



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 350**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06016296 .3**

96 Fecha de presentación : **04.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1884775**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.02.2008**

54

Título: **Procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad que implica un anticuerpo antirreceptor AT₁.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2010

73

Titular/es: **Celltrend GmbH**
Im Biotechnologiepark
14943 Luckenwalde, DE

72

Inventor/es: **Schulze-Forster, Kai y**
Heidecke, Harald

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 336 350 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 el diagnóstico de una enfermedad que implica un anticuerpo antirreceptor AT₁.

5 Aproximadamente 100 millones de personas en Europa padecen de algún tipo de enfermedades reumáticas degenerativas o inflamatorias que provocan que el impacto de las enfermedades reumáticas en las sociedades europeas sea abrumador para la sociedad. Las enfermedades de las articulaciones reumáticas representan la mitad de todas las enfermedades crónicas en las personas de 65 años y de edades superiores.

10 La calidad de vida de aproximadamente 7,5% de la población europea se encuentra grave y permanentemente disminuida por el dolor y la afectación funcional causados por las enfermedades reumáticas. La inmovilidad y la expectativa reducida de vida constituyen las consecuencias más drásticas de estas enfermedades (que, en la actualidad), son incurables. Sólo en Europa, las enfermedades reumáticas suponen una carga económica de más de 200 billones de EUR por año. Verdaderamente, el impacto de las enfermedades reumáticas aumentará de forma importante la carga económica y social cuando la población europea envejezca. Recientemente, se ha desarrollado una nueva terapia que hace diana en las moléculas implicadas en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas. A pesar de estos esfuerzos, todavía no existe la posibilidad de curar la mayoría de las enfermedades reumáticas. Una tarea terapéutica incluye la cronicidad de la inflamación, autoinmunidad, y degeneración del sistema esquelético muscular. Aunque las enfermedades reumáticas difieren en su inmunopatología, comparten mecanismos comunes de inicio y perpetuación.

20 Además, existe un potencial traduccional considerable para comprender otras enfermedades que implican al sistema inmunitario, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, alergia e infección. La diversidad de enfermedades reumáticas, la multiplicidad de tejidos implicados, es decir, hueso, cartílago, articulaciones, riñón, piel, vasos sanguíneos y el enfoque multidisciplinario que requiere entender la base molecular de estas enfermedades, hacen que su diagnóstico sea muy difícil.

25 El diagnóstico de la artritis y de otras enfermedades reumáticas es a menudo difícil, pues muchos síntomas son similares entre las distintas enfermedades. Para llevar a cabo un diagnóstico con exactitud, un médico puede requerir realizar una historia médica, llevar a cabo un examen físico, obtener ensayos de laboratorio, rayos x y otros ensayos relacionados con la imagen. Las enfermedades reumáticas son, por ejemplo, la artritis reumatoidea, la fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, lupus sistémico eritematoso e inflamación de las articulaciones.

30 El American College of Rheumatology ha definido (1987) diversos criterios para el diagnóstico de, por ejemplo, la artritis reumatoidea. La rigidez matinal de más de una hora, la artritis y la hinchazón tisular moderado de más de 3 de 14 articulaciones/grupos de articulaciones, la artritis de las articulaciones de la mano, la artritis simétrica, módulos subcutáneos en marcas de guía específicas, factor reumatoide a un nivel por encima del 95% y cambios radiológicos que sugieren erosión articular. Por lo menos, cuatro criterios tienen que cumplirse para establecer el diagnóstico, aunque muchos pacientes se tratan a pesar de no cumplir con los criterios. Cuando se sospecha clínicamente la artritis reumatoide, son necesarios estudios inmunológicos, tales como el factor reumatoideo (RF, un anticuerpo específico).

40 Un RF negativo no descarta la artritis reumatoidea. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo ensayo serológico, el cual prueba la presencia de los anticuerpos denominados antiproteína citrulinada (ACP). Como RF, este ensayo puede detectar aproximadamente el 80% de todos los pacientes RA, pero es raramente positivo en los pacientes no RA. Asimismo, otros varios ensayos sanguíneos se llevan a cabo para detectar otras causas de artritis, tales como el lupus eritematoso. Dichos ensayos incluyen la tasa de sedimentación eritrocítica (ESR), proteína reactiva, conteo sanguíneo total, función renal, enzimas hepáticas y ensayos inmunológicos, por ejemplo, anticuerpos antinucleares/ANA, se llevan a cabo en este estadio.

