

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 381**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2015 PCT/IB2015/054082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15186037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2015 E 15731117 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3152327**

54 Título: **Biomarcador de hipertensión pulmonar**

30 Prioridad:

03.06.2014 EP 14170962

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

10.03.2020

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

ROWLANDS, MARIANNA;

TESSIER, CLEMENCE ANNE JEANNE MARIE y

WHITTAKER, PAUL ANDREW

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 747 381 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

Biomarcador de hipertensión pulmonar

5 Campo de la invención

La invención se encuentra en el campo de los biomarcadores en una enfermedad respiratoria. En particular, se refiere al uso de la expresión de CCL21 como un biomarcador para la hipertensión pulmonar.

10 Antecedentes de la invención

15 La hipertensión pulmonar es una enfermedad progresiva con orígenes diversos que se asocia con un mal pronóstico y da como resultado una disfunción cardíaca del lado derecho. En todas sus variantes de presentación, se estima que esta enfermedad afecta a hasta 100 millones de personas en todo el mundo¹. De acuerdo con la clasificación actual de la hipertensión pulmonar, que se acordó en el 4.^º Simposio Mundial sobre Hipertensión pulmonar en 2008, existen cinco categorías de hipertensión pulmonar crónica.

20 La hipertensión pulmonar (HP) se define como un aumento promedio en la presión arterial pulmonar >25 mmHg en reposo (>30 mmHg después del ejercicio). La HP del Grupo 1 se puede subdividir adicionalmente en enfermedades en las cuales la resistencia vascular pulmonar aumentada se debe a una microangiopatía precapilar (diagnosticada como presión de enclavamiento precapilar <15mmHg). Dentro de este grupo se encuentran la hipertensión arterial pulmonar idiopática (HAPI) y la hipertensión arterial pulmonar familiar, la hipertensión arterial pulmonar asociada, la hipertensión arterial pulmonar con implicación venosa/capilar y la hipertensión pulmonar persistente del neonato. El Grupo 2 incluye la hipertensión pulmonar debida a las enfermedades cardíacas del lado izquierdo, mientras que el Grupo 3 incluye la hipertensión pulmonar asociada con hipoxemia/enfermedad pulmonar (p. ej., COPD) y el Grupo 4 la hipertensión pulmonar asociada con trastornos tromboembólicos crónicos².

30 A pesar de los avances para entender la patobiología subyacente de la hipertensión pulmonar y algunas mejoras en el diagnóstico y el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos, existe aún una necesidad médica significativa no satisfecha y tasas inaceptables de morbilidad y mortalidad en todo el espectro de hipertensión pulmonar.

35 Las subcategorías de la hipertensión pulmonar difieren en sus causas subyacentes. Sin embargo, todas se caracterizan por una vasoconstricción pulmonar excesiva y lesiones plexiformes singulares de remodelación vascular anormal. La disfunción endotelial asociada con la inflamación y el estrés oxidativo y la proliferación de células de músculo liso (SMC) vasculares son características prominentes de la hipertensión arterial pulmonar³⁻⁵. Estos cambios estructurales sugieren un cambio desde un estado inactivo a un fenotipo celular proliferativo resistente a la apoptosis^{6,7}. La remodelación vascular da lugar a una elevación crónica de la resistencia vascular pulmonar, insuficiencia cardíaca del lado derecho y a la muerte.

40 Varios estudios han sugerido también un papel de los mecanismos inmunitarios en la patofisiología de la hipertensión arterial⁸. Se han detectado células inflamatorias y una producción de quimiocinas intensa dentro de las arterias pulmonares remodeladas y se ha mostrado que las células estromales vasculares son sensibles a estímulos inflamatorios⁹. Además, se han medido niveles de citocinas circulantes elevados en la HAPI^{10,11}. Hasta un tercio de los pacientes con hipertensión arterial pulmonar poseen autoanticuerpos circulantes contra varios autoantígenos vasculares^{12,13}. Esto sugiere que el sistema inmunitario adaptativo, que consta de linfocitos T y B, está implicado, y de hecho se han detectado linfocitos T y B perivasculares en las lesiones por hipertensión arterial pulmonar vascular pulmonares¹⁴. El trabajo sobre trastornos inflamatorios crónicos y enfermedades autoinmunitarias sugiere que también se pueden haber generado linfocitos T y anticuerpos patógenos localmente, en el órgano diana, en folículos linfoides ectópicos muy organizados denominados normalmente tejidos linfoides terciarios (tLT)¹⁵. El papel de los tLT en las enfermedades pulmonares crónicas está cobrando importancia, especialmente en las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas¹⁶, en la fibrosis pulmonar idiopática¹⁷ y en la bronquiolitis obliterante¹⁸ y, más recientemente, en la hipertensión arterial pulmonar¹⁹. La formación ectópica de tejido linfoide secundario se inicia mediante la atracción local de linfocitos T y B inmaduros. Por tanto, la producción local de quimiocinas homeostáticas y factores de supervivencia de linfocitos tales como CCL21, que atraen células que expresan CCR7 tales como CD maduras, linfocitos T inmaduros y linfocitos B²⁰, puede ser un evento crítico en la formación de tejido linfoide ectópico. La expresión de CCL21, en particular, se ha detectado recientemente en tLT en pulmones explantados de pacientes con HAPI^{19, 26}.

60 Además, también se ha descrito en la técnica el diagnóstico de HAP mediante la detección de los niveles de expresión de marcadores particulares en muestras biológicas²⁷.

Las directrices actuales recomiendan el uso del péptido natriurético cerebral (PNC) o el fragmento N terminal del pro-PNC (NT-proPNC) como biomarcadores para la estratificación del riesgo de mortalidad. Los péptidos natriuréticos fueron los primeros marcadores de origen sanguíneo de la hipertensión pulmonar. Nagaya *et al* fueron los primeros

en mostrar que los niveles plasmáticos de PNC tienen un significado diagnóstico en la hipertensión pulmonar²¹. Los niveles de PNC predecían la mortalidad en pacientes adultos con enfermedad cardíaca congénita sintomática²², y el PNC también era un indicador independiente de la respuesta a la terapia. En un estudio retrospectivo en los pacientes con hipertensión arterial pulmonar, las medidas seriadas de NT-proPNC (un subproducto de la síntesis de PNC) se asociaron con la supervivencia²³. La transformación logarítmica de los valores de NT-proPNC identificó a los pacientes con hipertensión arterial pulmonar que se encontraban en riesgo de padecer eventos adversos con una especificidad de un 98% y una sensibilidad de un 60%²⁴.

Sin embargo, PNC o NT-proPNC, son marcadores de tensión del miocardio, estiramiento excesivo del corazón y una mayor frecuencia cardíaca y no reflejan directamente cambios en las arterias pulmonares distales en el pulmón, que son responsables de estimular la patofisiología de la hipertensión pulmonar. Se cree que una remodelación de las arterias pulmonares va seguida de cambios de remodelación en el corazón y el ventrículo derecho específicamente. Por tanto, esto es de crucial interés para evaluar y monitorizar la remodelación de las arterias pulmonares utilizando biomarcadores circulantes no invasivos sustitutos antes de que el efecto se pueda visualizar en el lado derecho del corazón como resultado de la progresión de la enfermedad.

Los biomarcadores que indican específicamente el mecanismo patológico, la gravedad de la enfermedad o la respuesta al tratamiento serían herramientas ideales para la gestión de la hipertensión pulmonar y también facilitarían la ejecución con éxito de futuros ensayos clínicos.

Compendio de la invención

Se ha descubierto recientemente que el CCL21 es un biomarcador muy específico y sensible para diferenciar a los pacientes de hipertensión pulmonar de controles equiparados.

Por lo tanto, la invención contempla un método para determinar si un sujeto tiene hipertensión pulmonar, que comprende

- a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;
- b) comparar la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 con un valor basal que sea indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar;

donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar.

La invención también contempla un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

- a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; y
- b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar.

En algunas realizaciones de estos aspectos, el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de CCL21 tal como un ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) de CCL21 o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) o un fragmento de este. En algunas realizaciones diferentes, el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína CCL21 o un fragmento de este.

En algunas realizaciones diferentes de estos aspectos el paso de ensayo comprende una técnica seleccionada entre análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), ensayos basados en TaqMan, secuenciación directa, hibridación aleloespecífica dinámica, ensayos de extensión de cebadores, ensayos de ligasa de oligonucleótidos, electroforesis en gel con gradiente de temperaturas (TGGE), cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante, análisis de fusión de alta resolución, ensayos de proteínas de unión discordante de ADN, electroforesis capilar, transferencia de Southern, inmunoensayos, inmunohistoquímica, ELISA, citometría de flujo, transferencia de Western, HPLC y espectrometría de masas.

La divulgación también proporciona un kit para su uso en la determinación de si un sujeto tiene predicción de hipertensión pulmonar o para su uso en la predicción de la probabilidad de que un paciente que padece hipertensión pulmonar responda al tratamiento con un antagonista de la hipertensión pulmonar, comprendiendo el kit,

- 5 a) al menos una sonda capaz de detectar la presencia de la expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; y
b) instrucciones para utilizar la sonda con el fin de someter a ensayo una muestra biológica del paciente para determinar la presencia de la expresión de CCL21 y/o proteína CCL21.

10 En algunas realizaciones de este aspecto, la sonda se selecciona a partir de un oligonucleótido que se hibrida específicamente con una región de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de CCL21 o una molécula de unión capaz de unirse a una proteína CCL21 o un fragmento de esta.

En algunas realizaciones de este aspecto, la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento de este.

15 Descripción breve de los dibujos

Figura 1: Biomarcador candidato a partir de perfiles de expresión de ARNm pulmonar en el modelo de rata de HP con hipoxia/sugen después del tratamiento con Imatinib.

Figura 2: Niveles de proteína CCL21 humana en muestras de suero y plasma de pacientes de HP y controles equiparados (equiparados en la proporción de edad, etnia, género).

20 **Figura 3:** Expresión y localización de la proteína CCL21 mediante inmunohistoquímica en secciones pulmonares humanas de pacientes de HP que se someten a trasplante pulmonar.

Descripción detallada de la invención

25 Definiciones

A efectos de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando proceda, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

30 El término «CCL21» se refiere a CCL21 humana, a menos que se especifique lo contrario, que tiene una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, tal como se define en ENST00000259607 (Ensembl).

35 El término «CCL21» se refiere al gen CCL21 humano, a menos que se especifique lo contrario, que tiene una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, tal como se define en ENSP00000259607 (Ensembl).

