

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/28 (2015.01) **G01N 33/493** (2015.01)
G01N 33/53 (2015.01) **G01N 33/543** (2015.01)
G01N 33/566 (2015.01) **G01N 33/68** (2015.01)
C07K 14/705 (2015.01) **C40B 30/00** (2015.01)
G01N 27/00 (2015.01)

(22) Data de pedido: **2010.01.27**

(30) Prioridade(s): **2009.01.28 US 147785 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.12.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.12.31**
031/2015

(73) Titular(es):

**INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH
INSTITUTE
NO. 195, SEC. 4, CHUNG HSING ROAD
CHUTUNG, HSINCHU, TAIWAN 310-40**

CN

(72) Inventor(es):

**TZU-LING TSENG
CHING-FANG LU
WEI-YA LIN
TSAI-WEI HSU
MARY YA-PING YEH**

**TW
TW
TW
TW
TW**

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **BIOMARCADORES ASSOCIADOS A NEFROPATIA**

(57) Resumo:

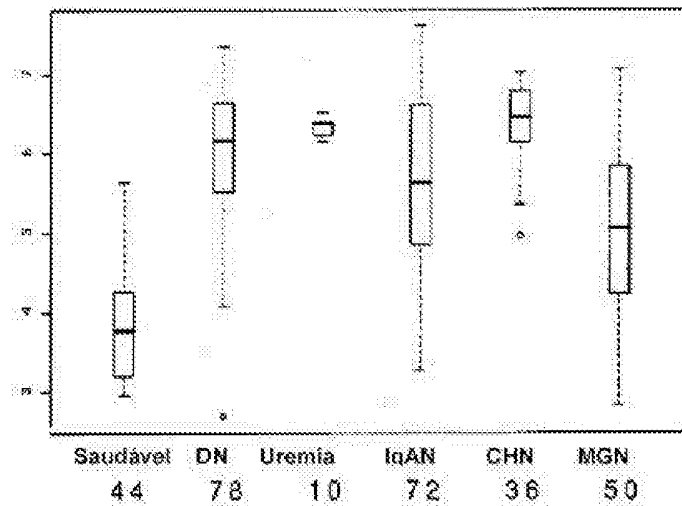
ESTE INVENTO ESTÁ RELACIONADO COM A MEDIÇÃO DE NÍVEIS DE MARCADORES DA URINA, ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA OU DE IMUNOENSAIO, PARA DIAGNÓSTICO DE NEFROPATIA, MONITORIZAÇÃO DA PROGRESSÃO DE NEFROPATIA, AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM TRATAMENTO DE NEFROPATIA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE RENAL DE UM AGENTE. ESTES BIOMARCADORES DA URINA INCLUEM O RECEPTOR-2 TIPO IG ASSOCIADO A LEUCÓCITOS, A GLICOPROTEÍNA ÁCIDA ALFA-1, SEUS FRAGMENTOS E COMBINAÇÕES DOS MESMOS.

RESUMO**"BIOMARCADORES ASSOCIADOS A NEFROPATIA"**

Este invento está relacionado com a medição de níveis de marcadores da urina, através de espectrometria de massa ou de imunoensaio, para diagnóstico de nefropatia, monitorização da progressão de nefropatia, avaliação da eficácia de um tratamento de nefropatia e avaliação da toxicidade renal de um agente. Estes biomarcadores da urina incluem o receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos, a glicoproteína ácida alfa-1, seus fragmentos e combinações dos mesmos.

Fig. 1

Dois picos combinados (log 10)



DESCRIÇÃO**"BIOMARCADORES ASSOCIADOS A NEFROPATIA"**

FUNDAMENTO DO INVENTO

A nefropatia, geralmente conhecida como doença renal, é causada por, entre outros, diabetes, hipertensão, toxicidade de fármacos e inflamação.

Tipicamente, a nefropatia é diagnosticada através da determinação do nível de proteinúria (e.g., o nível de albumina da urina) ou através do exame da velocidade de filtração glomerular (GFR), um indicador da função renal. Ambas as abordagens não são adequadas para a detecção de nefropatia numa fase precoce, a qual tipicamente não apresenta sintomas. Se bem que a nefropatia possa também ser detectada por biópsia renal, este procedimento invasivo não é uma abordagem de diagnóstico ideal.

É muito importante desenvolver um método de detecção de nefropatia na fase precoce. A chave para se conseguir este objectivo é identificar biomarcadores fiáveis associados a nefropatia incipiente.

Os trabalhos relevantes relacionados com este invento são resumidos como se segue.

O documento de Patente WO 2007/124419 A1 divulga um método e kit para a detecção precoce do estatuto de insuficiência renal. O referido documento descreve a detecção, numa determinada amostra, da presença de uma proteína seleccionada do grupo consistindo em aprotinina, microglobulina alfa-1 (A1M), glicoproteína ácida alfa-1 (A1AG), microalbumina e combinação das mesmas, cuja presença serve como biomarcador precoce de uma alteração do estado renal.

O documento de Patente WO 2008/141285 A2 divulga reagentes e métodos para o diagnóstico de doença renal num ser humano ou animal. Os métodos do referido documento compreendem o passo de testagem de uma amostra de urina, de um ser humano ou animal diabético, com um reagente imunológico imunologicamente específico para uma proteína ou péptido diferencialmente produzido na urina de um diabético tendo doença renal ou estando em risco de a desenvolver. Ainda, o reagente imunológico é imunologicamente específico para pelo menos uma proteína da urina, ou péptido da mesma, que é zinco alfa-2-glicoproteína, microglobulina alfa-1, glicoproteína alfa-1 ácida 1, glicoproteína alfa-lácida 1, etc.

A referência da literatura H. Jiang *et al.* (NEPHROLOGY 2009; 14, 332-337) descreve uma nova proteína relacionada com nefropatia diabética, orosomucóide (glicoproteína alfa-1 ácida), identificada pelo método prote-

ômico. A referida referência também ensina que a excreção urinária aumentada de orosomucóide é um preditor do risco de nefropatia diabética.

O documento de Patente WO 2008/021431 A2 divulga métodos e materiais envolvidos no diagnóstico e monitorização do estatuto de rejeição de transplante e distúrbio imune através da utilização de variantes de "splicing" para melhorar a avaliação da actividade imunológica ou inflamatória em amostras do indivíduo.

