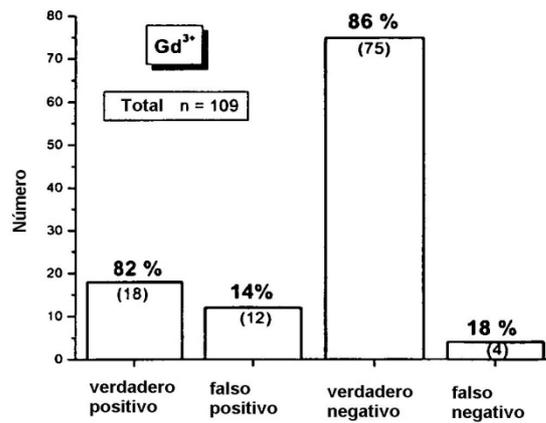
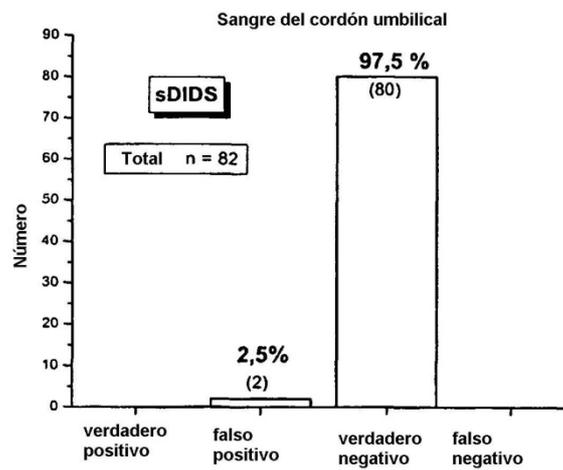
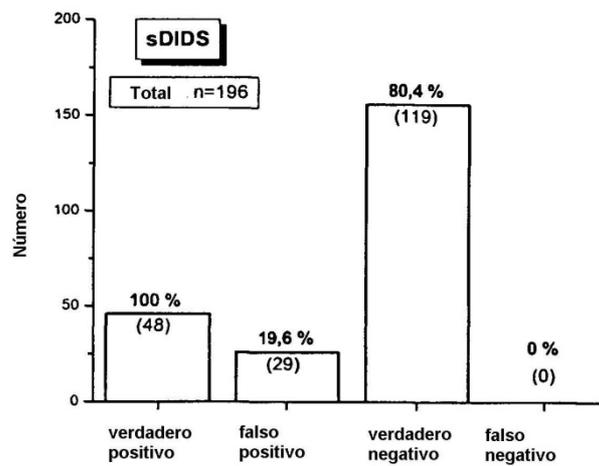


Fig. 2



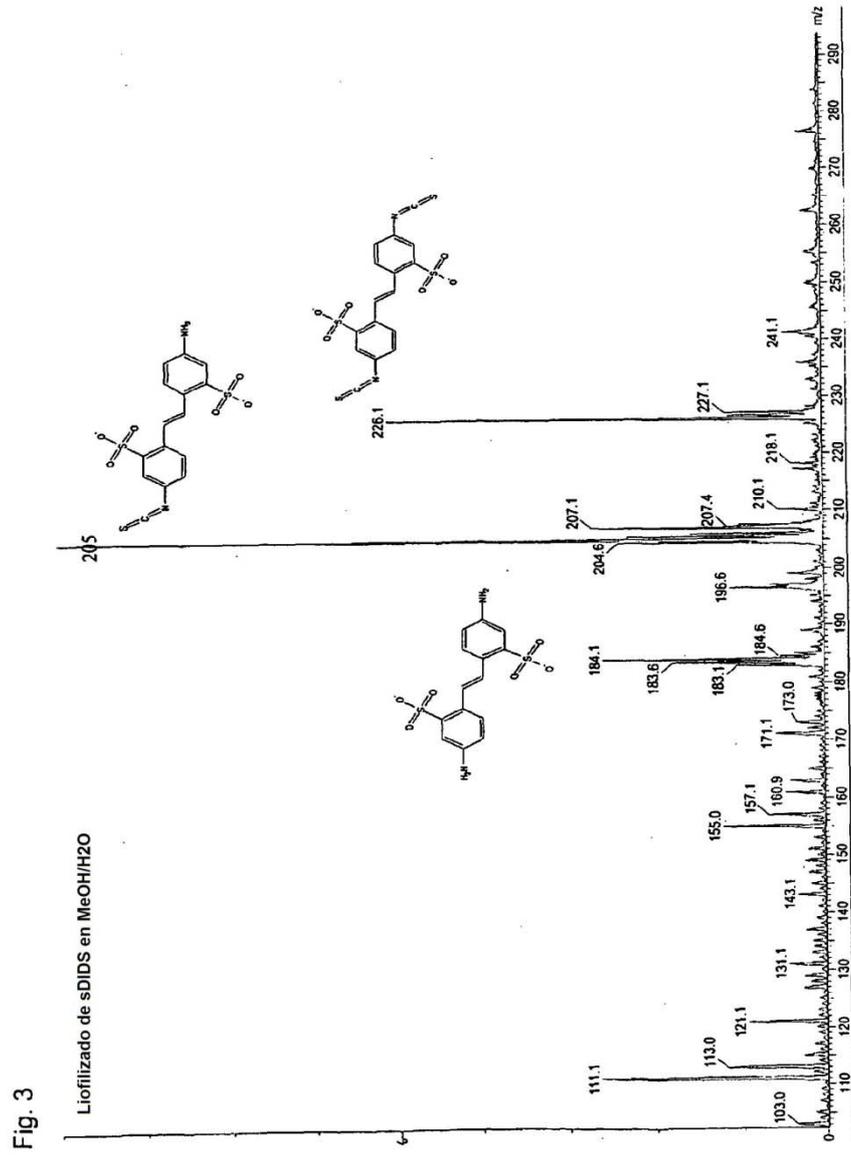
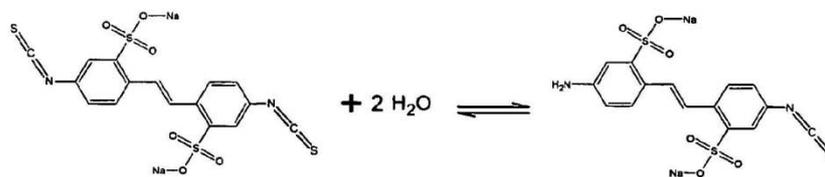


