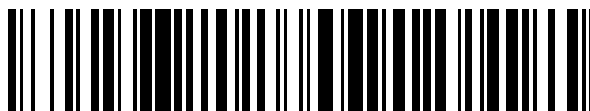


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 801**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2007** **E 10191894 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015** **EP 2352032**

54 Título: **Procedimiento para extraer anticuerpos antirreceptor de la endotelina a partir de muestras sanguíneas**

30 Prioridad:

04.08.2006 EP 06016297

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2015

73 Titular/es:

CELLTREND GMBH (100.0%)
Im Biotechnologiepark
14943 Luckenwalde, DE

72 Inventor/es:

HEIDECKE, HARALD y
SCHULZE-FORSTER, KAI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 540 801 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 extraer anticuerpos antirreceptor de la endotelina a partir de muestras sanguíneas.

5 La presente invención pertenece al ámbito biológico, químico, más particularmente, inmunológico, así como a los procedimientos *in vitro* de extracción de anticuerpos, más en particular al campo del diagnóstico del rechazo de un injerto, preeclampsia, a la que se hace asimismo referencia como toxemia, hipertensión, vasculitis, colagenosis y enfermedades reumáticas inflamatorias así como arteriosclerosis.

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
15 "tipaje tisular" en el órgano donador y receptor, de forma que se asegura lo más posible la complementación del HLA.

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
20 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
30 positiva del riesgo de una reacción de rechazo al trasplante.

La preeclampsia (denominada anteriormente toxemia) es un trastorno hipertensor del embarazo con una pérdida proteínica asociada en la orina. La identificación temprana puede prevenir la progresión a las convulsiones de la eclampsia o efectos multisistémicos del síndrome HELLP que son potencialmente fatales para la madre y el feto.

35 La preeclampsia resulta de difícil diagnóstico. La preeclampsia se diagnostica cuando mujeres embarazadas desarrollan una presión sanguínea elevada (dos lecturas separadas que se toman por lo menos seis horas espaciadas de 140/90 o más) y 300 mg de proteína en una muestra de orina de 24 horas (proteinuria), el hinchazón o edema (especialmente en las manos y la cara) se consideró inicialmente un signo importante para el diagnóstico de la preeclampsia pero en la práctica médica actual resultan únicamente necesarios para el diagnóstico la hipertensión y la proteinuria. Algunas mujeres desarrollan una presión sanguínea elevada sin proteinuria; es denominada hipertensión inducida por el embarazo (PIH) o hipertensión gestacional. Tanto la preeclampsia como la PIH son consideradas como afecciones muy graves y requieren un seguimiento minucioso de la madre y el bebé.
40

La preeclampsia es mucho más común en la primera gestación (3-5%) de los nacimientos y resulta habitualmente
45 evidente en el tercer trimestre (y virtualmente siempre tras la vigésima semana de embarazo). Resulta asimismo más común en mujeres que presentan hipertensión preexistente, diabetes, enfermedades autoinmunitarias como lupus, varias trombofilias hereditarias, como factor V Leiden o enfermedades renales en mujeres con un historial familiar de preeclampsia y en mujeres con un embarazo múltiple (gemelos, trillizos y más). Se cree que la preeclampsia es causada por una placenta implantada superficialmente que resulta hipóxica, conduciendo a
50 mediadores inflamatorios sobrerregulados, secretados por la placenta que ejecutan sobre el endotelio vascular. Si es grave, progresa a la preeclampsia fulminante, con cefaleas, trastornos visuales y dolor epigástrico y además al síndrome HELLP en la eclampsia. El desprendimiento placentario es asociado a los embarazos hipertensos. Son estados potencialmente fatales para el desarrollo del feto y de la madre.

55 A pesar de la investigación exhaustiva, la etiología y la patofisiología exactas de la enfermedad siguen confusas. Es probable, sin embargo, que la perfusión placentaria inadecuada que resulta de una invasión placentaria inadecuada precipite la liberación de alguna forma de desencadenante químico, que en madres susceptibles, conduzca al daño endotelial, a cambios metabólicos y a una forma de respuesta inflamatoria. Hasta el momento el único tratamiento conocido de la eclampsia o la preeclampsia avanzada es la administración. Por inducción de la cesárea, la
60 hipertensión puede controlarse en algunos casos con medicación antihipertensora, pero resulta desconocido cualquier efecto que puede presentar sobre la progresión de la enfermedad subyacente. En algunos casos puede estabilizarse temporalmente a las mujeres con preeclampsia o eclampsia con sulfato de magnesio intravenosamente para prevenir los ataques mientras que se administran inyecciones de esteroides para promover la maduración pulmonar fetal. A partir de 2006 el citrato de sildenafil (Viagra) se encuentra en ensayos clínicos de fase II para el
65 tratamiento de la preeclampsia.