A referência da literatura S.A. Varghese *et al.* (J Am Soc Nephrol 18:913-922, 2007) descreve biomarcadores da urina preditores da causa de doença glomerular. A referida referência também divulga que vinte e uma manchas em gel das proteínas do doente são as mais importantes para a diferenciação das doenças e as manchas são identificadas por espectrometria de massa como formas carregadas de 11 proteínas do plasma: Orosomucóide, transferrina, α -1 microglobulina, zinco α -2 glicoproteína, α -1 antitripsina, factor B do complemento, haptoglobina, transtirretina, proteína do plasma de ligação ao retinol, albumina e hemopexina.

A referência da literatura M. Sharma *et al.* (Proteomics Clin Appl. 2008 June 18; 2(7-8): 1065-1086) descreve biomarcadores de proteínas urinárias da lesão por radiação. A referida referência ensina que a peptidase relacionada com calicreína 1 tecidular, inibidor de

proteínases de cisteína cistatina C e histidina oxidada são encontradas aumentadas, enquanto uma série de inibidores de proteínases, incluindo a proteína de ligação a calicreína e a albumina são encontradas em menor quantidade após irradiação.

A referência da literatura S. Jain *et al.* (JAPI. Vol. 53- JUNE 2005 (2005-06), páginas 513-520) descreve marcadores de proteínas da urina para a previsão precisa de distúrbio renal diabético. A análise 2-DGE das amostras de urina de doentes diabéticos tipo II revela quatro proteínas principais, juntamente com albumina, nestas amostras e são zinco glicoproteína alfa-2, glicoproteína ácida alfa-1, microglobulina alfa-1 e IgG.

A referência da literatura R.J. Lebbink *et al.* (The Journal of Immunology, 2008, 180:1662-1669) descreve um novo mecanismo de regulação imune, através de um receptor solúvel tipo Ig associado a leucócitos, que regula o potencial inibidor do receptor-1 tipo Ig associado a leucócitos ligado a membrana através da competição por ligandos.

O documento de Patente US 2004/0009901 A1 descreve métodos e materiais envolvidos no diagnóstico de condições de artrite, os quais são acompanhados por uma deficiência em NADPH oxidase, métodos e materiais envolvidos no tratamento, prevenção ou retardamento do estabelecimento de condições de artrite que são acompanhadas por

uma deficiência em NADPH oxidase e métodos e materiais envolvidos na identificação de agonistas e antagonistas da actividade de NADPH oxidase.

A referência da literatura S.G. Coca *et al.* (Kidney International (2008) 73, 1008-1016) descreve biomarcadores para o diagnóstico e estratificação de risco de lesão renal aguda. A referida referência também descreve que a cistatina C sérica e a lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos da urina, IL-18, etc. têm melhor desempenho no diagnóstico precoce da lesão renal aguda.

A referência da literatura W. Ouyang (Journal of Immunological Methods 292 (2004) 109-117) está relacionada com o estabelecimento de um sistema de ELISA para determinação dos níveis de receptor-1 solúvel tipo Ig de leucócitos no soro de doentes com febre hemorrágica com síndrome renal e transplante renal. A referida referência demonstra que o receptor-1 tipo Ig associado a leucócitos pode ser libertado quando os linfócitos são activados.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento baseia-se nas descobertas inesperadas que os níveis na urina do recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e da glicoproteína ácida alfa-1, e fragmentos destas duas proteínas com SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, respectivamente, são significativamente superiores num doente com nefropatia relativamente a um doente sem

nefropatia. Estas moléculas de proteína são portanto biomarcadores fiáveis para o diagnóstico de nefropatia na fase precoce.

Assim, um aspecto deste invento corresponde a um método de diagnóstico de nefropatia. Este método inclui pelo menos os seguintes passos: (a) obtenção de uma amostra de urina a partir de um indivíduo suspeito de ter nefropatia, (b) determinação na amostra de urina de um nível de um biomarcador, e (c) avaliação se o indivíduo possui nefropatia com base no nível do biomarcador. O biomarcador usado no método que acabámos de descrever é um dos seguintes: (i) receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos ou um seu fragmento que é DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1), (ii) uma combinação do atrás mencionado com glicoproteína ácida alfa-1 ou um seu fragmento que é GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2). Um aumento no nível do biomarcador atrás, ou combinação de biomarcadores, comparativamente com o de um indivíduo sem nefropatia, indica que o indivíduo possui nefropatia. Num exemplo, o nível do biomarcador é determinado por um ensaio de espectrometria de massa (e.g., espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz MALDI-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) e cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)). Num outro exemplo, é determinado através de um imunensaio (e.g., ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), transferência Western, radio-imunensaio (RIA), imunensaio de fluorescência (FIA) e imunensaio de luminescência (LIA)).

O método de diagnóstico de nefropatia atrás descrito é aplicável a humanos e a animais de laboratório, e.g., os que não têm proteinúria. O termo "um animal de laboratório" aqui usado refere-se a um animal vertebrado normalmente usado em testes com animais, e.g., murganho, rato, coelho, gato, cão, porco e primata não humano.

Um outro aspecto deste invento diz respeito a um método para a monitorização da progressão de nefropatia num indivíduo. Este método inclui (a) obtenção de uma primeira amostra de urina de um indivíduo que sofra de nefropatia (e.g., um ser humano ou um animal de laboratório), (b) determinação na primeira amostra de urina de um nível do biomarcador arás referido, ou combinação de biomarcadores, (c) obtenção de uma segunda amostra de urina do indivíduo 2 semanas a 12 meses após a primeira amostra de urina ser obtida, (d) determinação na segunda amostra de urina de um nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, e (e) avaliação da progressão da nefropatia no indivíduo. Um aumento no nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, na segunda amostra de urina, comparativamente com o da primeira amostra de urina, indica que a nefropatia está exacerbada no indivíduo. Quando o indivíduo é um ser humano na fase precoce da nefropatia, a segunda amostra de urina é obtida 6 a 12 meses após a primeira amostra de urina ser obtida. Para um indivíduo na fase tardia da nefropatia, a segunda amostra de urina pode ser obtida 3 a 6 meses mais tarde que a primeira amostra de urina. Quando

este método é aplicado a um animal de laboratório, a segunda amostra de urina pode ser obtida 2 a 24 semanas após a primeira amostra de urina ser obtida.