40 El término «CCL21» es sinónimo de SCYA21; ECL; SLC; CKb9; TCA4; 6Ckine; exodus-2; «ligando de quimiocina (motivo C-C) 21 [Homo sapiens (humano)]»; «quimiocina con motivo C-C 21»; exodus-2 de quimiocina beta»; «quimioatrayente eficiente para linfocitos»; exodus-2, «quimiocina de tejido linfoide secundario»; «subfamilia A de citocinas inducibles de bajo peso molecular (Cys-Cys), miembro 21»

Tal como se utiliza en la presente, el término «gen» se refiere al gen y a todas las variantes conocidas actualmente de este.

45 Tal como se utiliza en la presente, el término «nivel» se refiere a ARN y/o ADN y/o al número de copias proteicas de un biomarcador de acuerdo con la presente invención. Habitualmente, el nivel de un biomarcador en una muestra biológica obtenida de un paciente en terapia es diferente (es decir, mayor o menor) del nivel del mismo biomarcador en una muestra similar obtenida de un sujeto sano.

50 Los términos y expresiones «someter a ensayo», «detección», y «detectar» se refieren a la identificación de la presencia o ausencia de uno o más biomarcadores. Los términos «medida» y «medir» se refieren a la identificación de la presencia, la ausencia o la cantidad de uno o más biomarcadores.

55 Tal como se utiliza en la presente, un «valor basal» se refiere generalmente al nivel (cantidad) de expresión de CCL21 (p. ej., ARNm) o polipéptido (o proteína) CCL21 en una muestra comparable (p. ej., del mismo tipo de tejido que el tejido evaluado), de un sujeto sano «normal» que no presenta hipertensión pulmonar. Si se desea, se puede utilizar un grupo o población de los mismos tejidos de sujetos normales y el valor basal puede ser un promedio o media de las medidas. Los valores basales adecuados pueden ser determinados por los expertos en la técnica sin demasiada experimentación. Los valores basales adecuados pueden estar disponibles en una base de datos recopilada a partir de los valores y/o se puede determinar basándose en datos publicados o en estudios retrospectivos de tejidos de pacientes, y otra información tal como sería evidente para un experto que implemente un método de la invención. Los valores basales adecuados se pueden seleccionar utilizando herramientas estadísticas que proporcionen un intervalo de confianza apropiado de modo que se pueda aceptar que los valores medidos que se sitúen fuera del valor estándar son aberrantes desde una perspectiva diagnóstica y predictivos de hipertensión pulmonar.

- Un aumento «significativo» en un valor, tal como se utiliza en la presente, se puede referir a una diferencia que es reproducible o estadísticamente significativa, determinada utilizando métodos estadísticos que sean apropiados y muy conocidos en la técnica, generalmente con un valor de probabilidad de menos de un cinco por ciento de posibilidades de que el cambio se deba a una variación aleatoria. Por lo general, un valor estadísticamente significativo se encuentra a al menos dos desviaciones estándar del valor en un sujeto de control sano «normal». Las pruebas estadísticas adecuadas serán evidentes para un experto. Por ejemplo, un aumento significativo en la cantidad de una proteína en comparación con un valor basal puede ser de aproximadamente un 50%, un factor 2 o superior.
- Tal como se utiliza en la presente, el término «homólogo» se refiere a una variante polipeptídica o polinucleotídica que comparte un ancestro evolutivo común o que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con el natural.
- La expresión «molécula de unión», tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier proteína o péptido que se une específicamente al polipéptido CCL21. La expresión «molécula de unión» incluye, sin carácter limitante, anticuerpos y fragmentos de estos tales como fragmentos inmunológicamente funcionales. La expresión «fragmento inmunológicamente funcional» de un anticuerpo o cadena de inmunoglobulina, tal como se utiliza en la presente, es una especie de proteína de unión que comprende una parte, independientemente de cómo se obtenga o sintetice esa parte, de un anticuerpo (una parte de unión a antígeno) que carezca de al menos algunos de los aminoácidos presentes en una cadena completa, pero que aún es capaz de unirse específicamente a CCL21.
- El término «anticuerpo» se refiere a una inmunoglobulina intacta o un fragmento funcional de esta. Tal como se utiliza en la presente, el término «anticuerpo» se refiere a un polipéptido que comprende una región de marco de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de este que se une específicamente y reconoce un epítipo, p. ej., un epítipo que se encuentra en CCL21 humano. El término «anticuerpo» incluye anticuerpos completos (tales como anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanizados y humanos), que incluyen anticuerpos completos monocatenarios y fragmentos de unión a antígeno de estos. El término «anticuerpo» incluye fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, anticuerpos monocatenarios, que pueden comprender las regiones variables solas o combinadas con todos o parte de los siguientes elementos polipeptídicos: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3 de una molécula de anticuerpo.
- Tal como se utiliza en la presente, se pretende que una molécula de unión «capaz de unirse a CCL21» se refiera a una molécula de unión que se une a CCL21 con una K_D de 1×10^{-6} M o menos, 1×10^{-7} M o menos o 1×10^{-8} M o menos, o 1×10^{-9} o menos, 1×10^{-10} M o menos.
- Tal como se utiliza en la presente, el término «sujeto» incluye cualquier animal humano o no humano.
- La expresión «animal no humano» incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, gallinas, anfibios, reptiles, etc.
- El término «paciente» incluye cualquier animal humano o no humano.
- La expresión «antagonista de hipertensión pulmonar» se refiere a cualquier molécula que inhiba, trate, prevenga o cure la hipertensión pulmonar.
- Los términos y expresiones «tratar», «que trata», «tratamiento», «prevenir», «que previene» o «prevención» incluyen tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones en las que se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno u otro factor de riesgo. El tratamiento y/o prevención no requieren la cura completa de un trastorno y engloban la reducción de los síntomas o factores de riesgo subyacentes o al menos una ralentización de la progresión de la enfermedad.
- La expresión «que comprende» se refiere a «que incluye» así como también a «constituido por», por ejemplo, una composición «que comprende» X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.
- El término «aproximadamente» en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x + 10\%$. Las referencias a una identidad de secuencia porcentual entre dos secuencias de aminoácidos se refieren a que, cuando se alinean, ese es el porcentaje de aminoácidos que son idénticos al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y la identidad de secuencia u homología porcentual se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Suplemento 30. Un alineamiento preferido es el determinado por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman que utiliza una búsqueda de huecos afines con una penalización de apertura de huecos de 12 y una penalización de extensión de huecos de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de Smith-Waterman se divulga en Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489

CCL21 como biomarcador para la hipertensión pulmonar

5 El ligando de quimiocina (motivo C-C) 21 (CCL21) es una citocina de bajo peso molecular que pertenece a la familia de quimiocinas CC. El CCL21 es uno de varios genes de citocinas CC implicados en procesos inmunoreguladores e inflamatorios. Las citocinas CC son proteínas caracterizadas por dos cisteínas adyacentes. Al igual que otras quimiocinas, la proteína codificada por este gen inhibe la hemopoyesis y estimula la quimiotaxis. Esta proteína es quimiotáctica *in vitro* para timocitos y linfocitos T y, en particular, linfocitos T inmaduros, pero no para linfocitos B, macrófagos o neutrófilos. Es un ligando funcional con elevada afinidad por el receptor de quimiocinas 7 que se expresa en los linfocitos T y B²⁵. Se cree que el CCL21 desempeña una función en la mediación del retorno dirigido de los linfocitos a los órganos linfoides secundarios. Más recientemente, se ha detectado la expresión de CCL21 en la formación ectópica de tejido linfóide secundario en los tLT en pulmones explantados de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática¹⁹. En este estudio, se ha estudiado CCL21 tanto en muestras humanas como de rata. Las secuencias proteicas de CCL21 humano y de rata son idénticas en un 67%, lo que indica un grado elevado de homología entre las dos especies.

Métodos de diagnóstico y tratamiento

20 La presente invención contempla un método para determinar si un sujeto tiene hipertensión pulmonar, que comprende
 a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;
 25 b) comparar la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 respecto a un valor basal que sea indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar;
 donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar.

30 La presente divulgación también contempla un método para predecir la probabilidad de que un paciente que padece hipertensión pulmonar responda al tratamiento con un antagonista de hipertensión pulmonar, que comprende, someter a ensayo una muestra biológica obtenida del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; y donde un nivel mayor de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 respecto a un valor basal es indicativo de una probabilidad mayor de que el paciente responda al tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar.

35 Además, la presente invención contempla un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:
 a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; y
 40 b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar.

En algunas realizaciones de la presente invención, el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de un ácido nucleico de la expresión de *CCL21*.

50 El resultado de la expresión génica de *CCL21* puede ser un polinucleótido (o ácido nucleico). Un polinucleótido o ácido nucleico es una molécula que comprende una cadena de al menos dos monómeros de ácido nucleico que pueden ser desoxirribonucleósido, ribonucleósidos y cualquier nucleósido modificado de estos. Se incluyen específicamente moléculas de ADN, así como secuencias de ADNc y genómicas, moléculas de ARN tales como ARNm y transcritos sin cortar y empalmar o parcialmente cortados y empalmados y productos de corte y empalme. En una realización, el método para determinar si un sujeto padece hipertensión pulmonar, el método comprende
 55 a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;
 60 b) comparar la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 respecto a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar; donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar; donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico

de la expresión de *CCL21* y donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) o un fragmento de este. Preferentemente, el ácido nucleico es ADNc amplificado a partir de ARNm de *CCL21*.

5 En otro aspecto divulgado en la presente, el método para predecir la probabilidad de que un paciente que padece hipertensión arterial pulmonar responda a un tratamiento con un antagonista de hipertensión arterial pulmonar, que comprende someter a ensayo una muestra biológica obtenida a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de *CCL21* y/o de proteína *CCL21*; y donde un nivel mayor de expresión de *CCL21* y/o proteína *CCL21* respecto a un valor basal es indicativo de una probabilidad mayor de que el paciente responda al tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar; donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de *CCL21* y donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) o un fragmento de este. Preferentemente, el ácido nucleico es ADNc amplificado a partir de ARNm de *CCL21*.

15 En otra realización más, la invención se refiere a un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de *CCL21* y/o proteína *CCL21*; y

b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de *CCL21* y/o proteína *CCL21* en comparación con la cantidad de expresión de *CCL21* y/o proteína *CCL21* a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de *CCL21* y/o de proteína *CCL21* en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar;

25 donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de *CCL21* y donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) o un fragmento de este. Preferentemente, el ácido nucleico es ADNc amplificado a partir de ARNm de *CCL21*.