Por lo tanto, resulta necesaria una herramienta de diagnóstico fiable y segura para el diagnóstico de la preeclampsia así como resulta necesario un medicamento para el tratamiento de la preeclampsia.

La hipertensión o la presión sanguínea elevada es una afección médica en la que se encuentra elevada de manera crónica la presión sanguínea. Aunque es denominada formalmente hipertensión arterial, la palabra "hipertensión" sin un calificador se refiere habitualmente a la hipertensión arterial. La hipertensión persistente es uno de los factores de riesgo para las apoplejías, los ataques cardíacos, la insuficiencia cardíaca y el aneurisma arterial, y es una causa que conduce a la insuficiencia renal crónica.

La presión sanguínea es una variable distribuida de manera continua, y el riesgo de enfermedad cardiovascular asociada aumenta asimismo continuamente. El punto en el que la presión sanguínea se define como hipertensión es por lo tanto de alguna manera arbitrario. Actualmente, descubrir una presión sanguínea prolongada de 140/90 mmHg o superior, medida en ambos brazos, es considerada generalmente como diagnóstico. Debido a que las lecturas de presión sanguínea en muchos individuos son muy variables -especialmente en el ámbito de los consultorios- el diagnóstico de la hipertensión debería realizarse únicamente tras apreciar una elevación media de dos o más lecturas, una, dos o más visitas al consultorio, a menos que las elevaciones sean graves o asociadas con indicios convincentes tales como la diabetes melitus, enfermedad renal crónica, insuficiencia cardíaca, posinfarto de miocardio, apoplejía y riesgo de enfermedad coronaria elevado. Recientemente, el JNC7 (el séptimo informe del Joint National Committee sobre la prevención, detección, evaluación y tratamiento de la presión sanguínea elevada ha definido la presión sanguínea de 120/80 mmHg a 139/89 mmHg como "prehipertensión". La prehipertensión no es una categoría patológica; más bien es una denominación seleccionada para identificar a los individuos con un riesgo elevado de desarrollar hipertensión. Debido a que el diagnóstico de la hipertensión resulta difícil, resulta necesario una herramienta adicional para el diagnóstico de la hipertensión. Asimismo, resulta necesario un medicamento para el tratamiento de la hipertensión.

En medicina, la vasculitis (plural: vasculitis) es un grupo de enfermedades que presentan inflamación en la pared de los vasos sanguíneos debido a la migración leucocitaria y que provoca daños. Aunque la mayoría de las vasculitis son raras, afectan generalmente a varios sistemas orgánicos y pueden provocar una incapacidad grave. Las vasculitis son clasificadas dentro de la vasculitis de vasos grandes tales como la arteritis de Takayasu y la arteritis (temporal) de células gigantes. Además, la vasculitis de vasos medios, tales como la poliarteritis nodular y la enfermedad de Kawasaki. La vasculitis de vasos pequeños tal como la arteritis de Churg-Strauss, la granulomatosis de Wegener y la vasculitis con hipersensibilidad.

Los pacientes presentan habitualmente síntomas sistémicos con una disfunción mono- o multiorgánica. Las quejas comunes (e inespecíficas) comprenden fatiga, debilidad, fiebre, artralgia, dolor abdominal, hipertensión, insuficiencia renal, una disfunción neurológica. Los síntomas siguientes deberían levantar una sólida sospecha de vasculitis, sin embargo, el diagnóstico resulta difícil. Estos síntomas son la mononeuritis múltiple, púrpura palpable y pulmonal-renal.

Como historial detallado resulta importante obtener información sobre medicaciones recientes, cualquier riesgo de infección por hepatitis o cualquier diagnóstico reciente con un trastorno de tejido conjuntivo tal como lupus sistémico eritematoso (SLE). El diagnóstico puede incluir una prueba de anticuerpos antinucleares (ANA) que detecta un trastorno de tejido conjuntivo subyacente, especialmente SLE. El diagnóstico puede incluir asimismo un anticuerpo citoplásmico antineutrófilos (ANCA) que puede sugerir granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodular, el síndrome de Churg-Strauss o la vasculitis inducida por fármacos, pero no es un diagnóstico. La única manera segura de diagnosticar la vasculitis es una biopsia tisular que en la actualidad es el "método de referencia" de diagnóstico.