Ainda num outro aspecto, o presente invento proporciona um método para a monitorização da eficácia de um tratamento de nefropatia num doente com nefropatia, incluindo (a) determinação de um nível do biomarcador atrás mencionado, ou combinação de biomarcadores, numa amostra de urina do doente com nefropatia antes do tratamento, (b) determinação de um nível do biomarcador ou combinação de biomarcadores numa amostra de urina do doente após o tratamento e (c) avaliação da eficácia do tratamento com base numa alteração no nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, após o tratamento. Observa-se que o tratamento é eficaz quando o nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, pós-tratamento permanece igual ou é reduzido comparativamente com o nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, pré-tratamento.

Este invento também proporciona um método de avaliação da toxicidade renal de um agente, incluindo (a) obtenção de uma pluralidade de amostras de urina de um indivíduo tratado com um agente em vários pontos de tempo durante o tratamento, (b) determinação em cada uma das amostras de urina de um nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, e (c) avaliação da toxicidade renal do agente baseado numa alteração no nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, durante o tratamento. Um

aumento no nível do biomarcador ou combinação de biomarcadores no decurso do tratamento indica que o agente é tóxico para o rim. O agente pode ser um composto (e.g., um fármaco ou candidato a fármaco), um produto de ervanária e um produto alimentar.

O invento ainda proporciona um kit útil em qualquer um dos métodos atrás descritos. Este kit contém um primeiro anticorpo que se liga especificamente ao receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos e um segundo anticorpo que se liga especificamente à glicoproteína ácida alfa-1. Ambos os anticorpos podem ser moléculas de imunoglobulina completas. Num exemplo, este kit contém apenas anticorpos específicos contra antigénios a serem detectados (e.g., biomarcadores associados a nefropatia) para a realização de um dos métodos aqui descritos. Nomeadamente, consiste essencialmente em tais anticorpos.

Igualmente, dentro do âmbito deste invento encontra-se um anticorpo isolado que se liga especificamente a DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) ou a GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2). O termo "anticorpo isolado" aqui usado refere-se a um anticorpo substancialmente sem moléculas naturalmente associadas. Mais especificamente, uma preparação contendo o anticorpo é designada como "um anticorpo isolado" quando as moléculas naturalmente associadas na preparação constituem no máximo 20% por peso seco. A pureza pode ser medida através de um método adequado, e.g., cromatografia em coluna, electroforese em gel de poliacrilamida e HPLC.

Qualquer um dos anticorpos atrás descritos pode ser usado na produção de um kit útil na realização dos métodos deste invento.

Os detalhes de uma ou mais realizações do invento estão estabelecidos na descrição abaixo. Outras características ou vantagens do presente invento serão aparentes a partir da descrição detalhada de vários exemplos que se segue e também das reivindicações apensas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

São primeiro descritos os desenhos.

Fig. 1 é um diagrama que mostra um diagrama de caixa para os níveis combinados de um fragmento do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos e de um fragmento da glicoproteína ácida alfa-1 em controlos saudáveis e doentes com vários tipos de nefropatia. DN, IgAN, CHN e MGN referem-se a nefropatia diabética, nefropatia por IgA, nefropatia por produtos de ervanária chinesa e nefropatia por glomerulonefrite membranar. Os limites superior e inferior das caixas marcam os valores de 25% e 75%, com as medianas como linhas que atravessam as caixas. Os traços superiores marcam o maior valor abaixo do limite máximo, o qual é o valor 75% mais 1,5 de gama interquartil e o traço inferior marca o valor mais baixo acima do limite inferior, que é o valor 25% menos 1,5 de gama interquartil.

Fig. 2 é um diagrama que mostra um diagrama de caixa para os níveis combinados de um fragmento do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos e de um fragmento da glicoproteína ácida alfa-1 em controlos saudáveis e doentes com CHN. Os limites superior e inferior das caixas marcam os valores de 25% e 75% com as medianas como linhas que atravessam as caixas. Os traços superiores marcam o maior valor abaixo do limite máximo, o qual é o valor 75% mais 1,5 de gama interquartil e o traço inferior marca o valor mais baixo acima do limite inferior, que é o valor 25% menos 1,5 de gama interquartil.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Num aspecto, o presente invento está relacionado com um método para o diagnóstico de nefropatia baseado no nível de um biomarcador de urina, o qual pode ser o receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos (GenBank número de acesso CAQ08962, 10-Jan-2010), glicoproteína ácida alfa-1 (GenBank número de acesso EAW87416; 10-Jan-2010), um fragmento de qualquer uma das proteínas ou uma combinação dos mesmos. O fragmento de qualquer uma das proteínas possui um comprimento mínimo de dez aminoácidos e, de preferência, um comprimento máximo de 120 a 200 aminoácidos. Por exemplo, os fragmentos do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos e da glicoproteína ácida alfa-1 podem conter até 125 e 191 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Num exemplo, o fragmento do receptor-2

tipo Ig associado a leucócitos é DFLELLLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) e um fragmento da glicoproteína ácida alfa-1 é GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2).

Cada um dos biomarcadores da urina atrás referidos pode ser usado no diagnóstico de qualquer tipo de nefropatia, incluindo a relacionada com diabetes (*i.e.*, nefropatia diabética), glomerulonefrite resultante do depósito de IgA em tecidos renais (*i.e.*, nefropatia por IgA), inflamação (*e.g.* glomerulonefrite membranar), fibrose renal induzida por ervas chinesas (*i.e.*, nefropatia por produtos de ervanária chinesa), lesão tubulointersticial crónica, a qual leva a falência renal (*i.e.*, nefrite intersticial crónica) e glomeruloesclerose segmentar focal.

Para executar o método de diagnóstico deste invento, obtém-se uma amostra de urina de um indivíduo suspeito de ter nefropatia e o nível de qualquer um dos biomarcadores referidos atrás é então determinado por métodos convencionais, *e.g.*, ELISA e transferências Western. Quando o biomarcador é um péptido ou uma combinação de péptidos, o seu nível pode ser determinado através de um ensaio de espectrometria de massa. O nível do biomarcador da urina pode ser então comparado com um ponto de referência representando o nível do mesmo biomarcador da urina num indivíduo sem nefropatia. O ponto de referência pode ser determinado através de prática de rotina baseada no nível representativo de um biomarcador de urina num grupo de doentes com nefropatia versus o do grupo de

indivíduos sem nefropatia. Por exemplo, pode ser o ponto médio entre os níveis médios destes dois grupos. Quando o nível do biomarcador da urina no indivíduo é superior ao ponto de referência, ele indica que o sujeito tem nefropatia.