30 En otras realizaciones de la presente invención, el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína *CCL21* o un fragmento de esta.

La proteína (o polipéptido) *CCL21* de acuerdo con la presente divulgación comprenden el polipéptido obtenido mediante transcripción (completa o incompleta) y traducción del gen *CCL21* humano.

También se incluyen variantes polipeptídicas. Un polipéptido variante incluye una molécula que contiene una o más deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con los polipéptidos naturales obtenidos mediante transcripción y traducción del gen *CCL21* humano natural o mediante traducción de los transcritos polirribonucleotídicos naturales de ese gen.

El biomarcador de acuerdo con la presente invención puede ser un fragmento o un producto de degradación del polipéptido (o proteína) *CCL21*.

En una realización, el método para determinar si un sujeto padece hipertensión pulmonar, el método comprende

a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de *CCL21* y/o proteína *CCL21*; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;

b) comparar la cantidad de expresión de *CCL21* y/o de proteína *CCL21* respecto a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de *CCL21* y/o de proteína *CCL21* en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar; donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de *CCL21* y/o de proteína *CCL21* en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar; y donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína *CCL21* o un fragmento de esta.

En otra realización, el método para determinar si un sujeto padece hipertensión pulmonar, el método comprende

a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de *CCL21* y/o proteína *CCL21*; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;

b) comparar la cantidad de expresión de *CCL21* y/o de proteína *CCL21* respecto a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de *CCL21* y/o de proteína *CCL21* en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar; donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de *CCL21* y/o de proteína *CCL21* en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar; donde el paso

de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína CCL21 o un fragmento de esta; y donde la hipertensión pulmonar es hipertensión arterial pulmonar idiopática.

En otra realización más, la invención proporciona un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; y

b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar;

y donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína CCL21 o un fragmento de esta.

En otra realización, la invención se refiere a un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; y

b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar;

y donde la hipertensión pulmonar es hipertensión arterial pulmonar idiopática.

En otras realizaciones de la presente invención, el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico modificada de la expresión de *CCL21* o en busca de una proteína CCL21 modificada o fragmento de esta.

Las modificaciones de polinucleótidos o polipéptidos son muy conocidas en la técnica. Las modificaciones se pueden llevar a cabo en uno o más nucleósidos o residuos de aminoácido de los polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Como alternativa, o en combinación con las modificaciones químicas mencionadas anteriormente, se puede modificar la conexión entre los monómeros. Algunas modificaciones conocidas adicionales incluyen la conjugación de etiquetas o marcas al biomarcador polinucleotídico o polipeptídico.

Las modificaciones químicas de los polinucleótidos incluyen, sin carácter limitante, el reemplazamiento de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino, la alteración de restos de azúcares o conexiones entre azúcares (es decir, fosforotioato), el marcaje de nucleótidos con radionucleótidos (es decir, ³²P), conjugación con etiquetas o moléculas marcadoras tales como etiquetas fluorescentes (es decir, rodamina, fluoresceína, Cy3 y/o Cy5, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas cromogénicas u otras marcas (es decir, digoxigenina o biotina y partículas magnéticas). La modificación de los restos de azúcares, heterociclos de purina y pirimidina, así como los análogos heterocíclicos y tautómeros de estos también se incluyen en la presente. Algunos ejemplos ilustrativos son diaminopurina 8-oxo-N⁶-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N⁴,N⁴-etanocitosina, N⁶,N⁶-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C³-C⁶)-alquilcitosina, 5-fluorouracilo, 5bromouracilo, 2-hidroxi-5metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los ejemplos descritos en la Pat. de EE. UU. N.º 5 432 272; Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, Nueva York, 1980; Freier y Altmann, *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25(22), 4429-43; Toulme', J.J., *Nature Biotechnology* 19:17-18 (2001); Manoharan M.; *Biochemica et Biophysica Acta* 1489:117-139 (1999); Freier S.M., *Nucleic acid Research*, 25:4429-4443 (1997); Uhlman E., *Drug Discovery & Development*, 3: 203-213 (2000); Herdewin P., *Antisense & Nucleic acid Drug Dev.*, 10:297-310 (2000).

Los expertos conocen una amplia variedad de técnicas de marcaje y conjugación. El marcaje de polinucleótidos o ácidos nucleicos se puede lograr, por ejemplo, mediante marcaje de oligos, desplazamiento de la mella, marcaje de extremos o amplificación por PCR utilizando un cebador marcado.

Las modificaciones químicas de un biomarcador polinucleotídico analizadas en la presente invención comprenden preferentemente marcaje con radioisótopos y/o marcaje con agentes fluorescentes. Más preferentemente, el o los biomarcadores polinucleotídicos, especialmente cuando se amplifica su número de copias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comprenden una etiqueta fluorescente (p. ej., los ensayos de expresión génica TaqMan® constan de un par de cebadores de PCR sin marcar y una sonda TaqMan® con una marca de tinción VIC® o FAM™ en el extremo 5', y un desactivador no fluorescente (NFQ, por sus siglas en inglés) de agentes de unión al surco menor (MGB, por sus siglas en inglés) en el extremo 3'.

Muestras biológicas

5 En la presente invención, la muestra biológica se selecciona entre sangre, suero, plasma y una muestra de tejido pulmonar.

Una muestra que se «proporciona» puede ser obtenida por la persona (o máquina) que lleva a cabo el ensayo o puede ser obtenida por otro, y transferida a la persona (o máquina) que lleva a cabo el ensayo.

10 En una realización de la invención, la muestra es una muestra sanguínea tal como sangre completa, plasma o suero (plasma del que se han eliminado los factores de coagulación). Por ejemplo, se pueden utilizar suero o plasma periférico o venoso. En otra realización, la muestra es tejido pulmonar, que se recoge, p. ej., después de una biopsia. Los métodos para obtener muestras y prepararlas para su análisis son convencionales y muy conocidos en la técnica.

15 En una realización, el método para determinar si un sujeto padece hipertensión pulmonar, el método comprende

a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;

20 b) comparar la cantidad de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 respecto a un valor basal que sea indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar;

25 donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de la expresión de CCL21 y/o proteína CCL21 en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar; donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de CCL21; donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) o un fragmento de este; y donde la muestra biológica se selecciona entre sangre o plasma o suero. Preferentemente, el ácido nucleico es ADNc amplificado a partir de ARNm de CCL21.

30 En otra realización más, la invención se refiere a un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

35 a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21; y

40 b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL 21 y/o de proteína CCL 21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar;

45 donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de CCL21 y donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) al ácido ribonucleico (ARN) de CCL21 o un fragmento de este y donde la muestra biológica se selecciona entre sangre o plasma o suero. Preferentemente, el ácido nucleico es ADNc amplificado a partir de ARNm de CCL21.

En otra realización, el método para determinar si un sujeto padece hipertensión pulmonar, el método comprende

50 a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;

55 b) comparar la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 respecto a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar; donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar; donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína CCL21 o un fragmento de esta; y donde la muestra biológica se selecciona entre sangre o plasma o suero.

60 En otra realización más, la invención se refiere a un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21; y

- b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL 21 y/o de proteína CCL 21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar;
- 5 donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína CCL21 o fragmento de esta y donde la muestra biológica se selecciona entre sangre o plasma o suero.

En algunas realizaciones, se proporciona un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

- 10 a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21; y
- 15 b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL 21 y/o de proteína CCL 21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar;
- 20 donde el antagonista de hipertensión pulmonar se selecciona entre bloqueantes del canal de calcio, inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) 5, estimulador de guanilato ciclasa (sGC), antagonistas del receptor de endotelina (ERA) y agonistas de prostaciclina.

Métodos de detección (o ensayo)

- 25 Se pueden emplear una serie de métodos conocidos o evidentes para los expertos en la técnica con el fin de llevar a cabo la elaboración de perfiles de expresión génica o proteica.

30 En algunas realizaciones, el paso de ensayo comprende una técnica seleccionada entre análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), ensayos basados en TaqMan, secuenciación directa, hibridación aleloespecífica dinámica, ensayos de extensión de cebadores, ensayos de ligasa de oligonucleótidos, electroforesis en gel con gradiente de temperaturas (TGGE), cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante, análisis por fusión de alta resolución, ensayos de proteínas de unión discordante de ADN, electroforesis capilar, transferencia de Southern, inmunoensayos, inmunohistoquímica, ELISA, citometría de flujo, transferencia de Western, HPLC y espectrometría de masas.

35 En general, los métodos de elaboración de perfiles de expresión génica se pueden dividir en dos grandes grupos: métodos basados en el análisis de hibridación de los polinucleótidos y otros métodos basados en la detección bioquímica o secuenciación de los polinucleótidos. Los métodos más comúnmente utilizados conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión de ARNm en una muestra incluyen la transferencia de northern y la hibridación *in situ* (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)); ensayos de protección de ARNasas (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)); y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Weis *et al.*, *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)).

45 Como alternativa, se pueden emplear anticuerpos que reconozcan dúplex específicos, incluidos dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los diversos métodos para determinar la expresión de ARNm o proteína incluyen, sin carácter limitante, elaboración de perfiles de expresión génica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que incluye la PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), análisis de micromatrices que se puede llevar a cabo con un equipo comercializado, siguiendo los protocolos del fabricante tal como mediante el uso de la tecnología GenChip de Affymetrix, análisis en serie de expresión génica (SAGE) (Velculescu *et al.*, *Science* 270:484-487 (1995); y Velculescu *et al.*, *Cell* 88:243-51 (1997)), MassARRAY, análisis de expresión génica mediante secuenciación masiva de firmas en paralelo (MPSS) (Brenner *et al.*, *Nature Biotechnology* 18:630-634 (2000)), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferentemente se cuantifica el ARNm. Dicho análisis de ARNm se lleva a cabo preferentemente utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o mediante análisis de micromatrices. Cuando se emplea PCR, una forma preferida de PCR es la PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR).

55 Los métodos de inmunohistoquímica también son adecuados para detectar los niveles de expresión del biomarcador de la presente invención. Por tanto, se utilizan anticuerpos o antisueros, preferentemente antisueros policlonales, y de la forma más preferente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador con el fin de detectar la expresión. Los anticuerpos se pueden detectar mediante marcaje directo de los anticuerpos en sí, por ejemplo, con marcas radiactivas, marcas fluorescentes, marcas de haptenos tales como biotina o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Como alternativa, se utiliza un anticuerpo primario sin marcar junto con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos y kits de inmunohistoquímica son muy conocidos en la técnica y están comercializados.