Por lo tanto, resulta necesaria una herramienta de diagnóstico para el diagnóstico de la vasculitis. Además, resulta necesario un medicamento para el tratamiento de la vasculitis.

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.

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.

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.

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.

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 arterioesclerosis es una enfermedad que afecta a los vasos sanguíneos arteriales. Es causada por la formación de múltiples placas en el interior de la arteria.

Las zonas de estrechamiento grave, estenosis, detectables mediante angiografía, y en menor extensión "prueba de esfuerzo" han sido durante mucho tiempo el objetivo de las técnicas de diagnóstico humanas para las enfermedades cardiovasculares en general. Como se ha demostrado mediante estudios clínicos humanos, la mayoría de los episodios graves se producen en ubicaciones con una placa pesada, pero se produce de manera repentina un estrechamiento pequeño o sin luz presente antes de los episodios debilitantes. La ruptura de la placa puede conducir a la oclusión de la luz arterial entre segundos y minutos y a una debilidad permanente potencial y en algunas ocasiones a la muerte súbita. La estenosis de luz de 77% acostumbra a ser considerada por los cardiólogos como el indicio de enfermedad significativa clínicamente debido a que es únicamente en esta gravedad de estrechamiento de las arterias cardíacas de gran tamaño que los episodios recurrentes de angina de pecho y anomalías detectables pueden apreciarse mediante métodos de pruebas de esfuerzo. Sin embargo, los ensayos clínicos muestran que únicamente aproximadamente 14% de los episodios debilitantes clínicamente se producen en ubicaciones con esta gravedad, o mayor, de estrechamiento. La mayoría de episodios se produce debido a la ruptura de placas de arteroma en zonas sin suficiente estrechamiento para producir cualquier anomalía de prueba de esfuerzo o angina de pecho. Por lo tanto, existe una gran necesidad de un procedimiento de diagnóstico para el diagnóstico de la arterioesclerosis. Existen algunos diferentes tipos de arterioesclerosis. La arterioesclerosis, tal como arterioesclerosis coronaria, arterioesclerosis cerebral tal como apoplejía y encefalomalacia, nefroesclerosis diabética y nefroesclerosis maligna infantil y arterioesclerosis de Mönckeberg.

La presente invención afronta la necesidad de una herramienta para la extracción de anticuerpos de sangre aislada junto con la familia de enfermedades mencionadas anteriormente, por ejemplo, para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la extracción de anticuerpos antirreceptor de la endotelina a partir de sangre aislada, (a) en el que en una primera etapa la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina es determinada en una muestra sanguínea a partir de un paciente que debe

diagnosticarse, en el que se cree que el paciente presenta una enfermedad seleccionada de entre el grupo de rechazo al injerto, preeclampsia, hipertensión, vasculitis, colagenosis, una enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerorisis, y (b) en el que al determinar la presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina en la muestra sanguínea del paciente el anticuerpo antirreceptor de la endotelina es extraído de la sangre aislada de dicho paciente.

Es divulgado además un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad, en el que la presencia o ausencia del anticuerpo antirreceptor de la endotelina es determinada en una muestra a partir de un paciente que se debe diagnosticar. La presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina es un indicio de la enfermedad.

En una forma de realización preferida de la invención el anticuerpo antirreceptor de la endotelina es un anticuerpo antirreceptor de la endotelina A. Según la invención la enfermedad es seleccionada de entre el grupo de diabetes, rechazo al injerto, preeclampsia, a la que se hace referencia asimismo como toxemia, hipertensión, vasculitis, colagenosis y enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerorisis.

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 antiendotelina 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.

Es divulgado en la presente memoria asimismo 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.

Es divulgada además 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.

Es divulgado asimismo un kit de investigación y/o diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad seleccionada a partir del grupo de diabetes, rechazo del injerto, preeclampsia a la que se hace referencia asimismo como toxemia, hipertensión, vasculitis, colagenosis y enfermedades reumáticas inflamatorias así como arteriosclerosis, en el que el kit incluye un péptido receptor de la endotelina o su análogo funcional.