Quando necessário, os doentes que possuem nefropatia com alterações mínimas (MCN) ou doença com alterações mínimas (MCD) podem ser usados como grupos controlo para determinação do ponto de referência mencionado atrás. De um modo geral, os doentes MCN e MCD apresentam proteinúria óbvia mas funções renais normais.

Quando é usado um fragmento do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos ou da da glicoproteína ácida alfa-1, o método de diagnóstico deste invento pode ser aplicado para detectar nefropatia incipiente quando a presença de proteínas (e.g. albumina) na urina não é detectável, *i.e.*, sem proteinúria.

Num outro aspecto, este invento está relacionado com um método de monitorização da progressão de nefropatia num indivíduo baseado em qualquer um dos biomarcadores da urina atrás descritos. Para a realização deste método, podem ser obtidas duas amostras de urina de um indivíduo dentro de um período de tempo adequado (e.g., 2 semanas a 12 meses) e avaliadas para determinar os níveis de um dos biomarcadores da urina atrás descritos. Se o nível de biomarcador da urina na última amostra de urina obtida for

superior ao da amostra de urina obtida mais cedo, isto indica que a nefropatia está a progredir no indivíduo.

O método de monitorização pode ser aplicado a um ser humano que sofra de nefropatia ou que esteja em risco de a contrair. Quando o ser humano está em risco de nefropatia ou está na fase precoce da nefropatia, o nível de biomarcador na urina pode ser determinado uma vez cada 6 a 12 meses para monitorizar a progressão da nefropatia. Quando o ser humano já está na fase tardia da nefropatia, é preferido que o nível de biomarcador na urina seja determinado uma vez cada 3 a 6 meses. Ainda que tendo lesão do rim, os doentes com nefropatia na fase precoce são geralmente assintomáticos e apresentam funções renais normais. Estes doentes estão em risco de progressão de nefropatia. A nefropatia na fase mais avançada caracteriza-se por um declínio progressivo de GFR (e.g., <15 ml/minuto/1,73 m²).

O método de monitorização atrás descrito é igualmente aplicável a um animal de laboratório, seguindo procedimentos de rotina, para estudar nefropatia. De preferência, o animal de laboratório é examinado uma vez cada 2 a 24 semanas para determinar o nível de um dos biomarcadores da urina atrás mencionados. Um aumento no nível do biomarcador ao longo do tempo indica que a doença progride no animal.

Ainda num outro aspecto, o presente invento

proporciona um método para avaliação da eficácia de um tratamento de nefropatia num indivíduo necessitado (*i.e.*, um doente humano com nefropatia ou um animal de laboratório portador de lesão renal). Neste método, os níveis de um dos biomarcadores da urina atrás descritos são determinados antes, durante e/ou após o tratamento. Se o nível do biomarcador da urina permanecer o mesmo ou diminuir no decurso do tratamento, isto indica que o tratamento é eficaz.

Qualquer um dos biomarcadores da urina pode ser igualmente usado para monitorizar a toxicidade renal de um agente alvo, *i.e.*, se um agente induzir lesão renal. O agente alvo pode ser qualquer composto ou composição para administração humana. Exemplos incluem, mas não lhes estão limitados, compostos químicos, os quais podem ser fármacos (*e.g.*, fármacos anti-inflamatórios não esteróides) ou outros candidatos a fármacos, produtos ou suplementos alimentares e suplementos de ervas. A toxicidade renal de um agente alvo é indicada pela sua capacidade para aumentar o nível de um biomarcador da urina ao longo do tempo.

É também aqui descrito um kit útil na realização de qualquer um dos métodos atrás descritos. Este kit possui pelo menos dois anticorpos, um específico do receptor-2 tipo Ig, *e.g.* capaz de se ligar ao seu fragmento DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) ou qualquer epitopo nele contido, e o outro específico da glicoproteína ácida alfa-1, *e.g.*, capaz de se ligar ao seu fragmento

GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2) ou qualquer epitopo ali contido. Num exemplo, o kit inclui dois anticorpos diferentes (*i.e.*, um anticorpo de revestimento e um anticorpo de detecção) que se ligam ao mesmo biomarcador. Tipicamente, o anticorpo de detecção é conjugado com uma molécula que emite um sinal detectável por si só ou através da ligação a um outro agente. O termo "anticorpo" aqui usado refere-se a uma imunoglobulina completa ou a um fragmento da mesma, como seja Fab ou F(ab')₂ que mantém a actividade de ligação ao antigénio. Pode ser natural ou geneticamente manipulado (*e.g.*, anticorpo de cadeia simples, anticorpo quimérico ou anticorpo humanizado).

Os anticorpos incluídos no kit deste invento podem ser obtidos a partir de vendedores comerciais. Como alternativa, eles podem ser preparados por métodos convencionais. Ver, por exemplo, Harlow and Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Para produzir anticorpos contra um biomarcador particular como listado atrás, o marcador, facultativamente acoplado a uma proteína veículo (*e.g.*, KLH), pode ser misturado com um adjuvante e injectado num animal hospedeiro. Os anticorpos produzidos no animal podem ser então purificados por cromatografia de afinidade. Os animais hospedeiros normalmente empregues incluem coelhos, murganhos, cobaios e ratos. Vários adjuvantes que podem ser usados para aumentar a resposta imunológica dependem da espécie hospedeira e incluem adjuvante de Freund (completo

e incompleto), géis minerais tais como hidróxido de albumina, CpG, substâncias tensioactivas tais como lisolecitina, polióis plurónicos, polianiões, péptidos, emulsões de óleo, hemocianina de lapa e dinitrofenol. Adjuvantes úteis para uso humano incluem BCG (bacilo Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Os anticorpos policlonais, *i.e.*, populações heterogéneas de moléculas de anticorpo, estão presentes no soro dos animais imunizados.