45 Tal como se ha expuesto para la artritis reumatoide como enfermedad entre (las pertenecientes) a la familia de las reumáticas inflamatorias, el diagnóstico en el campo de estas enfermedades es difícil. Por tanto, son necesarias herramientas diagnósticas fiables y seguras.

50 El documento WO 00/39154 A2 se refiere a péptidos del receptor AT₁ y su utilización para eliminar específicamente la unión, fisiológicamente celular activa, de los anticuerpos patológicos, en el tratamiento de la preeclampsia, así como en el diagnóstico de ésta.

55 Se ha mostrado que la angiotensina II está implicada en la inflamación sinovial humana de los pacientes artríticos, y que el receptor AT₁ es responsable de mediar el efecto (Walsh *et al.*, 1994, AT₁ receptor characteristics of angiotensin analogue binding in human synovium, Br. J. Pharmacol. 112: 435-442). Además, el candesartán -un agente bloqueante del receptor AT₁- puede utilizarse para el tratamiento y profilaxis de la artritis inducida por el colágeno en el modelo murino (Dalbeth *et al.*, 2005, The non-thiol angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril suppresses inflammatory arthritis, Rheumatology 44:24-31).

Sumario de la invención

65 La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad reumática inflamatoria, en el que, la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor AT₁ se determina en una muestra de un paciente que vaya a ser diagnosticado y en el que, la presencia de un anticuerpo antirreceptor AT₁ indica la enfermedad.

En el contexto de la presente invención se ha descubierto que más de 1/3 de pacientes (35%) con enfermedades reumáticas dan positivo para la presencia de un anticuerpo antiAT₁, mientras que en pacientes sin enfermedades reumáticas, sólo el 8,3% poseen un anticuerpo antiAT₁ detectable.

5 La determinación se llevó a cabo como un ensayo ciego. Todos los pacientes con enfermedades reumáticas mostraban complicaciones graves y fueron difíciles de tratar con los procedimientos estándar. Existió una correlación clara entre la presencia del anticuerpo antiAT₁ y las complicaciones de la enfermedad.

10 En una forma de realización preferida de la invención, la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor AT₁ se llevó a cabo detectando uno o varios de los anticuerpos seleccionados de entre el grupo de anticuerpos IgA, IgG e IgM, y más particularmente de los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

15 En una forma de realización de la invención, la invención se refiere a un inmunoensayo. Existen numerosas formas de llevar a cabo un inmunoensayo en una forma de realización preferida de la invención, siendo los inmunoensayos uno de la luciferasa y/o un (ensayo) ELISA.

La invención se refiere además a la utilización de un péptido receptor AT₁ para el diagnóstico de una enfermedad reumática inflamatoria.

20 La invención se refiere a un equipo de investigación y/o diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad reumática inflamatoria, en el que el equipo comprende un péptido receptor AT₁.

Descripción detallada de la invención

25 En el contexto de la presente invención se ha descubierto que ciertas enfermedades pueden diagnosticarse detectando la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor AT₁ en una muestra de paciente que vaya a ser diagnosticado. De hecho, se descubrió que el 35% de los pacientes que muestran una enfermedad reumática son positivos para el anticuerpo antiAT₁. El mismo anticuerpo antiAT₁ puede detectarse sólo en un 6,2% de los casos en pacientes sin enfermedad reumática.

30 Así, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una enfermedad, en el que la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor AT₁ se determina en una muestra de un paciente que vaya a ser diagnosticado.

35 Se ha podido demostrar que existe una relación entre la presencia de dicho anticuerpo antirreceptor AT₁ y la probabilidad de enfermedad reumática inflamatoria. Se ha demostrado que la presencia del anticuerpo antirreceptor AT₁ da lugar a la enfermedad reumática inflamatoria.