Es divulgada asimismo la utilización de un inhibidor de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina o un inhibidor de un receptor de la endotelina para la producción de un medicamento, siendo en un aspecto el anticuerpo antirreceptor de la endotelina 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 antiendotelina. El mismo anticuerpo de la antiendotelina puede detectarse sólo en el 6,2% de los casos, en pacientes sin rechazo.

De este modo, la presente divulgación 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.

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, la enfermedad preeclampsia a la que se hace referencia asimismo como toxemia, hipertensión, vasculitis, colagenosis, y enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerorisis. En estudios citobiológicos e inmunohistoquímicos, así como investigando materiales biopsicos, 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 preeclampsia, 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 delección 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 es sangre. 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 o animales, independientemente de si presentan 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 injerto, preeclampsia, a la que se hace referencia asimismo como toxemia, hipertensión, vasculitis, colagenosis, una enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerosis.

Una "reacción inmunitaria" 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 inmunitaria 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, el anticuerpo antirreceptor de la endotelina determinado en la muestra sanguínea es un anticuerpo antirreceptor de la endotelina A.

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.

5 Según la invención, la enfermedad se selecciona del grupo del rechazo del injerto, preeclampsia, a la que se hace referencia asimismo como toxemia, hipertensión, vasculitis, collagenosis, una enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerosis.

10 En una forma de realización preferida la diabetes es la diabetes de tipo I.

En una forma de realización preferida la collagenosis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo de lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome de CREST y síndrome de SHARP.

15 En una forma de realización muy preferida la collagenosis es una enfermedad seleccionada de entre esclerosis generalizada y artritis reumatoide.

20 En una forma de realización preferida la enfermedad reumática inflamatoria es seleccionada de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis generalizada progresiva, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso generalizado, síndrome de Raynaud (Morbus Raynaud) e inflamación articular.

25 En una forma de realización muy preferida la enfermedad reumática inflamatoria es seleccionada de entre esclerosis generalizada, síndrome de Raynaud (Morbus Raynaud) y artritis reumatoide.

30 En una forma de realización preferida la hipertensión es seleccionada de entre el grupo de hipertensión arterial de origen suprarrenal, hipertensión arterial, hipertensión aterosclerótica, hipertensión endocrina, hipertensión esencial, hipertensión fija, hipertensión cardiovascular, hipertensión maligna, hipertensión lábil, hipertensión neurógena, hipertensión paroxística, hipertensión portal, hipertensión pulmonar, hipertensión renal e hipertensión secundaria.

En una forma de realización muy preferida la hipertensión es seleccionada de entre hipertensión maligna.

35 Además, en una forma de realización preferida la arterioesclerosis es seleccionada de entre el grupo de arterioesclerosis central, arterioesclerosis coronaria, arterioesclerosis cerebral tal como apoplejía y encefalomalacia, nefroesclerosis tal como nefroesclerosis diabética y nefroesclerosis maligna infantil, y arterioesclerosis de Mönckeberg.

40 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.

45 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.

50 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.

55 "Inmunoensayos" según la invención, son ensayos que utilizan la interacción específica entre el receptor endotelico 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.

60 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 (3) midiendo la respuesta. Así para la reacción anticuerpo antirreceptor de la endotelina/receptor de la endotelina son posibles varias configuraciones, por ejemplo (a) precipitación de una reacción con un exceso 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.

65

Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo para los anticuerpos antirreceptores de la endotelina, mediante a) utilización de receptores-endotelina/péptidos en exceso 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 o 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 microfluído. 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, en 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 divulga 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, preeclampsia, a la que se hace referencia asimismo como toxemia, hipertensión, vasculitis, collagenosis, y enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerosis.

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

Además, en una forma de realización preferida en la utilización según la invención, la collagenosis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo de lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome de CREST y síndrome de SHARP. La enfermedad reumática inflamatoria es seleccionada de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis generalizada progresiva, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso generalizado e inflamación articular. La hipertensión es seleccionada de entre el grupo de hipertensión arterial de origen suprarrenal, hipertensión arterial, hipertensión aterosclerótica, hipertensión endocrina, hipertensión esencial, hipertensión fija, hipertensión cardiovascular, hipertensión maligna, hipertensión lábil, hipertensión neurógena, hipertensión paroxística, hipertensión portal, hipertensión pulmonar, hipertensión renal e hipertensión secundaria. La arterioesclerosis es seleccionada de entre el grupo de arterioesclerosis central, arterioesclerosis coronaria, arterioesclerosis cerebral tal como apoplejía y encefalomalacia, nefroesclerosis tal como nefroesclerosis diabética y nefroesclerosis maligna infantil y arterioesclerosis de Mönckenberg.