Os anticorpos monoclonais, *i.e.*, populações homogéneas de moléculas de anticorpo, podem ser preparados usando tecnologia de hibridomas convencional (ver, por exemplo, Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256, 495; Kohler *et al.* (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 511; Kohler *et al.* (1976) *Eur J Immunol* 6, 292; and Hammerling *et al.* (1981) *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y.). Em particular, podem ser obtidos anticorpos monoclonais através de qualquer técnica que proporcione a produção de moléculas de anticorpo por linhas celulares contínuas em cultura, tal como descrito em Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256, 495 e U.S. Pat. No. 4,376,110; a técnica de hibridomas de células B humanas (Kosbor *et al.* (1983) *Immunol Today* 4, 72; Cole *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026, e a técnica de hibrodmas com EBV (Cole *et al.* (1983) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Tais anticorpos podem ser de qualquer classe de imunoglobulina incluindo IgG, IgM, IgE, IgA e IgD e de qualquer subclasse destas. O hibridoma produtor dos anticorpos monoclonais do invento pode ser cultivado *in vitro* ou *in vivo*. A capacidade de produzir

títulos elevados de anticorpos monoclonais *in vivo* torna-o um método de produção particularmente útil.

Ainda, podem ser gerados fragmentos de anticorpos através de técnicas conhecidas. Por exemplo, tais fragmentos incluem, mas não lhes estão limitados, fragmentos $F(ab')_2$ que podem ser produzidos por digestão com pepsina de uma molécula de anticorpo e fragmentos Fab que podem ser gerados através da redução de pontes dissulfeto dos fragmentos $F(ab')_2$.

Sem mais elaboração, pensa-se que os familiarizados com a arte podem, com base na descrição atrás, utilizar o presente invento na sua plenitude. As realizações específicas que se seguem são, portanto, pensadas com fins meramente ilustrativos e não limitantes de alguma forma da restante divulgação.

Exemplo 1: Diagnóstico de nefropatia usando como biomarcador o receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos ou a glicoproteína ácida alfa-1

Material e métodos

(i) Indivíduos

Neste estudo participaram os seguintes grupos de indivíduos humanos:

(a) dadores saudáveis: sem diabetes mellitus com funções renais normais,

(b) doentes DM: tendo diabetes mellitus tipo 2, mas sem nefropatia,

(c) doentes DN: com nefropatia diabética,

(d) doentes DN com uremia: tendo DN associada a uremia,

(e) doentes IgAN: tendo nefropatia por IgA,

(f) doentes MGN: tendo glomerulonefrite membranar

(g) doentes CHN: tendo nefropatia induzida por fitoterapia chinesa e

(h) doentes CIN: tendo nefrite intersticial crónica.

As características clínicas dos dadores saudáveis e dos doentes estão resumidas na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Características dos doentes

	Saudável	DM	DN	DN uremia	IgAN	MGN	CHN	CIN
Idade, média (DP)	67,94 (12,30)	57,33 (10,52)	72,38 (7,44)	58,14 (12,79)	28,33 (12,31)	38,00 (13,11)	47,42 (10,43)	59,88 (7,62)
Mulheres, n(%)	6 (37,5)	2 (33,33)	1 (12,5)	2 (28,57)	4 (44,44)	2 (66,67)	14 (73,68)	4 (50,00)
Creatinina sérica (mg/dl), média (DP)	0,86 (0,14)	0,85 (0,24)	1,39 (0,49)	4,23 (4,65)	1,03 (0,48)	0,60 (0,20)	5,39 (5,39)	3,54 (2,28)
MDRD_S_GFR, média (DP)	86,28 (13,19)	106,86 (70,47)	58,60 (20,75)	58,02 (61,53)	104,29 (56,19)	144,96 (55,15)	22,70 (17,07)	24,32 (15,91)

(ii) Ensaio MALDI-MS

Amostras de urina da porção média da micção foram colhidas ao início da manhã dos grupos de indivíduos humanos atrás listados. Estas amostras de urina, derivadas

de dadores saudáveis e de doentes, misturadas com inibidores de proteases, foram analisadas por MALDI-TOF-MS. Os candidatos a péptidos que estavam diferencialmente presentes no grupo de dadores saudáveis e nos vários grupos de doentes foram identificados por comparação dos padrões de polipéptidos entre cada grupo de doentes e o grupo dos dadores saudáveis, tendo em consideração a avaliação estatística dos parâmetros demográficos e da amostra. Estes péptidos foram purificados, as suas sequências de aminoácidos determinadas através de tecnologia de rotina.

(iii) Ensaio de transferência Western

A análise de transferência Western foi realizada usando anticorpos específicos contra o fragmento do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos DFLELLVKGTVPGTEAS-GFDAP (SEQ ID NO:1) e o fragmento de glicoproteína ácida alfa-1 é GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2), seguindo tecnologia de rotina. Os resultados foram normalizados contra o nível de creatinina ou de proteína na mesma amostra.

(iv) ELISA

As amostras de urina foram misturadas com inibidores de protease e diluídas a 1:100 com um tampão de diluição e as amostras de soro foram diluídas a 1:10. As amostras diluídas foram colocadas em placas de ELISA em triplicados. As concentrações de receptor-2 tipo Ig

associado a leucócitos e de glicoproteína ácida alfa-1 foram determinadas através de um método de ELISA tipo sanduíche convencional e normalizadas contra o nível de creatinina ou proteína na mesma amostra.

Resultados

Através do ensaio de MALDI-MS atrás descrito, os péptidos DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) e GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2) foram detectados em amostras de urina de doentes com nefropatia em níveis muito mais elevados comparativamente com amostras de urina de indivíduos saudáveis. SEQ ID NOS:1 e 2 são fragmentos de recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e de glicoproteína ácida alfa-1, respectivamente. As taxas de positivos para estes dois péptidos no grupo dador saudável e em vários grupos de doentes estão apresentadas na Tabela 2 abaixo:

Categorias	Grupos	Números de doentes	Taxa de positivos para SEQ ID NO:2 N/%	Taxas de positivos para SEQ ID NO:1 N/%
Saudáveis	Saúde	19	0 (0%)	1 (5,3%)
Nefropatia diabética	DM	7	0 (0%)	2 (28,6%)
	DN	8	2 (25%)	8 (100%)
	DN uremia	11	6 (54,5%)	8 (72,7%)
Nefropatia mediada por imunidade	IgAN	12	0 (0%)	8 (66,7%)
	MGN	3	0 (0%)	2 (66,7%)
Nefrite intersticial	CHN	18	10 (55,6%)	17 (94,4%)
	CIN	7	3 (42,9%)	7 (100%)
Total		85	21	53

Os resultados também mostram que os níveis na urina destes dois péptidos nos doentes com nefropatia não estavam correlacionados com proteinúria, indicando que podem ser usados para detectar lesões do rim antes do aparecimento de proteínas, particularmente albumina, na urina.