En relación con la presente invención, diversos términos generales se utilizarán de la forma siguiente:

40 Según la invención, por “rechazo de un injerto” debe entenderse la inducción de una reacción inmune con respecto al injerto en el receptor. Como reacción inmune en el receptor, constituye una reacción protectora o de defensa del organismo contra los antígenos del injerto.

45 El “receptor AT₁” puede encontrarse en el entorno celular natural y puede utilizarse conjuntamente con el material asociado con el receptor en su estado natural, así como en una forma aislada con respecto a sus estructuras primarias, secundarias y terciarias, siendo el receptor AT₁ bien conocido por los expertos en la materia. Basándose en el peso de la totalidad del receptor en la preparación que vaya a utilizarse según la invención, el receptor aislado representará por lo menos el 0,5%, preferentemente por lo menos, el 5%, más preferentemente por lo menos el 25%, y en una forma de realización particularmente preferida, el 50% por lo menos. El receptor se utiliza preferentemente en forma aislada, es decir, libre esencialmente de otras proteínas, lípidos, hidratos de carbono o de otras sustancias que se asocian naturalmente con el receptor. “Libre esencialmente de” significa que el receptor está por lo menos el 75%, preferentemente por lo menos el 85%, más preferentemente por lo menos el 95% y preferentemente de modo especial por lo menos el 99%, libre de otras proteínas, lípidos, hidratos de carbono o de otras sustancias que se asocian naturalmente con el receptor.

55 En relación con la presente invención, pueden utilizarse el receptor que se encuentra de forma natural, así como todas las modificaciones, mutantes o derivados del receptor AT₁. De modo similar, un receptor AT₁ obtenido mediante técnicas de recombinación, el cual incluya modificaciones aminoácidas, tales como inversiones, deleciones, inserciones, adiciones, etc., puede utilizarse según la invención, siempre que esta parte de la función esencial del receptor AT₁ esté presente, principalmente la capacidad de unir anticuerpos. El receptor AT₁ que se utilice, puede también comprender aminoácidos excepcionales y/o modificaciones de ellos, tales como alquilación, oxidación, modificación tiólica, desnaturalización, oligomerización y similares. El receptor puede asimismo sintetizarse mediante medios químicos. Según la invención, el receptor AT₁ puede ser particularmente una proteína y/o péptido o una proteína de fusión, que además de otras proteínas, péptidos o sus fragmentos, incluye el receptor AT₁ como un todo o en parte. 65 Utilizando procedimientos convencionales, en los péptidos o polipéptidos de los análogos funcionales del receptor AT₁, pueden determinarse propiedades análogas por los expertos en la materia. Por ejemplo, dichos polipéptidos o péptidos presentan una homología del 50-60%, 70 u 80%, preferentemente 90%, más preferentemente 95%, y muy preferentemente del 98%, con los péptidos identificados como receptor AT₁, pudiendo determinarse dicha homología,

por ejemplo, mediante el algoritmo de búsqueda de la homología Smith-Waterman, utilizando el Programa MPFRCH (Oxford Molecular), por ejemplo.

El término “péptido” de un receptor AT₁ que se utiliza en la presente invención, comprende también moléculas que difieren de la secuencia original mediante delección(es), inserción(es), sustitución(es) y/o otras modificaciones bien conocidas en la técnica anterior y/o que comprenden un fragmento de la molécula aminoácida original, mostrando todavía el receptor AT₁ las propiedades mencionadas anteriormente. También se incluyen variables y modificaciones alélicas. Los procedimientos para producir los cambios anteriores en la secuencia aminoácida son bien conocidos para los expertos en la materia y se han descrito en los libros de texto estándar de la biología molecular, por ejemplo, Sambrook *et al. supra*. Los expertos en la materia podrán determinar asimismo si un receptor AT₁, por tanto, modificado, presenta todavía las propiedades anteriormente mencionadas. Los péptidos receptores AT₁ posibles que se utilizan según la invención, pueden ser, por ejemplo, AVHYQSN (SEC ID n°:1); SHFYQTR (SEC ID n°:2) y/o GYYFDTN (SEC ID n°:3).

En la presente memoria, se hará referencia a la totalidad de las modificaciones ilustradas anteriormente del receptor AT₁ abreviadamente como “Péptidos o proteínas funcionalmente análogos”.