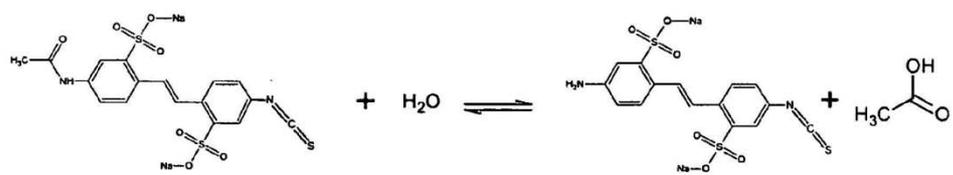
Fig. 4



Sal de Na⁺ de ácido 4,4'-diisotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico (DIDS)

Sal de Na⁺ de ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico

Fig. 5



Sal de Na⁺ de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico (SITS)

Sal de Na⁺ de ácido 4-amino-4'-isotiocianato-estilben-2,2'-disulfónico

Fig. 6

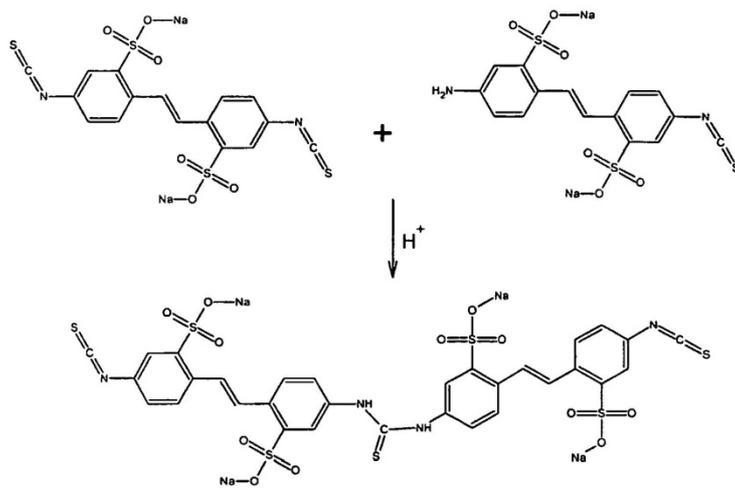


Fig. 7

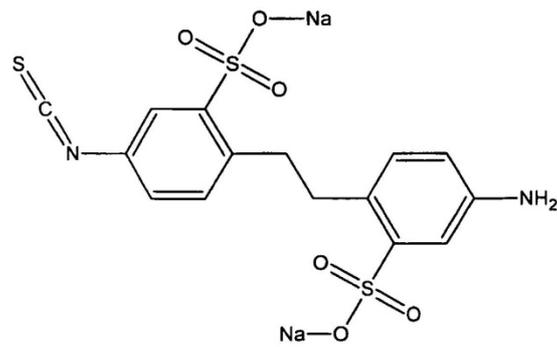


Fig. 8