Ainda, encontrou-se que os níveis na urina destes dois péptidos nos doentes com nefropatia apresentam correlações inversas com GFR, indicando que podem servir como marcadores para a monitorização de alterações na função renal e progressão da nefropatia.

Através dos ensaios de ELISA e transferência Western atrás descritos, encontrou-se que o recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e a glicoproteína ácida alfa-1 estão presentes diferencialmente nas amostras de urina de doentes com nefropatia (e.g., doentes tendo nefropatia induzida por produtos de ervanária chinesas) versus amostras de urina de controlos saudáveis. Ver Tabela 3 abaixo. Mais especificamente, a presença de qualquer uma das proteínas em amostras de urina de controlos saudáveis era quase indetectável, enquanto um nível mais elevado da proteína foi encontrado nas amostras de urina de doentes com nefropatia. Este resultado indica que qualquer uma das proteínas pode ser usada no diagnóstico de nefropatia.

Tabela 2: Razão entre glicoproteína ácida alfa-1 e creatinina em vários grupos de doentes

	Saudável	DM	DN	IgAN	MGN	CHN	CIN	Uremia DN
AGP/Cr (ng/mg) x	2,57	2,91	29,18	15,52	139,51	19,55	51,31	97,13
1000 média (DP)	(2,52)	(1,68)	(30,93)	(20,87)	(137,53)	(39,36)	(65,46)	(140,60)

Exemplo 2: Diagnóstico de nefropatia usando como biomarcador a combinação de recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e glicoproteína ácida alfa-1

Os níveis de recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e de glicoproteína ácida alfa-1 de controlos saudáveis e de doentes com nefropatia (incluindo doentes com nefropatia diabética, uremia, nefropatia por IgA, nefropatia induzida por produtos de ervanária chinesa e nefropatia por glomerulonefrite membranar) foram determinados como descrito no Exemplo 1 atrás.

Como se mostra na Fig. 1, o nível combinado dos dois marcadores proteicos atrás mencionados foi muito mais elevado em doentes com todos os tipos de nefropatia comparativamente com o dos controlos saudáveis (AUROC = 0,93). Isto indica que o recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e a glicoproteína ácida alfa-1, em combinação, podem ser usados como um biomarcador fiável para o diagnóstico de nefropatia com elevada sensibilidade e especificidade.

Observou-se que a combinação do recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e da glicoproteína ácida alfa-1 na

urina é particularmente fiável na detecção de nefropatia induzida por produtos de ervanária chinesa. Ver Fig. 2. O AUROC obtido a partir deste estudo atinge 1,0, indicando que a precisão do diagnóstico é de 100% quando se usa este biomarcador no diagnóstico de doentes com nefropatia induzida por produtos de ervanária chinesa.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Yeh Mary Ya-Ping
 Tseng, Tzu-Ling
 Lu, Ching-Fang
 Lin, Wei-Ya
 Hsu, Tsai-Wei
 Chen, Yi-Ting
 Yang, Chwei-Shiun

<120> BIOMARCADORES ASSOCIADOS A NEFROPATIA

<130> 70006-009001

<150> 61/147,785
 <151> 2009-01-28

<160> 2

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> fragmento do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos

<400> 1
Asp Phe Leu Glu Leu Leu Val Lys Gly Thr Val Pro Gly Thr Glu Ala
1 5 10 15
Ser Gly Phe Asp Ala Pro
20

<210> 2
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> fragmento da glicoproteína ácida alfa-1

PE2391653

- 25 -

<400> 2

Gly	Gln	Glu	His	Phe	Ala	His	Leu	Leu	Ile	Leu	Arg	Asp	Thr	Lys	Thr
1				5					10					15	
Tyr	Met	Leu	Ala	Phe	Asp	Val	Asn	Asp	Glu	Lys	Asn	Trp	Gly	Leu	Ser
			20					25					30		

Lisboa, 6 de fevereiro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de diagnóstico de nefropatia num indivíduo, compreendendo:

obtenção de uma amostra de urina a partir de um indivíduo suspeito de ter nefropatia, determinação na amostra de ruina de um nível de um biomarcador, ou combinação de biomarcadores, selecionado do grupo consistindo em

(i) recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos, ou um seu fragmento, e

(ii) uma combinação do recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos, ou de um seu fragmento, e da glicoproteína ácida alfa-1, ou um seu fragmento,

em que o fragmento de recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos é DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) e o fragmento da glicoproteína ácida alfa-1 é GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2); e avaliação se o indivíduo possui nefropatia baseada no nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, em que um aumento no nível do biomarcador, ou da combinação de biomarcadores, comparativamente com um ponto de referência representando o nível do mesmo biomarcador ou combinação de biomarcadores num indivíduo sem nefropatia, indica que o indivíduo

possui nefropatia, em que o ponto de referência é o ponto médio entre o nível médio do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, num grupo de doentes com nefropatia e o de um grupo de indivíduos sem nefropatia.

2. O método da reivindicação 1, em que o nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, é determinado por um ensaio de espectrometria de massa ou por um imunoensaio.

3. O método da reivindicação 2, em que o ensaio de espectrometria de massa é seleccionado do grupo consistindo em espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz MALDI-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) e cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)).

4. O método da reivindicação 2, em que o ensaio imune é seleccionado do grupo consistindo em ensaio imunosorvente ligado a enzima (ELISA), transferência Western, radioimunoensaio (RIA), imunoensaio de fluorescência (FIA) e imunoensaio de luminescência (LIA)).

5. O método da reivindicação 1, em que o indivíduo é um ser humano.

6. O método da reivindicação 1, em que o indivíduo é um animal de laboratório.

7. O método da reivindicação 1, em que o biomarcador é o receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos.

8. O método da reivindicação 1, em que o biomarcador é o fragmento do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos.

9. O método da reivindicação 7 ou 8, em que o indivíduo não tem proteinúria.

10. O método da reivindicação 1, em que a combinação de biomarcadores é a combinação do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos e da glicoproteína ácida alfa-1.

11. O método da reivindicação 1, em que a combinação de biomarcadores é a combinação do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos e do fragmento de glicoproteína ácida alfa-1.

12. O método da reivindicação 1, em que a combinação de biomarcadores é a combinação do fragmento do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos e da glicoproteína ácida alfa-1.