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.

En una forma de realización preferida el kit diagnóstico y/o de investigación divulgado en la presente memoria está destinado al diagnóstico de la diabetes, preferentemente la diabetes de tipo I, una enfermedad collagenótica seleccionada de entre el grupo de lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome de CREST y síndrome de SHARP, la enfermedad reumática inflamatoria es seleccionada de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis generalizada progresiva, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso generalizado e inflamación articular, la hipertensión es seleccionada de entre el grupo de hipertensión arterial de origen suprarrenal, hipertensión arterial, hipertensión aterosclerótica, hipertensión endocrina, hipertensión esencial, hipertensión fija, hipertensión cardiovascular, hipertensión maligna, hipertensión lábil, hipertensión neurógena, hipertensión paroxística, hipertensión portal, hipertensión pulmonar, hipertensión renal e hipertensión secundaria, y la arterioesclerosis es seleccionada de entre el grupo de arterioesclerosis central, arterioesclerosis coronaria, arterioesclerosis cerebral tal como apoplejía y encefalomalacia, nefroesclerosis tal como

nefroesclerosis diabética y nefroesclerosis maligna infantil y arterioesclerosis de Mönckenberg.

El kit de ensayo inmunológico divulgado en la presente memoria 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.

Resulta ventajoso que el kit de ensayo sea 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 divulgado en la presente memoria, 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 divulgado en la presente memoria 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.

Son divulgados asimismo un inhibidor de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina y un inhibidor de un receptor de la endotelina para la producción de un medicamento. La divulgación se refiere a la utilización de un inhibidor del receptor de la endotelina para la producción de un medicamento, en la que el receptor de la endotelina es un receptor de la endotelina A.

El término "inhibidor" hace referencia a un agente que se une al receptor pero que no provoca la respuesta biológica normal. Por ejemplo, un inhibidor puede ser cualquier molécula que, cuando se une al receptor de la endotelina, disminuye la actividad de o reduce los niveles de expresión del receptor de la endotelina.

El medicamento puede utilizarse para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo de rechazo al injerto, preeclampsia, a la que se hace referencia como toxemia, hipertensión, vasculitis, colagenosis, una enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerosis.

La colagenosis puede ser una enfermedad seleccionada de entre el grupo de lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome de CREST y síndrome de SHARP, la enfermedad reumática inflamatoria es seleccionada de entre el grupo de síndrome de Raynaud (Morbus Raynaud), artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis generalizada progresiva, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso generalizado e inflamación articular, la hipertensión es seleccionada de entre el grupo de hipertensión arterial de origen suprarrenal, hipertensión arterial, hipertensión aterosclerótica, hipertensión endocrina, hipertensión esencial, hipertensión fija, hipertensión cardiovascular, hipertensión maligna, hipertensión lábil, hipertensión neurógena, hipertensión paroxística, hipertensión portal, hipertensión pulmonar, hipertensión renal e hipertensión secundaria, y la arterioesclerosis es seleccionada de entre el grupo de arterioesclerosis central, arterioesclerosis coronaria, arterioesclerosis cerebral tal como apoplejía y encefalomalacia, nefroesclerosis tal como nefroesclerosis diabética y nefroesclerosis maligna infantil y arterioesclerosis de Mönckenberg.

El inhibidor del receptor de la endotelina puede ser seleccionado de entre el grupo

- (i) bosentan (4-terc-butil-N-[6-(2-hidroxi-etoxi)-5(2-metoxi-fenoxi)-2,2'-bipirimidin-4-il]-bencenosulfonamida),
- (ii) BQ788 (N-cis-2,6-dimetilpiperidincarbonilo-L-.gamma.-metilleucil-D-1-metoxi-carbonilriptofanil-D-norleucina),
- (iii) IRL1083,

(iv) RES7011,

(v) RES7013,

5 (vi) PD142983,

(vii) IRL2500,

10 (viii) R0468443,

(ix) A192621,

(x) BQ-778 (N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L- γ -metilleucil-D-1-metoxycarbonil-triptofanil-D-norleucina),

15 (xi) SB209670,

(xii) sitaxsentano,

20 (xiii) trans, ácido trans-2(4-metoxidenil)-4-(1,3-benzodiazol-5-il)-1-(dibutilaminocarbonilmetil)-pirrolidina-3-carboxílico (ZD4054)