“Muestra” en el significado de la invención puede consistir en todos los tejidos y muestras biológicos, tales como sangre, linfa, orina, líquido cerebral. La muestra se recupera del paciente y se somete a diagnóstico, según la invención.

El “anticuerpo antirreceptor AT₁” según la invención, que va a ser detectado, se une al receptor AT₁ de una forma específica. El anticuerpo puede también ser modificado (por ejemplo, anticuerpos oligoméricos, reducidos, oxidados y marcados). El término anticuerpo antirreceptor AT₁ tal como se utiliza en la presente memoria, comprende moléculas intactas y también fragmentos de anticuerpos antirreceptor AT₁ tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que pueden determinar la unión epitópica específica del receptor AT₁. En estos fragmentos la capacidad del anticuerpo (o anticuerpos) antirreceptor AT₁ para unir selectivamente su antígeno o receptor, se conserva en parte, definiéndose los fragmentos de la siguiente forma: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión antigénica monovalente de una molécula de anticuerpo, puede generarse mediante escisión de un anticuerpo completo, utilizando la enzima papaína, obteniendo, por lo tanto, una cadena ligera intacta y parte de una cadena pesada; (2) el fragmento Fab de una molécula de anticuerpo puede obtenerse mediante tratamiento de un anticuerpo completo con pepsina y reducción subsiguiente, obteniendo de este modo 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 mediante tratamiento de un anticuerpo entero con la enzima pepsina sin reducción subsiguiente, siendo F(ab')₂ un dímero compuesto por dos fragmentos Fab que se mantienen juntos mediante dos enlaces disulfato; (4) Fv, que 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, unidas 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 determinante antigénico en el receptor AT₁. La determinación epitópica consiste generalmente en grupos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales azucaradas que muestran normalmente características específicas de estructura tridimensional, así como propiedades gráficas especiales.

El anticuerpo antirreceptor AT₁ se une específicamente al receptor AT₁, o al hacerlo, muestra reactividad inmuno específica cuando el anticuerpo antirreceptor AT₁ asume su función en una reacción de unión en presencia de una población heterogénea de receptores AT₁ o de sus fragmentos, permitiendo por lo tanto una conclusión si el receptor AT₁ u otra estructura biológica se encuentra presente. Bajo las presentes condiciones de un inmunoensayo, los anticuerpos antiAT₁ mencionados anteriormente, se unirán preferentemente a una parte específica del receptor AT₁, mientras que no se producirá unión significativa a otras proteínas que se encuentren en la muestra.

Por “pacientes” según la invención, se hace referencia a todas las personas, animales, plantas o microorganismos, independientemente de si muestran o no cambios patológicos. Según la invención, cualquier muestra que se recupera a partir de células, tejidos, órganos, organismos o similares, puede ser una muestra de un paciente que va a ser diagnosticado. En una forma de realización preferida, el paciente según la invención es un individuo humano. En otra forma de realización preferida, el paciente es un individuo humano del que se sospecha que tiene una enfermedad reumática inflamatoria.

Una “reacción inmune”, según la invención, es una interacción específica entre el receptor AT₁ o péptidos o proteínas de función análoga y anticuerpos antirreceptor AT₁. La reacción inmune puede detectarse utilizando varios inmunoensayos.

“Inmunoensayos” según la invención, son ensayos que utilizan la interacción específica entre el receptor AT₁ y péptidos o proteínas de función análoga y los anticuerpos antirreceptor AT₁, para detectar la presencia o determinar la concentración de los anticuerpos antirreceptor AT₁. Por ejemplo, una detección en la cuantificación de los anticuerpos antirreceptores AT₁ puede llevarse a cabo con la ayuda de dichos péptidos o proteínas de función análoga, es decir, mediante inmunoprecipitación o inmunotransferencia.

Según la invención, la enfermedad es una enfermedad reumática inflamatoria.

En una forma de realización preferida, la enfermedad reumática inflamatoria se selecciona de entre el grupo de artritis reumatoide, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico e inflamación de las articulaciones.

En una forma de realización muy preferida, la enfermedad reumática inflamatoria es la esclerosis sistémica progresiva.