13. O método da reivindicação 1, em que a combinação de biomarcadores é a combinação do fragmento do receptor-2 tipo Ig associado a leucócitos e do fragmento da glicoproteína ácida alfa-1.

14. O método da reivindicação 10, 11, 12 ou 13, em que o indivíduo não tem proteinúria.

15. Um método para monitorização da progressão de nefropatia num indivíduo, compreendendo:

obtenção de uma primeira amostra de urina de um indivíduo que sofre de nefropatia;
determinação na primeira amostra de urina de um nível de um biomarcador, ou combinação de biomarcadores, seleccionado do grupo consistindo em

(i) recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos, ou um seu fragmento, e

(ii) uma combinação do recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos, ou um seu fragmento, e da glicoproteína ácida alfa-1, ou um seu fragmento,

em que o fragmento de recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos é DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) e o fragmento da glicoproteína ácida alfa-1 é GQEHFAHLLI-LRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2);

obtenção de uma segunda amostra de urina a partir do indivíduo 2 semanas a 12 meses após a primeira amostra de urina ser obtida;

determinação na segunda amostra de urina de um nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores; e
avaliação da progressão da nefropatia no indivíduo,

em que um aumento no nível do biomarcador, ou da combinação de biomarcadores, na segunda amostra de urina, comparativamente com o da primeira amostra de urina, indica que a nefropatia está exacerbada no indivíduo.

16. O método da reivindicação 15, em que o indivíduo é um ser humano na fase inicial da nefropatia e a segunda amostra de urina é obtida 6 a 12 meses após a primeira amostra de urina ser obtida.

17. O método da reivindicação 15, em que o indivíduo é um ser humano numa fase mais tardia da nefropatia e a segunda amostra de urina é obtida 3 a 6 meses após a primeira amostra de urina ser obtida.

18. O método da reivindicação 15, em que o indivíduo é um animal de laboratório e a segunda amostra de urina é obtida 2 a 24 semanas após a primeira amostra de urina ser obtida.

19. Um método para monitorização da eficácia de um tratamento da nefropatia num indivíduo que sofra de nefropatia, compreendendo:

determinação na primeira amostra de urina de um nível de um biomarcador, ou combinação de biomarcadores, seleccionado do grupo consistindo em

- (i) recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos, ou um seu fragmento, e
- (ii) uma combinação do recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos, ou um seu fragmento, e da glicoproteína ácida alfa-1, ou um seu fragmento,

em que o fragmento de recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos é DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) e o fragmento da glicoproteína ácida alfa-1 é GQEHFAHLLIL-RDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2);

determinação de um nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, numa amostra de urina do indivíduo após o tratamento;

avaliação da eficácia do tratamento baseada numa alteração no nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, após o tratamento,

em que o tratamento é eficaz se o nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, após o tratamento permanecer inalterado ou estiver reduzido comparativamente com o de antes do tratamento.

20. Um método de avaliação da toxicidade renal de um agente compreendendo:

obtenção de uma pluralidade de amostras de urina de um indivíduo tratado com um agente em vários pontos de tempo durante o tratamento,

determinação em cada uma das amostras de urina de um nível de um biomarcador, ou combinação de biomarcadores, seleccionado do grupo consistindo em

(i) recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos, ou um seu fragmento, e

(ii) uma combinação do recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos, ou um seu fragmento, e da glicoproteína ácida alfa-1, ou um seu fragmento,

em que o fragmento de recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos é DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) e o fragmento da glicoproteína ácida alfa-1 é GQEHFAHLLIL-RDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2);

avaliação da toxicidade renal do agente baseada numa alteração no nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, durante o tratamento,

em que um aumento no nível do biomarcador, ou combinação de biomarcadores, no decurso do tratamento indica que o agente é tóxico para o rim.

21. O método da reivindicação 20, em que o agente é seleccionado do grupo consistindo num composto, num produto de ervanária e num produto alimentar.

22. Um kit para o diagnóstico de nefropatia, compreendendo um primeiro anticorpo que se liga especificamente ao recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e um segundo anticorpo que se liga especificamente à glicoproteína ácida alfa-1.

23. O kit da reivindicação 22, em que o primeiro e segundo anticorpos são moléculas de imunoglobulina completas.

24. O kit da reivindicação 22, em que o kit consiste num primeiro anticorpo que se liga especificamente ao recetor-2 tipo Ig associado a leucócitos e num segundo anticorpo que se liga especificamente à glicoproteína ácida alfa-1.

Lisboa, 6 de fevereiro de 2015

Fig. 1

Dois picos combinados (log 10)