(xiv) SB 209670

(xv) L-754,142

25 (xvi) IRL-1620

(xvii) BMS-182874

30 (xviii) un inhibidor de la enzima de conversión de la endotelina (ECE) tal como CGS26303 y fosforamidón,

(xviv) una molécula antisentido dirigida contra el receptor de la endotelina,

(xv) anticuerpos contra el receptor de la endotelina y

35 (xvvi) una molécula de ácidos nucleicos que resulta en el silenciamiento de la actividad del receptor de la endotelina B a través de ARNi tal como ARNbc.

40 Preferentemente, el inhibidor del receptor de la endotelina resulta específico para el receptor de la endotelina A es un grupo selectivo de sitaxsentano y trans, ácido trans-2(4-metoxidenil)-4-(1,3-benzodiazol-5-il)-1-(dibutilaminocarbonilmetil)-pirrolidina-3-carboxílico (ZD4054).

La invención divulga asimismo inhibidores del anticuerpo antirreceptor de la endotelina tal como anticuerpos y moléculas antisentido.

45 La invención se refiere a un procedimiento para la extracción de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina a partir de sangre aislada. Según este procedimiento en una primera etapa se determina la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina en una muestra sanguínea de un paciente que deben diagnosticarse en el que, el paciente se cree que presenta una enfermedad seleccionada de entre el grupo de rechazo al injerto, preeclampsia, hipertensión, vasculitis, colagenosis, una enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerosis, y en el que en una segunda etapa al determinar la presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina se somete la sangre aislada del paciente a plasmáfesis. Esta plasmáfesis está destinada a extraer el anticuerpo antirreceptor de la endotelina de dicha sangre aislada. El procedimiento de plasmáfesis es conocido por el experto en la materia.

55 La invención se refiere asimismo a la utilización de la plasmáfesis para el aislamiento de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina a partir de sangre.

60 Ejemplos

Ejemplo I: ELISA del receptor de la endotelina

65 Una placa de microtitulación apropiada revestida con una estreptavidina se carga con el péptido biotinilado que codifica el receptor endotelina. Entonces 100 μ l de una solución por pocillo en la placa de microtitulación se incuba con 5 μ l/ml en un tampón de dilución apropiada. Para medir la unión no específica, los pocillos se rellenan también con 100 μ l 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).

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.

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.

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

Ejemplo III

La invención se refiere 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, preeclampsia, 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.

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.

5 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 cardíaca 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-Meier 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

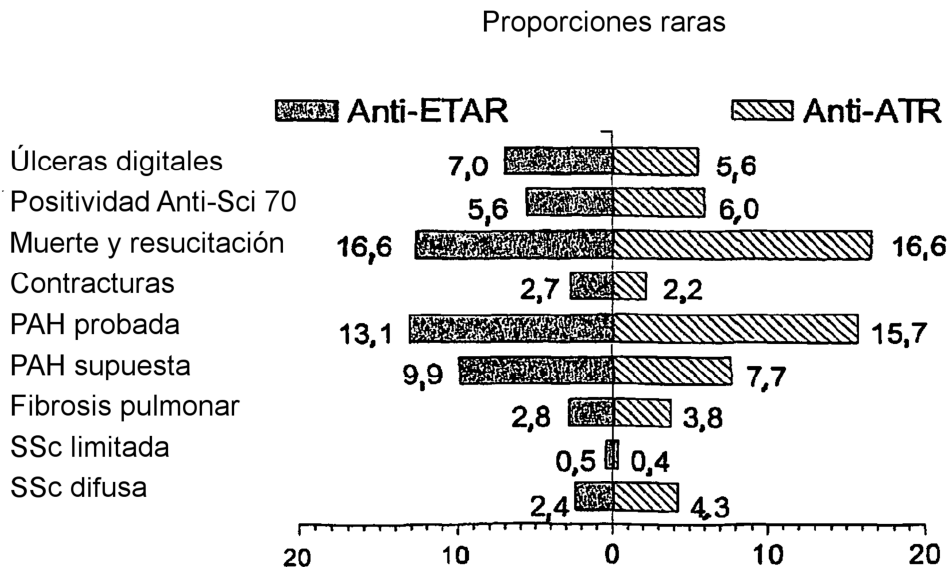
implicaciones orgánicas individuales. Los datos miográficos de los pequeños vasos se analizaron por ANOVA. Se consideró significativo un valor P inferior a 0,05. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ SEM, estando n relacionado con el número de los segmentos anulares arteriales pulmonares estudiados.