En una forma de realización preferida de la invención, la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor AT₁ se lleva a cabo detectando uno o más de los anticuerpos seleccionados a partir del grupo de anticuerpos IgA, IgG e IgM.

Los anticuerpos humanos pueden dividirse en cinco tipos de inmunoglobulinas. El tipo A, la inmunoglobulina (IgA) existe en forma que se disuelve en la sangre, así como en variantes secretoras. La IgA comprende dos tipos básicos. La IgA secretora está formada por dos moléculas inmunoglobulínicas básicas, junto con una cadena J y un componente secretorio. Además, las moléculas específicamente IgA pueden predominar en las secreciones corporales.

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

En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el anticuerpo antirreceptor AT₁ se selecciona de entre el grupo de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

“Inmunoensayos” según la invención, son ensayos que utilizan la interacción específica entre el receptor AT₁ y péptidos o proteínas de función análoga y el anticuerpo antirreceptor AT₁, para detectar la presencia o determinar la concentración de los anticuerpos antirreceptor AT₁. Por ejemplo, la detección y cuantificación del anticuerpo antirreceptor AT₁ puede llevarse a cabo con la ayuda de dichos péptidos o proteínas de función análoga, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación o inmunotransferencia. Por ejemplo, los inmunoensayos según la invención pueden subdividirse en las siguientes etapas: (1) reacción anticuerpo antirreceptor AT₁/receptor AT₁, (2) si se requiere separación del complejo anticuerpo antirreceptor AT₁ de otros componentes de la mezcla reactiva, especialmente de anticuerpos antirreceptor AT₁ no unidos del receptor AT₁, y (3) medición de la respuesta. Como para la reacción anticuerpo antirreceptor AT₁/receptor AT₁, son tolerables varias configuraciones, por ejemplo, (a) precipitación de una reacción con un acceso de la otra, o (b) competición entre cantidades conocidas del anticuerpo antirreceptor AT₁ o del receptor AT₁ y el material que va a investigarse.

Por ejemplo, un ensayo para anticuerpos antirreceptor AT₁ puede llevarse a cabo (a) utilizando el acceso receptores AT₁/péptidos o proteínas de función análoga, o (b) la competición entre una cantidad conocida de un anticuerpo antirreceptor AT₁ marcado y un anticuerpo no marcado en una cantidad desconocida para una cantidad definida del receptor AT₁ o de péptidos o proteínas de función análoga.

El receptor AT₁ puede inmovilizarse sobre un soporte sólido para permitir la separación del complejo anticuerpo antirreceptor AT₁/receptor AT₁. Por ejemplo, el material del 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 microfluídico. Para medir la interacción anticuerpo antirreceptor AT₁/receptor AT₁, es posible, por ejemplo, utilizar anticuerpos antirreceptor AT₁ marcados, receptores AT₁, marcados o reactivos secundarios. El receptor AT₁ puede marcarse, por ejemplo, radioactiva o enzimáticamente o con compuestos fluorescentes. Independiente del marcador que se utilice, la respuesta de la interacción anticuerpo antirreceptor AT₁/receptor AT₁ puede potenciarse utilizando la afinidad de las proteínas avidina o estreptavidina por la biotina. El inmunoensayo utilizado según la invención puede ser: (1) inmunoensayo que utiliza marcadores radioactivos (a) radioinmunoensayo con unión competitiva (RIA) y (b) ensayo inmunoradiométrico (IRMA); (2) inmunoensayos que utilizan un marcador enzimático: (a) inmunoensayos enzimáticos (EIA) y (b) ensayos inmunoenzimáticos (ELISA); (3) inmunoensayos que utilizan una combinación de radioisótopos y marcadores enzimáticos (radioinmunoensayo enzimático ultrasensible, (USERIA). Además, el inmunoensayo según la invención puede ser un inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, un ensayo nefelométrico, un ensayo turbidimétrico, una Transferencia Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un ensayo informativo, por ejemplo, un ensayo de luciferasa.

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

La invención se refiere asimismo a la utilización de un receptor peptídico-AT₁ para el diagnóstico de una enfermedad reumática inflamatoria.