60

Los niveles de expresión también se pueden determinar a nivel proteico, por ejemplo, utilizando varios tipos de inmunoensayos o técnicas proteómicas.

5 En los inmunoensayos, el marcador proteico diagnóstico diana se detecta utilizando un anticuerpo que se une específicamente a los marcadores. El anticuerpo se marcará habitualmente con un resto detectable. Existen numerosas marcas disponibles que se pueden agrupar generalmente en las siguientes categorías: Radioisótopos tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H y ¹³¹I. El anticuerpo se puede marcar con el radioisótopo utilizando las técnicas descritas en las Publ. *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen *et al.* (1991) Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, por ejemplo, y la radiactividad se puede medir utilizando un recuento de centelleo.

10 Existen marcas fluorescentes disponibles tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo Texas. Las marcas fluorescentes se pueden conjugar al anticuerpo utilizando las técnicas divulgadas en «Current Protocols in Immunology», *supra*, por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar utilizando un fluorímetro.

15 Existen varias marcas de sustratos enzimáticos disponibles y la Patente de EE. UU. N.º 4 275 149 proporciona una revisión de algunas de ellas. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Algunas técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente pasa a un estado electrónico excitado mediante una reacción química y puede emitir entonces luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o cede energía a un aceptor fluorescente. Algunos ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (p. ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de EE. UU. N.º 4 737 456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato-deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos (p. ej., glucosa-oxidasa, galactosa-oxidasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), oxidasas de heterociclos (tales como uricasa- y xantina-oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.* (1981) *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York 73: 147-166.

20 Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRPO, por sus siglas en inglés) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de un tinte (p. ej., ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)); fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de *para*-nitrofenilo como sustrato cromogénico y β-D-galactosidasa (β-D-Gal) con un sustrato cromogénico (p.ej., *p*-nitrofenil-β-D-galactosidasa) o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-β-D-galactosidasa.

25 Existen numerosas combinaciones de enzima-sustrato diferentes disponibles para los expertos en la técnica. Para consultar una revisión general de estas, remítase a las Patentes de EE. UU. N.ºs 4 275 149 y 4 318 980.

30 En otras versiones de técnicas de inmunoensayo, no es necesario marcar el anticuerpo y su presencia se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo. Para la detección de la proteína CCL21 humana en muestras de plasma y suero se utilizó un inmunoensayo hecho a medida en la plataforma Mesoscale Discovery® (MSD). La tecnología de detección de electroquimioluminiscencia MSD utiliza marcas SULFO-TAG™, que emiten luz tras la estimulación electroquímica iniciada en las superficies de los electrodos de microplacas MULTI-ARRAY y MULTI-SPOT®.

35 Por tanto, los inmunoensayos diagnósticos en la presente pueden estar en cualquier formato de ensayo, incluidos, por ejemplo, ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos tales como ELISA y ensayos de inmunoprecipitación.

40 En una realización, el método para determinar si un sujeto padece hipertensión pulmonar, el método comprende
 45 a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;
 b) someter a ensayo la muestra biológica para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21;
 y
 50 c) comparar la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 respecto a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar; donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar; donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico

de la expresión de CCL21 mediante PCR o RT-PCR; donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) o un fragmento de este; y donde la muestra biológica se selecciona entre sangre o plasma o suero. Preferentemente, el ácido nucleico es ADNc amplificado a partir de ARNm de CCL21.

5 En otra realización más, la invención se refiere a un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

10 a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21; y

15 b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL 21 y/o de proteína CCL 21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar;

20 donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de *CCL21* mediante PCR o RT-PCR; donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) o un fragmento de este; y donde la muestra biológica se selecciona entre sangre o plasma o suero. Preferentemente, el ácido nucleico es ADNc amplificado a partir de ARNm de CCL21.

En otra realización, el método para determinar si un sujeto padece hipertensión pulmonar, el método comprende

25 a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;

30 b) comparar la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 respecto a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no tiene hipertensión pulmonar; donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de CCL21 y/o de proteína CCL21 en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar; donde el paso de ensayo comprende ensayo la muestra biológica en busca de una proteína CCL21 o un fragmento de esta mediante inmunoensayos o ELISA; y donde la muestra biológica se selecciona entre sangre o plasma o suero.

35 En otra realización más, la invención se refiere a un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:

40 a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21; y

45 b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 en comparación con la cantidad de expresión de CCL 21 y/o proteína CCL 21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de CCL 21 y/o de proteína CCL 21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar;

45 donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína CCL21 o fragmento de esta mediante inmunoensayos o ELISA y donde la muestra biológica se selecciona entre sangre o plasma o suero.

Kits de la divulgación

50 La divulgación contempla un kit para su uso en la determinación de si un sujeto tiene predicción de hipertensión pulmonar o para su uso en la predicción de la probabilidad de que un paciente que padece hipertensión pulmonar responda al tratamiento con un antagonista de hipertensión pulmonar, comprendiendo el kit,

55 a) al menos una sonda capaz de detectar la presencia de la expresión de CCL21 y/o proteína CCL21; y
b) instrucciones para utilizar la sonda con el fin de someter a ensayo una muestra biológica del paciente para determinar la presencia de la expresión de CCL21 y/o proteína CCL21.

60 En un aspecto de la divulgación, la sonda se selecciona a partir de un oligonucleótido que se hibrida específicamente con una región de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de CCL21 tal como sondas y/o cebadores con especificidad genética o selectividad genética, para cuantificar la expresión de CCL21.

El kit puede comprender además opcionalmente reactivos para la extracción de ARN de las muestras, en particular, muestras de tejido embebidas en parafina fijadas y/o reactivos para la amplificación de ARN. El kit puede comprender recipientes (que incluyen placas de microvaloración adecuadas para su uso en una implementación automatizada del método), cada uno con uno o más de los diversos reactivos (habitualmente en forma concentrada), por ejemplo,

micromatrices prefabricadas, tampones, los trifosfatos de nucleótidos apropiados (p. ej., dATP, dCTP, dGTP y dTTP; o rATP, rCTP, rGTP y UTP), transcriptasa inversa, ADN-polimerasa, ARN-polimerasa.

En otro aspecto de la divulgación, la sonda es una molécula de unión capaz de unirse a una proteína CCL21 o un fragmento de esta. Preferentemente, la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento de este. Otras moléculas de unión pueden ser moléculas que tienen un armazón basado en un dominio de fibronectina de tipo III (p. ej., el décimo módulo de la fibronectina de tipo III (dominio de Fn3 10)), adnectina (Adnectins®), módulos repetitivos derivados de moléculas que comprenden anquirina, moléculas Affibody®, moléculas Anticalins®, moléculas Affilin® y miméticos de epítomos proteicos.

Ejemplos

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no se deberían interpretar como limitantes.

1. Elaboración de perfiles con Genechip de un modelo de Rata con hipoxia/sugen

Se utilizó el modelo de HP de rata con hipoxia/sugen para llevar a cabo una elaboración de perfiles del transcriptoma comparativa entre las muestras pulmonares de rata con pulmones de ratas sin tratar y con HP experimental.

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de conformidad con la ley de regulaciones del Ministerio del Interior británico (procedimientos científicos) de 1986, RU.

Se disolvió Sugén (250 mg; SU5416; Sigma-Aldrich®) en vehículo (12,5 mL; 0,5% (peso/vol) de carboximetilcelulosa sódica, 0,9% (peso/vol) de NaCl, 0,4% (vol/vol) de polisorbato, 0,9% (vol/vol) de alcohol bencílico en agua desionizada), se sonicó durante 15 min y después se agitó en un vórtex. En el día 0, los animales se anestesiaron, se pesaron y recibieron 20 mg/kg de Sugén mediante inyección subcutánea. Los animales se colocaron en la cámara de hipoxia y se redujo lentamente el nivel de O₂ hasta un 10%. Los animales de control permanecieron en aire ambiental (21% de O₂) para servir como controles normóxicos para el estudio. Después de 2 semanas, todos los animales se retiraron de la cámara de hipoxia. En la semana 4, los animales se sometieron a medidas ecocardiográficas bajo anestesia con sevoflurano y se monitorizaron atentamente hasta que se recuperaron por completo. Los animales se sometieron a cateterización VD para la medición de la presión ventricular de lado derecho (PVD) bajo una mezcla de anestesia de ketamina y medetomidina. Después de la eutanasia según el Programa 1, el lóbulo izquierdo del pulmón se retiró, se infló y se fijó en formalina al 10% y se embebió en parafina para su análisis histológico. Los lóbulos del pulmón derecho se congelaron instantáneamente para la elaboración de perfiles transcricionales.

Las muestras pulmonares de rata congeladas, recogidas en bolsas para tejidos TT2 (K Bioscience®, N.º de Cat 520021) se trituraron utilizando el Covaris CryoPrep CP02. El ARN total de las muestras pulmonares trituradas se extrajo con un kit RNeasy Mini según el protocolo del fabricante (Qiagen™). El ADN genómico se eliminó mediante tratamiento con DNase I (kit Turbo DNase, Invitrogen). La cuantificación exacta del ARN se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La calidad del ARN se evaluó analizando los ARNr 18S y 28S mediante electroforesis basada en microfluidos en un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Para la preparación y el análisis de micromatrices, se utilizó el kit de una ronda de amplificación de ARN con transcripción *in vitro* de Affymetrix para amplificar 1 µg de ARN total. El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con un cebador que contenía secuencias promotoras de ARN-polimerasa T7 y oligo (dT). A continuación, se purificó el ADNc bicatenario y se utilizó como molde para generar ARNc biotinilado. La cantidad y calidad del ARNc amplificado se evaluó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) y un bioanalizador Agilent. El ARNc biotinilado se fragmentó e hibridó con matrices GeneChip de rata Affymetrix 230_2. Después de la hibridación, las matrices GeneChip se lavaron, se tiñeron y se analizaron utilizando un escáner GeneChip 3000 7G. Se utilizó el software de operación GeneChip de Affymetrix para la adquisición de imágenes. El análisis se llevó a cabo utilizando el software GeneSpring GX 11.5.1 (Agilent Technologies Inc., EE. UU.). La normalización de datos se logró utilizando el algoritmo de análisis multichip robusto (RMA, por sus siglas en inglés) y la transformación de la línea base respecto a la mediana de todas las muestras.