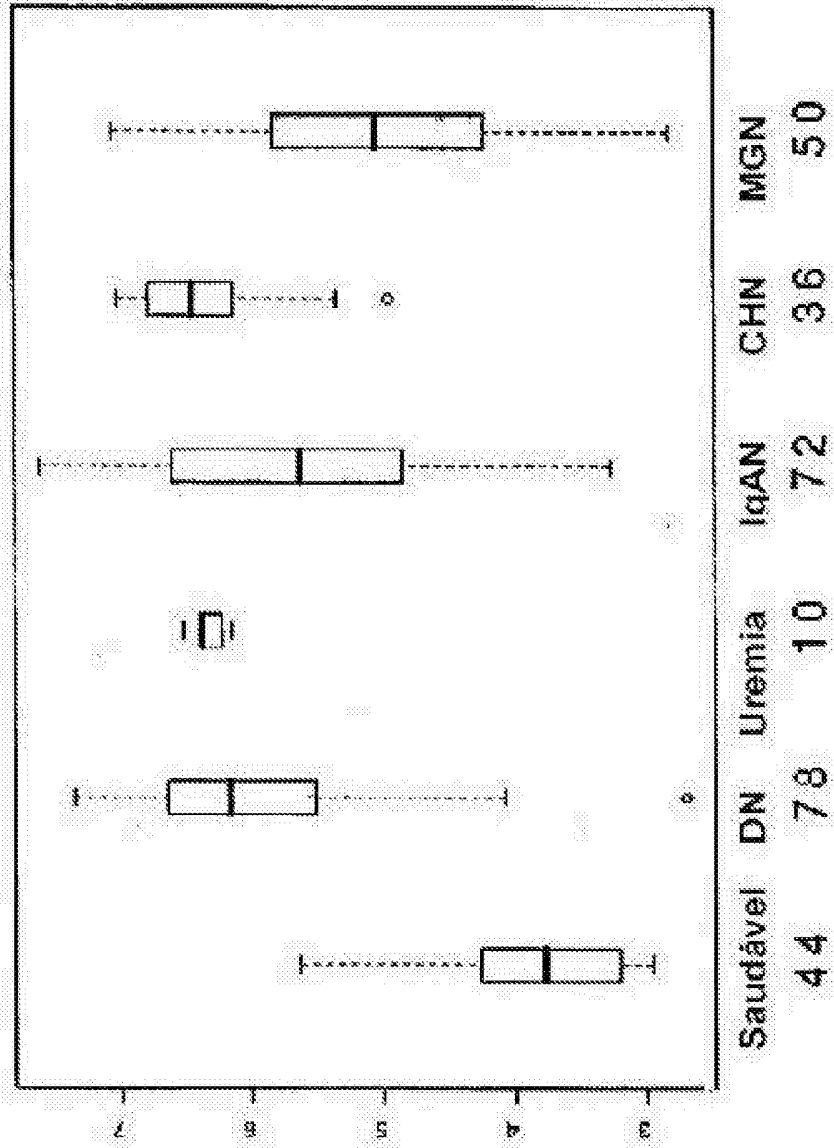
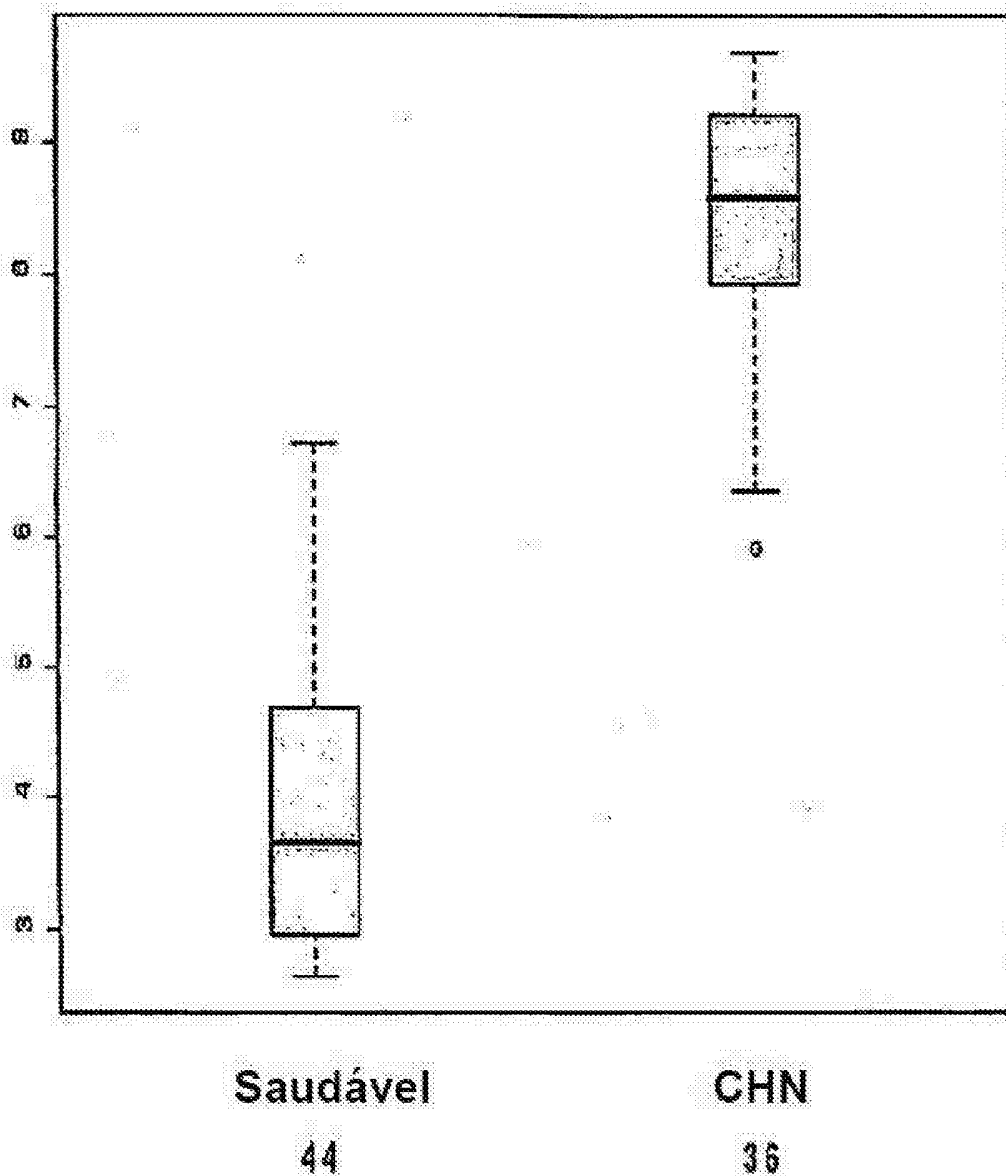


Fig. 2

Dois picos combinados (log 10)



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2007124419 A1
- WO 2008141285 A2
- WO 2008021431 A2
- US 20040009901 A1
- US 4376110 A
- US 61147785 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- H. JIANG et al. *NEPHROLOGY*, 2009, vol. 14, 332-337
- S.A. VARGHESE et al. *J Am Soc Nephrol*, 2007, vol. 18, 913-922
- M. SHARMA et al. *Proteomics Clin Appl.*, 18 June 2008, vol. 2 (7-8), 1065-1086
- S. JAIN et al. *JAPI*, June 2005, vol. 53, 513-520
- R. J. LEBBINK et al. *The Journal of Immunology*, 2008, vol. 180, 1662-1669
- S. G. COCA et al. *Kidney International*, 2008, vol. 73, 1008-1016
- W. OUYANG. *Journal of Immunological Methods*, 2004, vol. 292, 109-117
- HARLOW ; LANE. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495
- KOHLER et al. *Eur. J. Immunol.*, 1976, vol. 6, 511
- KOHLER et al. *Eur J Immunol*, 1976, vol. 6, 292
- HAMMERLING et al. *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*. Elsevier, 1981
- KOSBOR et al. *Immunol Today*, 1983, vol. 4, 72
- COLE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 2026
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1983, 77-96