Además, en una forma de realización preferida, en la utilización según la invención, la enfermedad reumática inflamatoria se selecciona de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, lupus sistémico eritematoso e inflamación de las articulaciones.

ES 2 336 350 T3

La invención se refiere además a un equipo de investigación y/o diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad reumática inflamatoria, en el que el equipo comprende un péptido receptor-AT₁.

En una forma de realización preferida el equipo de investigación y/o diagnóstico comprende un péptido receptor AT₁.

En una forma de realización preferida el equipo de investigación y/o diagnóstico según la invención es para el diagnóstico de una enfermedad reumática inflamatoria, seleccionada de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, e inflamación de las articulaciones.

El equipo de ensayo inmunológico según la invención comprende el receptor AT₁ o los péptidos o proteínas de función análoga *per se*. El equipo de ensayo de la invención comprende por lo menos un receptor AT₁ completo o los péptidos o proteínas funcionalmente análogos de dicho receptor, unido opcionalmente a una fase sólida. Además, el equipo de ensayo puede también incluir tampones, conjugados específicos junto con una enzima, una solución de lavado y una solución sustrato, para detectar la reacción inmune y/o una solución de extinción. Utilizando estas sustancias, el experto en la materia podrá llevar a cabo, por ejemplo, un ELISA para detectar los anticuerpos antirreceptor AT₁. Los tampones, conjugados específicos más una enzima, la solución de lavado y la solución sustrato para detectar la reacción inmune y la solución de extinción son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, será suficiente tener un ensayo que incluya un receptor AT₁ o péptidos o proteínas del receptor AT₁ de función análoga y añadir los tampones u otras soluciones inmediatamente antes de ensayar el material biológico. Sin embargo, es posible asimismo proporcionar el equipo de ensayo con el receptor AT₁ o sus péptidos o proteínas funcionalmente análogos unidos a la fase sólida. Para detectar los anticuerpos antirreceptor AT₁, el conjugado específico, la solución de lavado, la solución de sustrato y la solución de extinción, que pueden ser componentes del equipo del ensayo, tienen que añadirse según un modo bien conocido para los expertos en la materia.

En otra forma de realización ventajosa de la invención, se prevé que el equipo de ensayo consista en una tira de ensayo que comprende el receptor AT₁ o sus péptidos o proteínas funcionalmente análogos inmovilizados en una fase sólida. Por ejemplo, la tira de ensayo puede sumergirse en el suero o en otras muestras del paciente e incubarse. Utilizando una reacción bioquímica específica en la tira de ensayo después de la formación del complejo receptor AT₁/anticuerpo antirreceptor AT₁, puede presentarse una reacción colorimétrica específica mediante la cual puede detectarse el anticuerpo antirreceptor AT₁.

El sistema de ensayo de la invención permite la cuantificación de los anticuerpos antirreceptor AT₁ directamente en una muestra, por ejemplo, en el plasma de los pacientes. El procedimiento de detección según la invención ahorra tiempo y no es costoso. Pueden ensayarse grandes cantidades de muestras, lo que se debe a la escasa cantidad del equipo que se requiere, pudiendo utilizarse laboratorios rutinarios.

Ejemplos

Ejemplo I

ELISA del receptor AT₁

Una placa apropiada de microtitulación revestida con estreptavidina se carga con el péptido biotinilado, que corresponde a un segmento de la secuencia aminoácida del receptor AT₁.

Dichos péptidos pueden ser AVHYQSN, (SEC ID n° 1), SHFYQTR (SEC ID n° 2) y/o GYYFDTN (SEC ID n° 3).

Entonces, 100 µl de solución por pocillo en la placa de microtitulación, se incubaron con 5 µg/ml en un tampón de dilución apropiado. Para medir la unión no específica, se rellenaron también los pocillos con 100 µl del tampón de dilución. El tampón de dilución puede incluir albúmina sérica bovina al 0,5%, 10 mM tampón fosfato (pH 7,4), 140 mM NaCl y TWEEN 20 al 0,05%.