Los genes expresados de forma diferencial (factor > 1,5, valor de p ≤ 0,05, prueba T) que codificaba proteínas secretadas (con probabilidad de ser detectadas en muestras sanguíneas) y que se asociaban con procesos de remodelación se preseleccionaron para una validación adicional (Tabla 1). Se cotejaron los genes asociados con la remodelación de las siguientes fuentes: Base de datos de rutas de MetaCore (<http://thomsonreuters.com/metacore> anteriormente GeneGO), base de datos de análisis de rutas de Ingenuity (IPA) (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>), herramienta Gene Prospector en Gene Navigator (<http://hugenavigator.net/HuGENavigator>). Los genes de los que se ha indicado que se secretan o detectan en la sangre se encontraron utilizando las siguientes fuentes: Base de datos de análisis de rutas de Ingenuity (IPA) (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>) y un conjunto de datos propio (SECTRANS).

ES 2 747 381 T3

Tabla 1 - Genes expresados de forma diferencial en muestras pulmonares de animales tratados con Sugén e hipoxia en comparación con controles sin tratar.

	Símbolo del gen de rata	Título del gen de rata	ID del gen de rata en Entrez	Cambio factorial
1	Cyp1b1	citocromo P450, familia 1, subfamilia b, polipéptido 1	25426	46,4
2	Grem1	gremlin 1, superfamilia con puentes de cisteína, homólogo (<i>Xenopus laevis</i>)	50566	8,4
3	Chia	quitinasa, ácida	113901	4,2
4	Ccl2	ligando de quimiocinas (motivo C-C) 2	24770	3,4
5	Serpine1	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado E, miembro 1	24617	3,2
6	Spp1	fosfoproteína secretada 1	25353	3,1
7	Il1r2	receptor de interleucina 1, tipo II	117022	3,1
8	Frzb	Proteína relacionada con la familia frizzled	295691	3,0
9	Il6	Interleucina 6	24498	2,9
10	Cxcl13	ligando de quimiocinas (motivo C-X-C) 13	498335	2,7
11	Esm1	molécula con especificidad por células endoteliales 1	64536	2,7
12	Mmrn1	multimerina 1	500152	2,6
13	Ccl21	ligando de quimiocinas (motivo C-C) 21	298006	2,6
14	Cthrc1	proteína que contiene repetición de triple hélice de colágeno 1	282836	2,6
15	Plaur	activador de plasminógeno, receptor de urocinasa	50692	2,5
16	Tfpi2	inhibidor de la ruta del factor tisular 2	286926	2,4
17	C6	componente del complemento 6	24237	2,3
18	Dmp1	fosfoproteína ácida de la matriz de dentina 1	25312	2,3
19	Ptgs2	prostaglandina endoperóxido-sintasa 2	29527	2,3
20	Arhgap1	proteína activadora de GTPasa Rho 1	311193	2,3
21	LOC100363145	estabilina 1	100363145	2,2
22	Aqp1	acuaporina 1	25240	2,2
23	Fst	folistatina	24373	2,1
24	Reln	reelina	24718	2,1
25	Acp5	fosfatasa ácida 5, resistente a tartrato	25732	2,1
26	Col18a1	colágeno, tipo XVIII, alfa 1	85251	2,1
27	Lpar6	receptor de ácido lisofosfatídico 6	691774	2,0
28	Nos3	óxido nítrico-sintasa 3, célula endotelial	24600	2,0
29	Cxcr4	receptor de quimiocinas (motivo C-X-C) 4	60628	1,9
30	Chi3l1	proteína 1 tipo quitinasa 3	89824	1,9
31	Adams4	metalopeptidasa con motivo de trombospondina tipo 1 ADAM, 4	66015	1,8
32	Gdf15	factor de diferenciación del crecimiento 15	29455	1,8
33	Tac1	taquicinina 1	24806	1,8
34	Col1a1	colágeno, tipo I, alfa 1	29393	1,8
35	Angpt2	angiopoyetina 2	89805	1,8
36	Olr1	receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (tipo lectina) 1	140914	1,8
37	Timp1	inhibidor de metalopeptidasa TIMP 1	116510	1,8

38	Serpine2	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado E, miembro 2	29366	1,8
39	Eln	elastina	25043	1,8
40	Vcan	versican	114122	1,7
41	Adora2b	receptor de adenosina A2B	29316	1,7
42	Cxcl10	ligando de quimiocinas (motivo C-X-C) 10	245920	1,7
43	Gstp1	glutación S-transferasa pi 1	24426	1,6
44	Mmp14	metalopeptidasa de matriz 14 (insertada en la membrana)	81707	1,6
45	Hmox1	Heme-oxigenasa (descicladora) 1	24451	1,6
46	Ctsk	catepsina K	29175	1,6
47	Il1r1	receptor de interleucina 1, tipo I	25663	1,6
48	Pthlh	hormona tipo hormona paratiroide	24695	1,6
49	Axl	receptor tirosina cinasa de Axl	308444	1,6
50	Gch1	GTP-ciclohidrolasa 1	29244	1,6
51	Inhba	inhibina beta A	29200	1,5
52	Cxcl12	ligando de quimiocinas (motivo C-X-C) 12 (factor derivado de células estromales 1)	24772	1,5
53	Hp	haptoglobina	24464	1,5
54	Fn1	fibronectina 1	25661	1,5
55	Il6st	transductor de señales de interleucina 6	25205	1,5
56	Il1rn	antagonista del receptor de interleucina 1	60582	1,5
57	Des	desmin	64362	1,5
58	Vegfa	factor de crecimiento endotelial vascular A	83785	-1,5
59	Ace	enzima convertora de angiotensina I (peptidil-dipeptidasa A) 1	24310	-1,6

2. Evaluación de los niveles de ARNm del biomarcador candidato en el modelo de rata con Sugén e hipoxia de hipertensión arterial pulmonar idiopática después del tratamiento con Imatinib

5 Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente.

10 En este estudio, después de la administración de una dosis inicial de Sugén en el día 0 y un periodo de 14 días en una cámara de hipoxia a continuación, se administraron a las ratas 100 mg/kg de Imatinib o vehículo de control diariamente durante dos semanas más.

15 Después de la eutanasia según el Programa 1, el lóbulo izquierdo del pulmón se retiró, se infló y se fijó en formalina al 10% y se embebió en parafina para su análisis histológico, mediante inflado de las vías aéreas. Las secciones tisulares (3 µm) se tiñeron con anticuerpos contra el factor de von Willebrand (vWF) y actina de músculo liso α (α-SMA). Se examinaron los portaobjetos utilizando un microscopio confocal y DMLB, cámara digital y software de imagen IM50 (Leica Microsystems, Londres, RU). Los vasos pulmonares de pequeño tamaño (10-100 µm de diámetro indicado por la tinción de vWF) se evaluaron para determinar los grados de tinción positiva para α-SMA circunferencial indicativos de muscularización. Los lóbulos del pulmón derecho se congelaron instantáneamente para las medidas de expresión de ARNm del biomarcador candidato. El ARN total se extrajo y se sometió a un control de calidad tal como se ha mencionado en la sección anterior.

20 El ADNc se sintetizó utilizando el kit de ARN a ADNc de gran capacidad (Invitrogen) según el protocolo del fabricante del kit. La QPCR se llevó a cabo en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, EE. UU.), utilizando la mezcla maestra de PCR universal de TaqMan (Applied Biosystems). Los ensayos Taqman se adquirieron de Applied Biosystems®. La expresión relativa se normalizó respecto a una combinación de 10 genes constitutivos diferentes. Los datos se analizaron utilizando el software SDS RQ Manager (Applied Biosystems, versión 2.4). Los valores de expresión génica normalizados para cada gen ($2^{-\Delta Ct}$) se representaron y analizaron utilizando un análisis ANOVA bidireccional en GraphPad Prism 6.02.

30 Se evaluó la expresión de todos los transcritos enumerados en la Tabla 1 en muestras pulmonares de los animales tratados con vehículo o Imatinib. Se descubrió que la expresión de los 6 transcritos génicos siguientes estaba aumentada en pulmones Hy/Su de rata y reducida con el tratamiento con Imatinib: Ccl21, Col18a1, Cxcl12, Cxcl13,

Dmp1, Frzb (Figura 1). Además, se midieron los niveles de expresión de ARNm de CCL21 en las muestras pulmonares de los grupos tratados con imatinib o vehículo en el día 28 y animales sin tratar de control y se observó un aumento de los niveles de ARNm de CCL21 en los pulmones de los animales tratados con vehículo en comparación con controles sin tratar y una reducción después del tratamiento con Imatinib (Figura 3, gráficos superiores). Los niveles de expresión de CCL21 en las muestras pulmonares de estos grupos se correlacionaron de forma significativa tanto con la presión ventricular del lado derecho como con la muscularización arterial ($P < 0,0001$)

Por tanto, se concluyó que los niveles de transcritos de los genes anteriores se reducen en respuesta a un agente de antirremodelación en los pulmones de los animales con hipertensión pulmonar como resultado de la administración del fármaco terapéutico.

3. Evaluación de la correlación del ARNm del biomarcador candidato con las lecturas de remodelación vascular en un estudio longitudinal de rata con hipoxia/Sugen

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente. En este estudio, después de la administración de una dosis inicial de Sugén en el día 0 y un periodo de 21 días en una cámara de hipoxia, las ratas desarrollaron presión ventricular del lado derecho elevada y muscularización arterial. Después de la eutanasia según el Programa 1, el lóbulo izquierdo del pulmón se retiró para su análisis histológico y el lóbulo derecho para el análisis del ARNm. Se midieron los niveles de expresión de ARNm de los 6 biomarcadores candidatos en muestras pulmonares de los siguientes puntos temporales del estudio: semanas 3, 5, 8 y 14 y animales sin tratar ($n = 6$ en cada grupo). Se utilizó una correlación de Pearson para evaluar la importancia de la correlación entre la expresión del ARNm de los biomarcadores candidatos y el porcentaje de muscularización, la presión ventricular del lado derecho (PVD) y el número de vasos ocluidos. La expresión de transcritos de todos los marcadores evaluados en las muestras pulmonares de estos grupos se correlacionó de forma significativa con al menos dos de las tres lecturas de remodelación vascular: porcentaje de muscularización arterial, porcentaje de vasos ocluidos y presión ventricular del lado derecho (Tabla 2). Por tanto, se concluyó que los transcritos del biomarcador candidato evaluado son indicativos del grado de remodelación vascular.

Tabla 2: Correlaciones de los niveles de expresión de transcritos de los biomarcadores candidatos con las lecturas de remodelación vascular.