5 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 ($P < 0,001$, $r^2 = 0,75$, 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.

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



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).

25 Valor predictivo

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 ($N = 4$).

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 ($P < 0,001$).

Leyendas de las Figuras

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.

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 EP/1 BLN

<150> 04.08.2006

<151> EP 06 01 6297.1

<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

1. Procedimiento *in vitro* para la extracción de anticuerpos antirreceptor de la endotelina a partir de sangre aislada,
 - 5 a. en el que en la primera etapa es determinada la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina en una muestra sanguínea de un paciente que debe diagnosticarse, en el que se cree que el paciente presenta una enfermedad seleccionada de entre el grupo de rechazo a un injerto, preeclampsia, hipertensión, vasculitis, colagenosis, una enfermedad reumática inflamatoria y arterioesclerosis,
 - 10 b. en el que al determinar la presencia de un anticuerpo antirreceptor de la endotelina en la muestra sanguínea del paciente el anticuerpo antirreceptor de la endotelina es extraído de la sangre aislada de dicho paciente.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo antirreceptor de la endotelina es un anticuerpo antirreceptor de la endotelina A.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que
 - a. la colagenosis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo de lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome de CREST y síndrome de SHARP,
 - 20 b. la enfermedad reumática inflamatoria es seleccionada de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis generalizada progresiva, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso generalizado, síndrome de Raynaud (Morbus Raynaud) e inflamación articular,
 - 25 c. la hipertensión es seleccionada de entre el grupo de hipertensión arterial de origen suprarrenal, hipertensión arterial, hipertensión aterosclerótica, hipertensión endocrina, hipertensión esencial, hipertensión fija, hipertensión cardiovascular, hipertensión maligna, hipertensión lábil, hipertensión neurógena, hipertensión paroxística, hipertensión portal, hipertensión pulmonar, hipertensión renal e hipertensión secundaria, y
 - 30 d. la arterioesclerosis es seleccionada de entre el grupo de arterioesclerosis central, arterioesclerosis coronaria, arterioesclerosis cerebral tal como apoplejía y encefalomalacia, nefroesclerosis tal como nefroesclerosis diabética y nefroesclerosis maligna infantil y arterioesclerosis de Mönckeberg.
- 35 4. Procedimiento según la reivindicación 1 a 3, en el que los anticuerpos antirreceptor de la endotelina que se deben determinar en la etapa a) son seleccionados de entre el grupo de anticuerpo IgA, anticuerpo IgG y anticuerpo IgM.
- 40 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que los anticuerpos que se deben determinar en la etapa a) son seleccionados de entre el grupo de IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