A continuación del período de tiempo de la reacción, la solución peptídica se movió mediante decantación y cada pocillo se lavó tres veces con 250 µl de un tampón de lavado apropiado. Un tampón apropiado de lavado puede incluir 10 mM tampón fosfato (pH 7,4), 140 mM NaCl y TWEEN 20 al 0,1%. Entonces, 100 µl de suero por pocillo se diluyeron en un tampón de dilución y se dispusieron en ambos péptidos cargados, incubándose las placas comparativas. A continuación, los pocillos se limpiaron tal como se describe anteriormente.

Los anticuerpos unidos se detectaron utilizando anticuerpos de cabra antiinmunoglobulina G humana que presentaban peroxidasa unida. Entonces, el anticuerpo se diluyó en tampón de dilución y se incubó (100 µl/pocillo), seguido por tres etapas de lavado (véase anteriormente).

Después de la adición de 100 µl sobre una solución de sustrato preparada para utilización, (por ejemplo 3,3',5,5'-tetrametilbencidina), se desarrolló el color, dependiendo de la cantidad de peroxidasa presente en el pocillo. La reacción del sustrato se determinó añadiendo 100 µl de 0,5 M de ácido sulfúrico. La absorción se midió a 450 nm.

ES 2 336 350 T3

Para la evaluación, se determinó la diferencia entre las absorciones de las placas de microtitulación cargadas con el péptido y las placas comparativas sin péptido. En las muestras con una absorción más alta, la extinción era entonces positiva. La extinción se calculó a partir del valor promedio de la absorción de donadores negativos, más tres veces la desviación estándar. En general, en el ensayo se corealizó un control de la extinción o una serie de diluciones estándar que permitieron la cuantificación en unidades relativas.

Ejemplo II

Se ensayaron varios grupos de pacientes (con diagnóstico positivo), así como controles, con respecto a la presencia o ausencia del anticuerpo antirreceptor AT_1 . La Tabla I muestra el resultado obtenido.

TABLA I

Enfermedad	Presencia del anticuerpo antirreceptor AT_1 en %
Enfermedad reumatoidea	35
Pacientes sin enfermedad reumática inflamatoria	8,3

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad reumática inflamatoria, en el que la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de angiotensina-II-subtipo 1 se determina en una muestra a partir de un paciente que va a ser diagnosticado y en el que, la presencia de un anticuerpo antirreceptor de angiotensina-II-subtipo 1 indica la enfermedad.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enfermedad reumática inflamatoria se selecciona de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, lupus sistémico eritematoso e inflamación de las articulaciones.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antirreceptor de angiotensina-II-subtipo 1 se lleva a cabo detectando uno o más de los anticuerpos seleccionados de entre el grupo de anticuerpo IgA, anticuerpo IgG y anticuerpo IgM.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo IgG es seleccionado de entre el grupo de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el inmunoensayo es seleccionado de entre el grupo de inmunoprecipitación, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo de fluorescencia, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de aglutinación, un ensayo nefelométrico, un ensayo turbidimétrico, una Transferencia Western, un inmunoensayo competitivo, un inmunoensayo no competitivo, un inmunoensayo homogéneo, un inmunoensayo heterogéneo, un bioensayo y un ensayo informativo.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el ensayo informativo es un ensayo de luciferasa.
7. Procedimiento según la reivindicación 5 y 6, en el que el inmunoensayo es un ELISA.
8. Utilización de un péptido de receptor angiotensina-II-subtipo-1 para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad reumática inflamatoria.
9. Utilización según la reivindicación 8, en la que la enfermedad reumática inflamatoria se selecciona de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, lupus sistémico etitematoso e inflamación de las articulaciones.
10. Utilización de un kit de diagnóstico para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad reumática inflamatoria, en la que el kit comprende un péptido receptor de angiotensina-II-subtipo-1.
11. Utilización de un kit de diagnóstico según la reivindicación 10, en el que la enfermedad reumática inflamatoria se selecciona de entre el grupo de artritis reumatoide, fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, lupus sistémico etitematoso e inflamación de las articulaciones.

ES 2 336 350 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Celltrend GmbH

<120> Procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad que implica un anticuerpo antirreceptor AT₁

<130> FBP17498

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ala Val His Tyr Gln Ser Asn
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ser His Phe Tyr Gln Thr Arg
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Gly Tyr Tyr Phe Asp Thr Asn
1 5