Transcrito	Valor R muscularización	Valor P muscularización
CCL21	0,7102	<0,0001
Cxcl12	0,626	<0,0001
Frzb	0,6292	<0,0001
Cxcl13	0,6164	<0,0001
Col18a1	0,4072	0,0152
Dmp1	0,3933	0,0194

Transcrito	Valor R oclusión de la cavidad	Valor P oclusión de la cavidad
CCL21	0,7344	<0,0001
Cxcl12	0,5331	0,0008
Frzb	0,4921	0,0023
Cxcl13	0,3482	0,0374
Col18a1	0,347	0,0381
Dmp1	0,1549	0,3671

Transcrito	valor R PVD	valor R PVD
CCL21	0,7164	<0,0001
Cxcl12	0,6611	<0,0001
Frzb	0,7078	<0,0001
Cxcl13	0,7183	<0,0001

Col18a1	0,4877	0,0091
Dmp1	0,4796	0,0031

4. Evaluación de los niveles proteicos de biomarcadores candidatos en las muestras de suero y plasma de los pacientes de HP y los controles equiparados

5 Con el fin de determinar si los niveles de proteínas circulantes de los biomarcadores candidatos son elevados en las muestras de suero y plasma de los pacientes de HP en comparación con los controles equiparados, los inventores desarrollaron inmunoensayos para CCL21, CXCL12, CXCL13 y Col181a, y midieron los niveles circulantes de estos en 30 pacientes de HP y 25 controles equiparados en proporciones de edad, etnia y género.

10 Las muestras de sangre periférica humana se obtuvieron y se gestionaron conforme a una solicitud del panel de revisión ética aprobada. Se recogieron muestras de suero y plasma equiparadas de 30 pacientes de hipertensión pulmonar. De los 30 pacientes de HP, un 24,8% pertenecían al Grupo 1, un 28,4% al Grupo 2, un 10% a los Grupos 2 y 3, un 33,3% al Grupo 3 y un 3,5% al Grupo 4 según el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Dana Point 2008) ²

15 Los inmunoensayos que utilizan placas recubiertas a medida MSD se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante. En resumen, las placas se incubaron con el Diluyente 2 propio con una concentración de 25 µL/pocillo, se sellaron con película de cobertura adhesiva y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas (300-1000 rpm). La proteína recombinante CCL21 (R&D systems®, n.º de cat DY366, Parte 841709) se reconstituyó 1% de BSA (Gibco, n.º de cat 15260-037)/PBS (Gibco, n.º de cat 14190) y se añadió con una concentración de 10 000 pg/mL y se llevaron a cabo diluciones en serie 1:5 con Diluyente 2, con el 8.º punto como estándar cero (0 pg/mL).

20 Los estándares, muestras y controles de ensayo se añadieron con una concentración de 25 µL/pocillo a la placa MSD con Diluyente 2. La placa se selló y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placas (300-1000 rpm). A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (0,05% de Tween 20 en PBS a pH 7,4, Sigma™, n.º de cat. P3563-10PAK).

25 Los anticuerpos de detección y captura de CCL21 (sistema de desarrollo de ELISA DuoSet con CCL21/6Ckine humanas, R&D systems®, n.º de cat DY366, Partes 841707 y 841708, suministradas con la placa recubierta a medida MSD) se reconstituyeron según el protocolo DuoSet de R&D system®, con una concentración final de 1 µg/mL. Se añadió la solución de anticuerpo de detección a la placa lavada. La placa se selló y se incubó durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Después de un paso de lavado final se utilizó pipeteo inverso para añadir 150 µL de 2x Tampón de lectura T (diluido con un volumen igual de H₂O) y la placa se leyó utilizando un generador de imágenes SECTOR 6000 con un instrumento para MSD.

30 Para el análisis estadístico, se llevó a cabo una prueba t utilizando GraphPad prism 6. Se realizó un análisis de curva característica operativa del receptor (ROC) utilizando GraphPad Prism 6. El área bajo la curva (AUC), generada por el software, refleja la especificidad y la selectividad del biomarcador/. Un AUC de 1 indica un biomarcador 100% sensible y específico para diferenciar dos poblaciones.

35 Los inventores descubrieron que la expresión de CCL21, pero no de Col18a1, CXCL12 ni 13 (datos no mostrados), estaba aumentada en pacientes de HP en comparación con los controles equiparados en muestras tanto de suero como de plasma (Figura 2). El análisis de curva característica operativa del receptor (ROC) de los conjuntos de datos indicó que los niveles circulantes de CCL21 pueden diferenciar a los pacientes de los controles con una sensibilidad y especificidad elevadas, con un área bajo la curva (AUC) de 0,91 en muestras de suero y de 0,89 en muestras de plasma (Figura 2). Por tanto, se concluyó que la expresión de CCL21 está aumentada en muestras de suero y plasma de pacientes de HP en comparación con los controles equiparados y puede diferenciar a los pacientes de los controles con una sensibilidad/especificidad elevadas.

5. Datos de proteína CCL21 por IHC en humanos de pacientes de HP

40 Las secciones de tejidos embebidos en parafina fijados en formalina de HP se obtuvieron de la Universidad de Cambridge procedentes de pacientes que se sometieron a trasplante de pulmón con un consentimiento informado aprobado y consenso institucional.

45 CCL21 se detectó mediante inmunohistoquímica en un Ventana Discovery XT utilizando el siguiente protocolo. En resumen, se eliminó la cera de las secciones utilizando una solución EZprep, y se llevó a cabo una recuperación intensiva de antígeno pH8 utilizando el reactivo Ventana cc1. Se detectó CCL21 utilizando anticuerpo de cabra anti-CCL21 humana (R&D system® AF366, 3,33ug/ml) - el anticuerpo se incubó durante 12 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario era de conejo anticabra biotinilado (DAKO E0466) diluido hasta 1/200, incubación de 20

minutos a 37 °C. El anticuerpo secundario biotinilado se detectó utilizando el kit DABMap. (Ventana 650-010). Las secciones se sometieron a contratinción utilizando hematoxilina de Harris y se taparon con un cubreobjetos. Las imágenes se analizaron utilizando el escáner para portaobjetos Aperio XT y se analizaron utilizando Definiens Tissue Studio.

5 Se detectó la proteína CCL21 en las lesiones de HAP (Figura 3(A-D)) procedentes de pacientes de HP avanzada en áreas con macrófagos subepiteliales/epiteliales y alveolares, así como en los vasos linfáticos. Por tanto, se concluyó que se expresa CCL21 en el sitio de la patología de la enfermedad.

10 Referencias

1. Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A., Wilkins, M.R. & Grimminger, F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature reviews. Cardiology* **8**, 443-455 (2011).
2. Galie, N. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* **34**, 1219-1263 (2009).
3. Dewachter, L. *et al.* Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **174**, 1025-1033 (2006).
4. Fike, C.D., Slaughter, J.C., Kaplowitz, M.R., Zhang, Y. & Aschner, J.L. Reactive oxygen species from NADPH oxidase contribute to altered pulmonary vascular responses in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **295**, L881-888 (2008).
5. Price, L.C. *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* **141**, 210-221 (2012).
6. Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation* **122**, 4306-4313 (2012).
7. Voelkel, N.F., Gomez-Arroyo, J., Abbate, A., Bogaard, H.J. & Nicolls, M.R. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *The European respiratory journal* **40**, 1555-1565 (2012).
8. Kherbeck, N. *et al.* The role of inflammation and autoimmunity in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. *Clinical reviews in allergy & immunology* **44**, 31-38 (2013).
9. Perros, F. *et al.* Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* **29**, 937-943 (2007).
10. Humbert, M. *et al.* Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **151**, 1628-1631 (1995).
11. Soon, E. *et al.* Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **122**, 920-927 (2010).
12. Tamby, M.C. *et al.* Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* **60**, 765-772 (2005).
13. Terrier, B. *et al.* Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **177**, 1128-1134 (2008).
14. Tuder, R.M., Groves, B., Badesch, D.B. & Voelkel, N.F. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* **144**, 275-285 (1994).
15. Carragher, D.M., Rangel-Moreno, J. & Randall, T.D. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Seminars in immunology* **20**, 26-42 (2008).
16. Brusselle, G.G., Demoor, T., Bracke, K.R., Brandsma, C.A. & Timens, W. Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? *The European respiratory journal* **34**, 219-230 (2009).
17. Marchal-Somme, J. *et al.* Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* **176**, 5735-5739 (2006).
18. Sato, M. *et al.* The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Immunol* **182**, 7307-7316 (2009).
19. Perros, F. *et al.* Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **185**, 311-321 (2012).
20. Aloisi, F. & Pujol-Borrell, R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology* **6**, 205-217 (2006).
21. Nagaya, N. *et al.* Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* **102**, 865-870 (2000).
22. Giannakoulas, G. *et al.* Usefulness of natriuretic Peptide levels to predict mortality in adults with congenital heart disease. *The American journal of cardiology* **105**, 869-873 (2010).
23. Galie, N. *et al.* Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* **117**, 3010-3019 (2008).
24. Mauritz, G.J. *et al.* Usefulness of serial N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurements for determining prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension. *The American journal of cardiology* **108**, 1645-1650 (2011).
25. Yoshida, R. *et al.* Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7118-7122 (1998).