Fig. 1 A

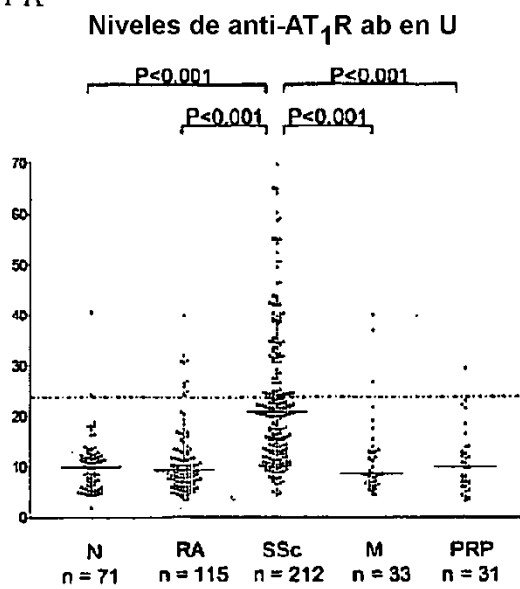


Fig. 1 B

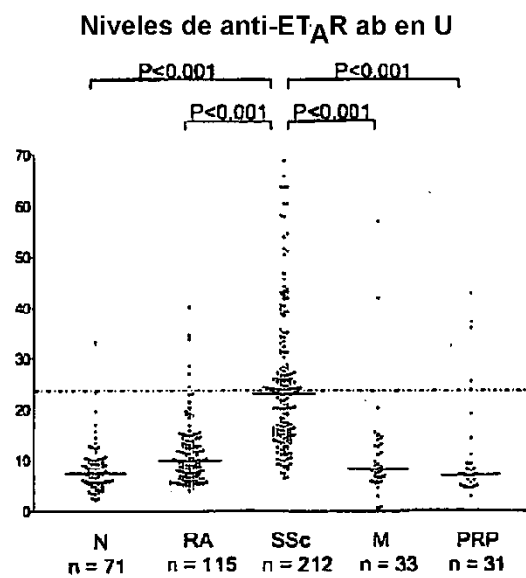


Fig. 2

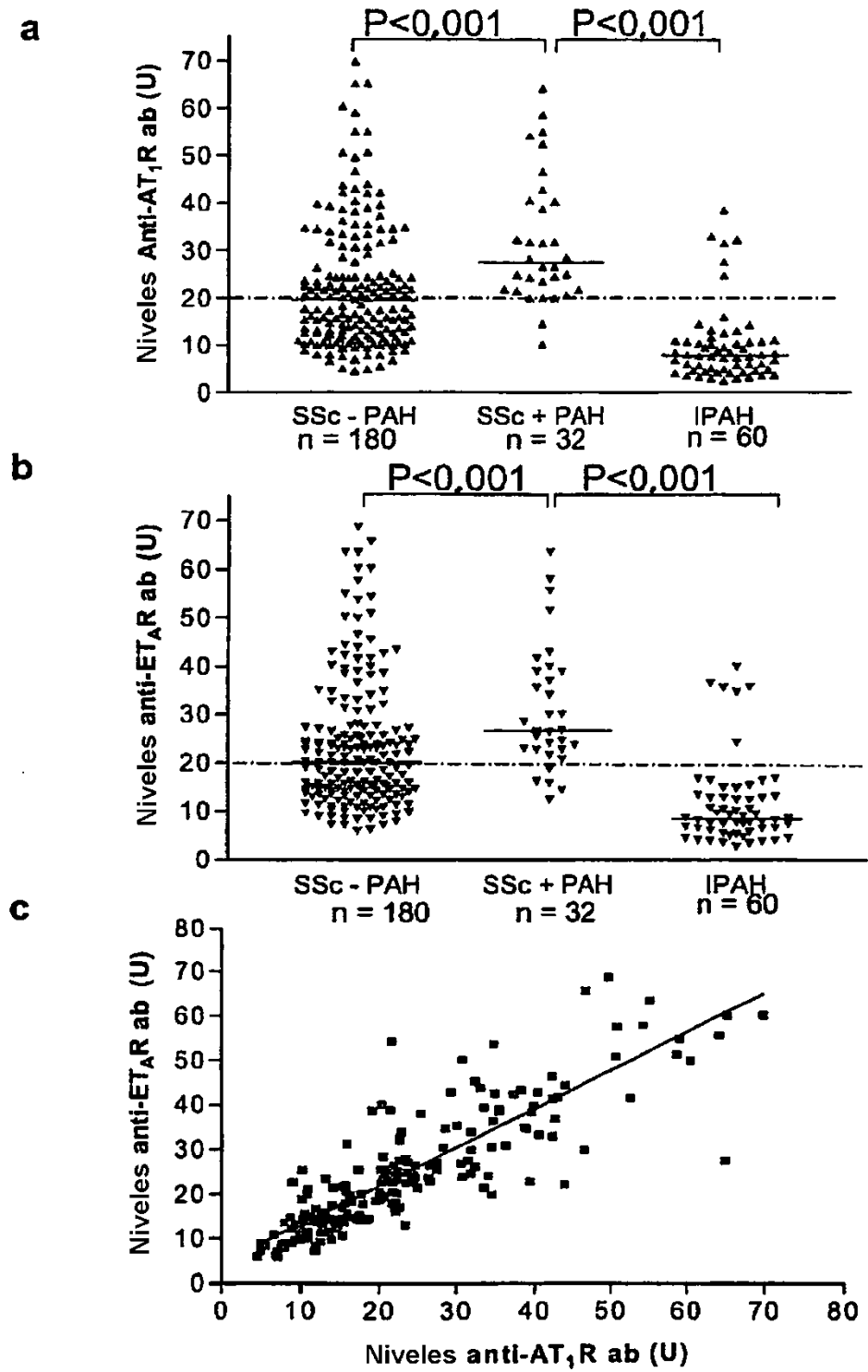


Fig. 3