26. Perros F. et al. Pulmonary Lymphoid Neogenesis in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension, *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, **185**, 311-321 (2012).
27. WO 2009/123730 A1.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un sujeto padece hipertensión pulmonar, que comprende
- 5 a) someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel de expresión de *CCL21* y/o proteína CCL21; donde la muestra biológica se selecciona entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir de un sujeto del que se sospecha que padece hipertensión pulmonar;
- 10 b) comparar la cantidad de expresión de *CCL21* y/o proteína CCL21 respecto a un valor basal que sea indicativo de la cantidad de expresión de *CCL21* y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar;
- donde una cantidad estadísticamente significativa mayor de expresión de *CCL21* y/o proteína CCL21 en comparación con el valor basal es indicativa de hipertensión pulmonar.
2. Un antagonista de hipertensión pulmonar para su uso en el tratamiento de un paciente que padece hipertensión pulmonar, caracterizado por que:
- 15 a) el paciente se selecciona para el tratamiento con el antagonista de hipertensión pulmonar basándose en el ensayo de una muestra biológica seleccionada entre tejido pulmonar, sangre, plasma y suero, y donde dicha muestra biológica se ha obtenido a partir del paciente para determinar el nivel de expresión de *CCL21* y/o proteína CCL21; y
- 20 b) si el paciente tiene un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de expresión de *CCL21* y/o proteína CCL21 en comparación con la cantidad de expresión de *CCL21* y/o de proteína CCL21 a un valor basal que es indicativo de la cantidad de expresión de *CCL21* y/o de proteína CCL21 en un sujeto que no padece hipertensión pulmonar, se ha de administrar al paciente el antagonista de hipertensión pulmonar.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o el antagonista de hipertensión pulmonar para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una secuencia de ácido nucleico de la expresión de *CCL21*.
- 30 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o el antagonista de hipertensión pulmonar para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido ribonucleico (ARN) de *CCL21* o un fragmento de este y ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) o un fragmento de este.
5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3, 4 o el antagonista de hipertensión pulmonar para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el paso de ensayo comprende someter a ensayo la muestra biológica en busca de una proteína CCL21 o un fragmento de esta.
- 35 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 5 o el antagonista de hipertensión pulmonar para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, donde el paso de ensayo comprende una técnica seleccionada entre análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), ensayos basados en TaqMan, secuenciación directa, hibridación aleloespecífica dinámica, ensayos de extensión de cebadores, ensayos de ligasa de oligonucleótidos, electroforesis en gel con gradiente de temperaturas (TGGE), cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante, análisis por fusión de alta resolución, ensayos de proteínas de unión discordante de ADN, electroforesis capilar, transferencia de Southern, inmunoensayos, inmunohistoquímica, ELISA, citometría de flujo, transferencia de Western, HPLC y espectrometría de masas.
- 40 7. El antagonista de hipertensión pulmonar para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde el antagonista de hipertensión pulmonar se selecciona entre bloqueantes del canal de calcio, inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) 5, estimulador de guanilato ciclasa (sGC), antagonistas del receptor de endotelina (ERA) y agonistas de prostaciclina.
- 50

Fig. 1

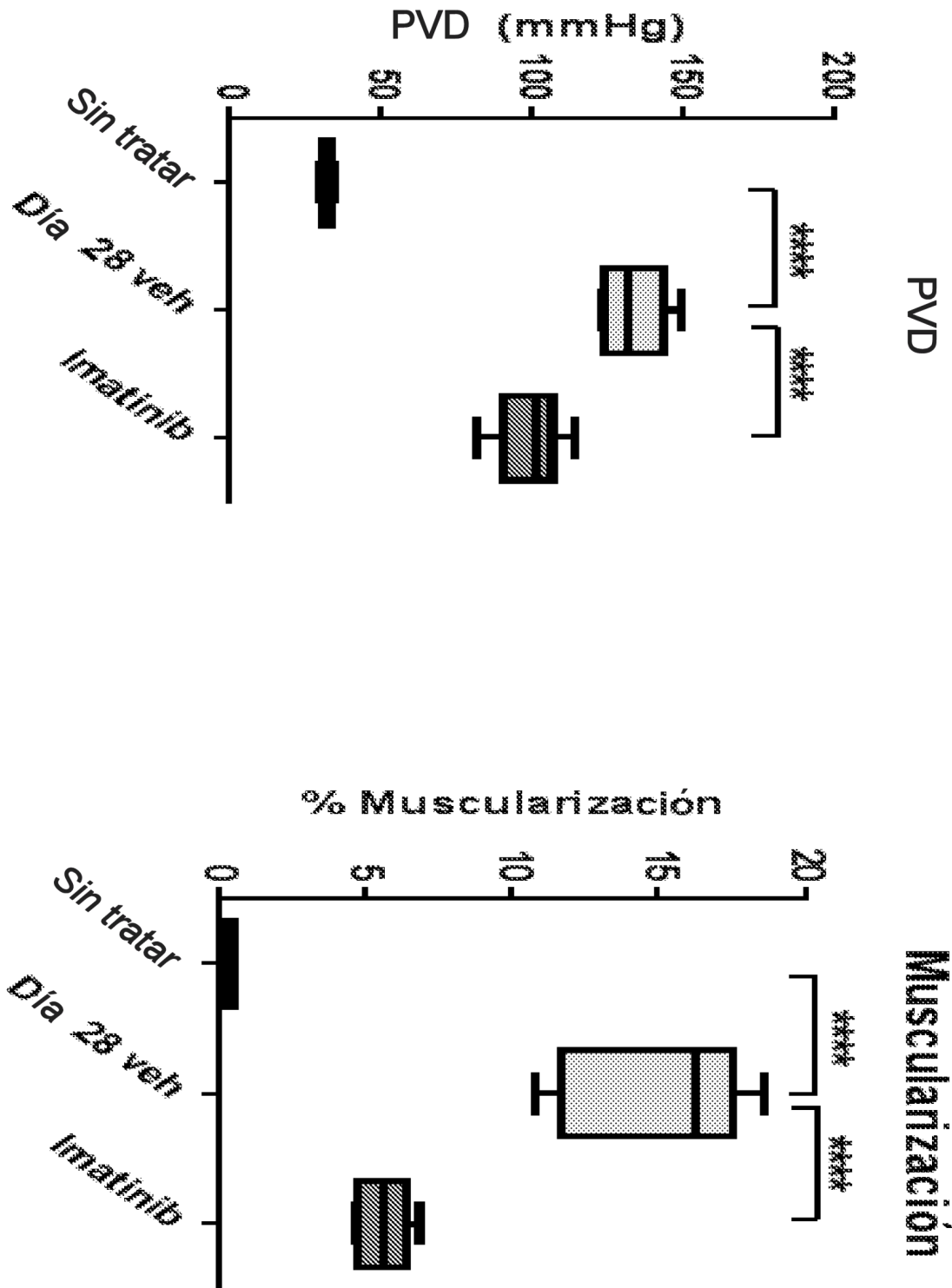


Fig. 1

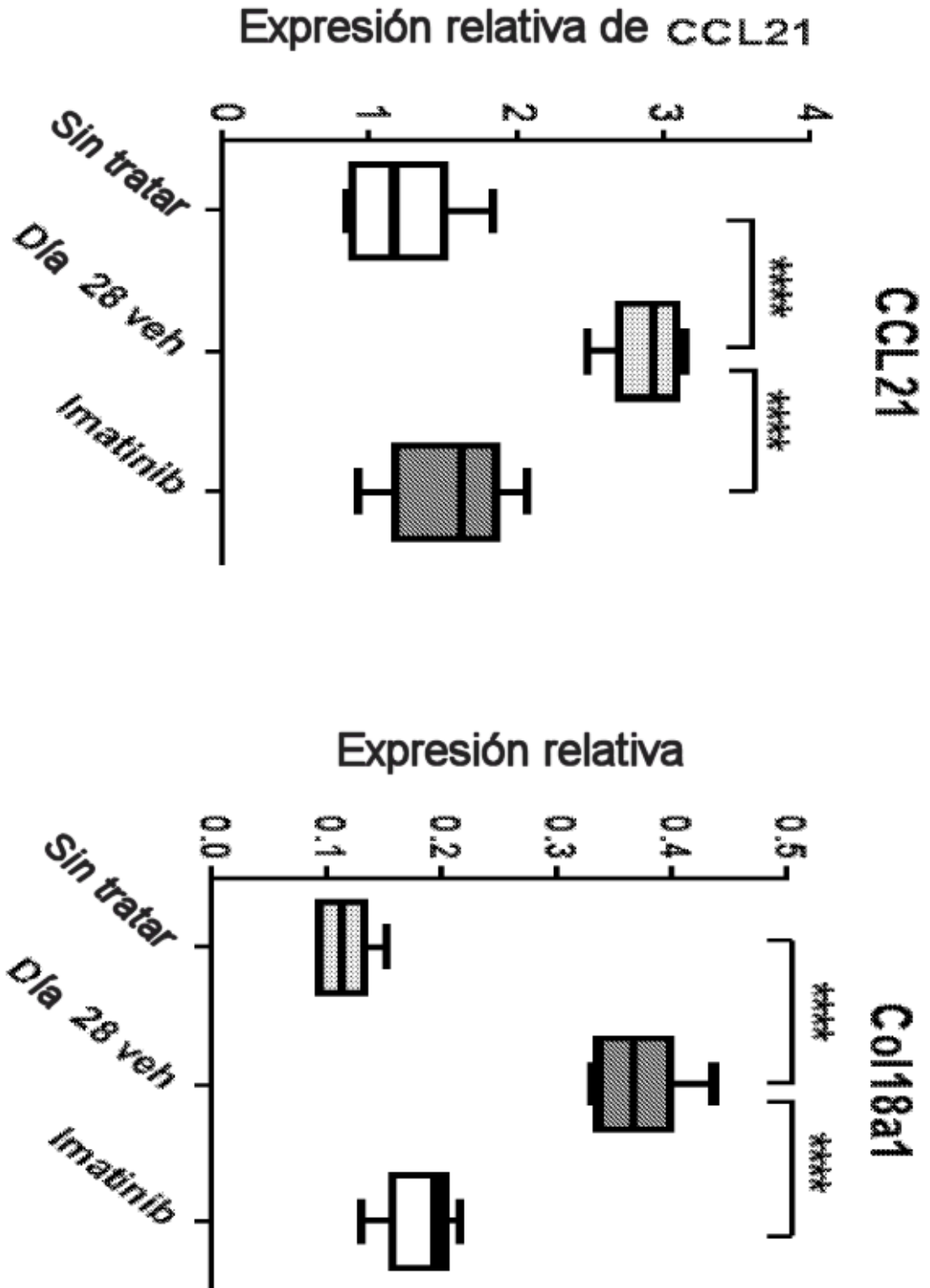


Fig. 1

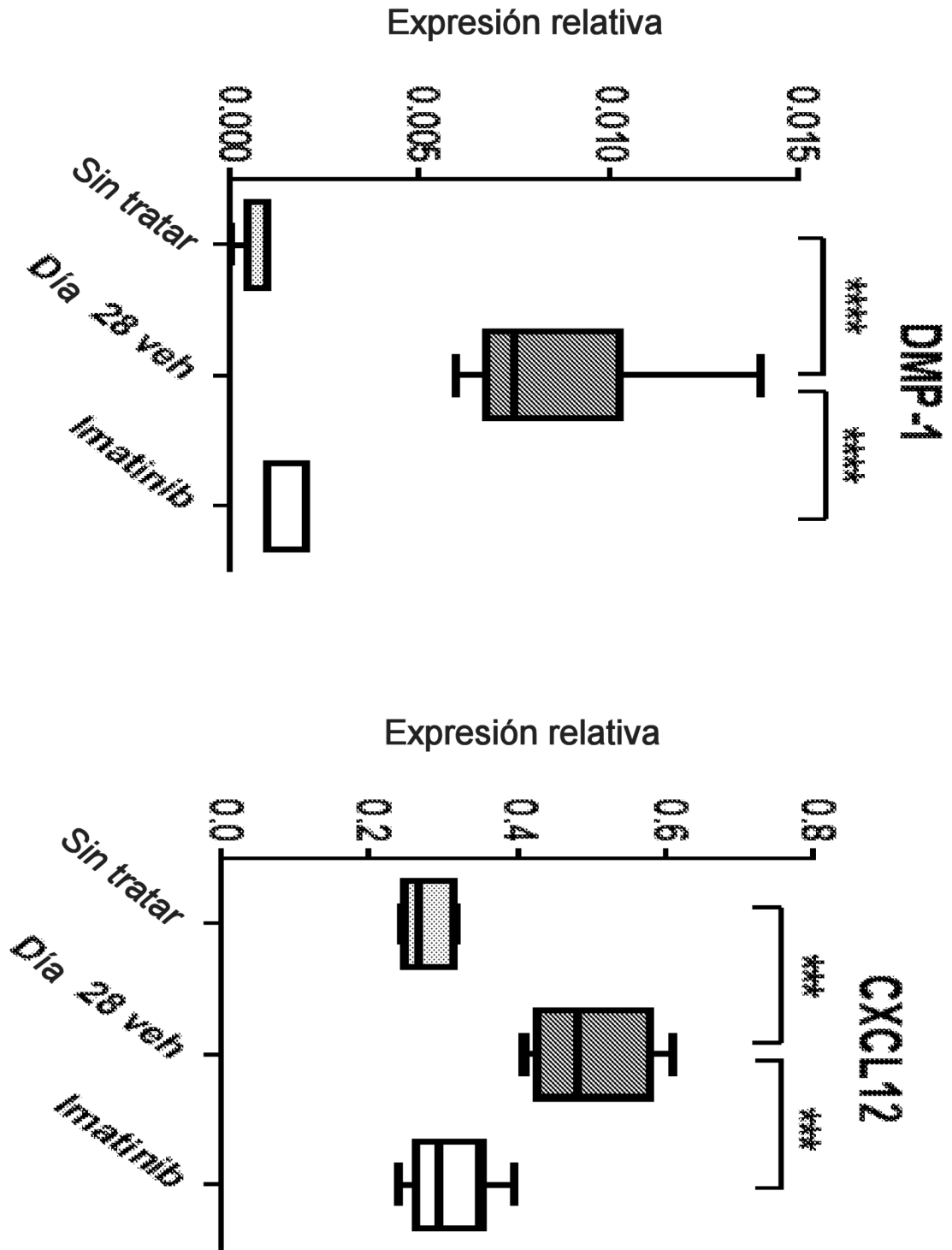


Fig. 1

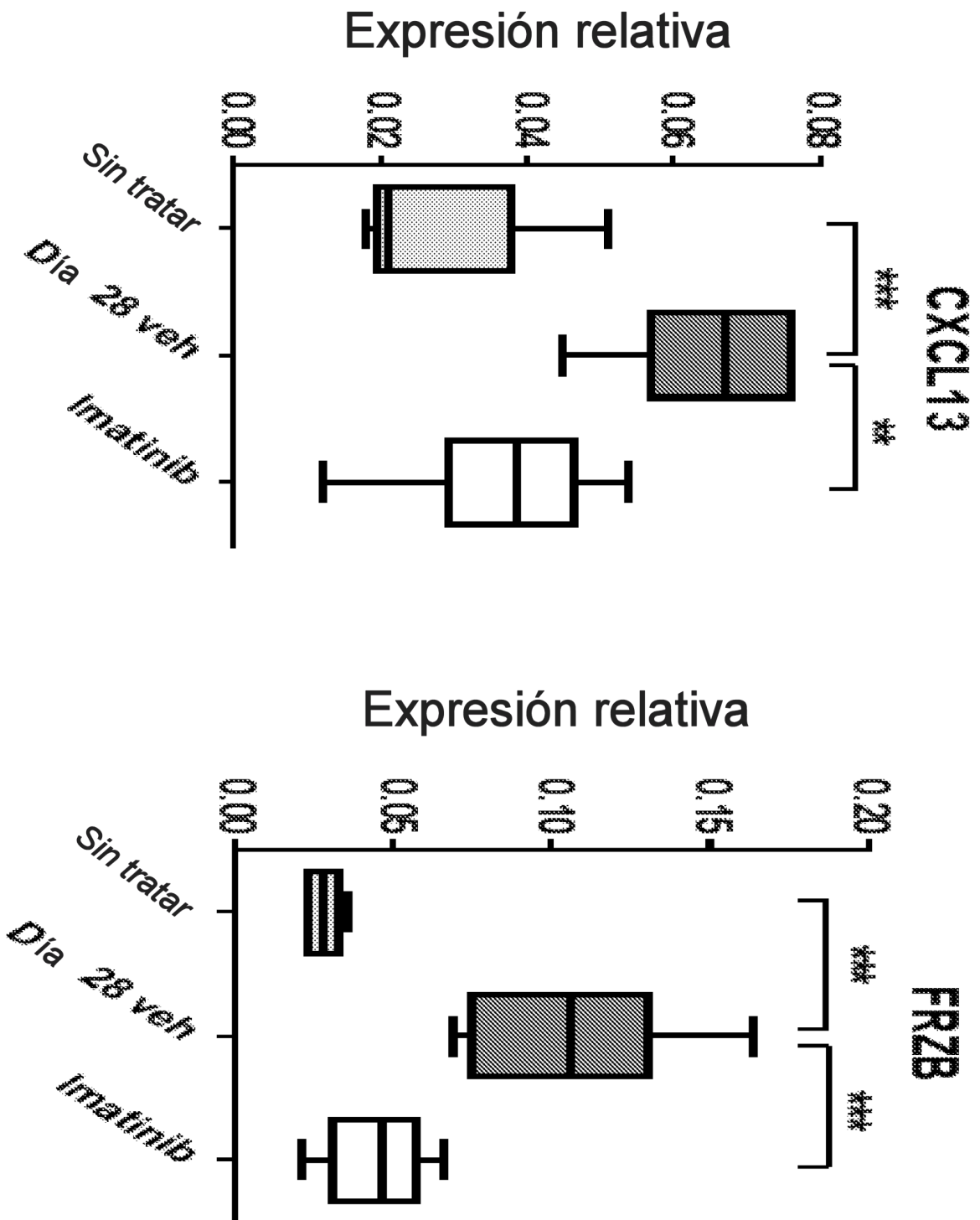


FIG 2

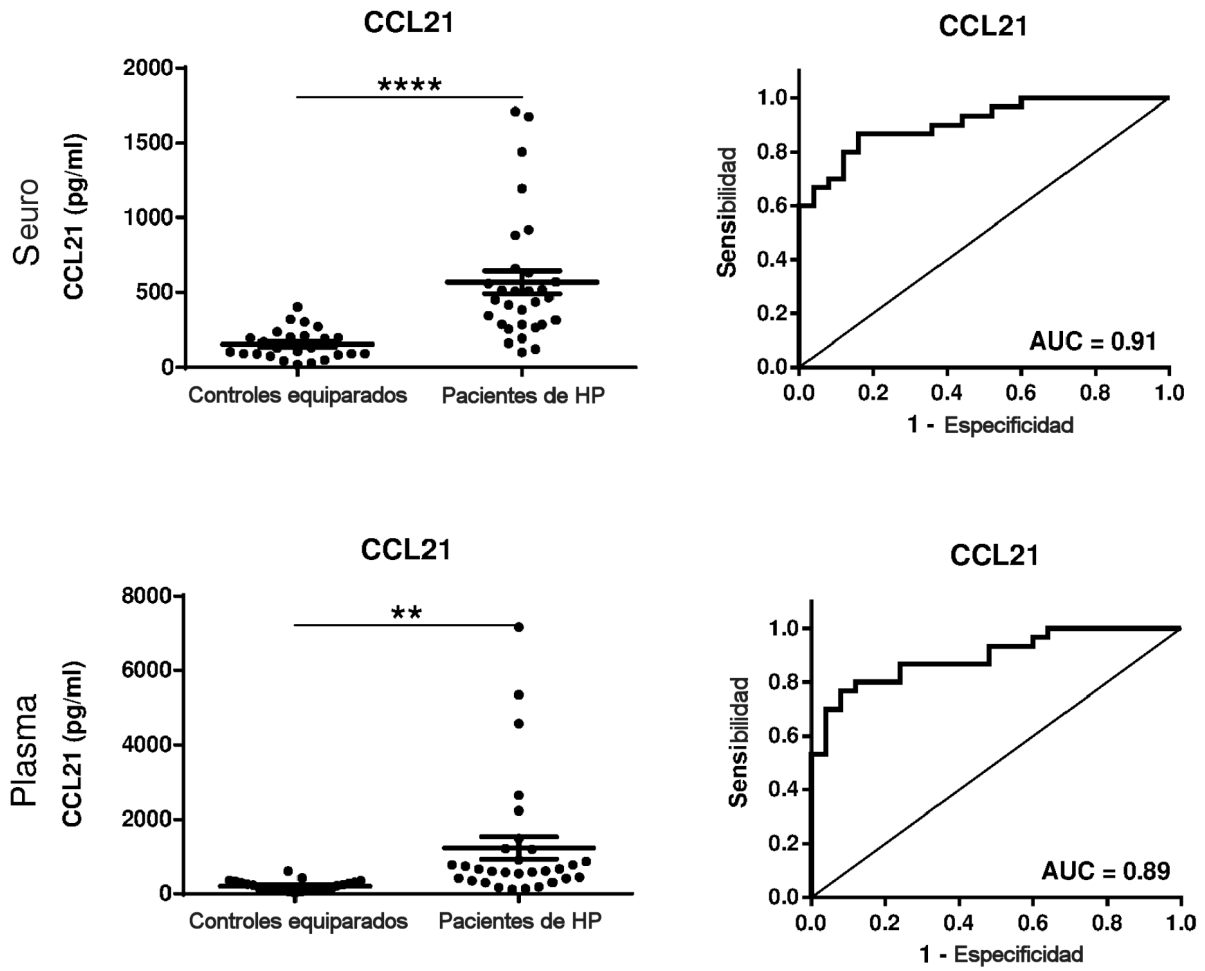


FIG 3

