

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 798**

51 Int. Cl.:
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07802440 .3**
96 Fecha de presentación: **31.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2057467**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO DE UNA ENFERMEDAD QUE IMPLICA UN ANTICUERPO ANTIRECEPTOR AT1.**

30 Prioridad:
04.08.2006 EP 06016296

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2011

73 Titular/es:
**CELLTREND GMBH
IM BIOTECHNOLOGIEPARK
14943 LUCKENWALDE, DE**

72 Inventor/es:
**SCHULZE-FORSTER, Kai y
HEIDECKE, Harald**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 369 798 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 de diagnóstico de una enfermedad que implica un anticuerpo antireceptor AT1.

- 5 La conectivitis es el término para un grupo de enfermedades autoinmunitarias poco frecuentes. En ella, el cuerpo crea anticuerpos contra partes del tejido conectivo. Las conectivitis son enfermedades tales como SLE, lupus diseminado, granulomatosis de Wegener, el síndrome CREST y el síndrome SHARP. La conectivitis es difícil de diagnosticar. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una herramienta para el diagnóstico de la conectivitis.
- 10 Aproximadamente 100 millones de personas en Europa padecen alguna forma de enfermedad inflamatoria o reumática degenerativa, lo cual provoca que el impacto de las enfermedades reumáticas en las sociedades europeas sea abrumador para la sociedad. Las enfermedades de las articulaciones totalizan la mitad de todas las enfermedades crónicas en las personas de 65 años de edad y mayores.
- 15 La calidad de vida de aproximadamente el 7,5% de la población europea se ve reducida de manera grave por el dolor y la insuficiencia funcional producida por las enfermedades reumáticas. Actualmente, la inmovilidad y la esperanza de vida reducida son las consecuencias más drásticas de estas enfermedades incurables. Solo en Europa, las enfermedades reumáticas suponen una carga económica de 200.000 millones de euros al año. De hecho, el impacto de las enfermedades reumáticas en una carga social y económica aumentará drásticamente a medida que envejezca la población europea. Una nueva terapia que tiene como objetivo las moléculas implicadas en la patogenia de las enfermedades inflamatorias crónicas se ha desarrollado en los últimos años. A pesar de estos esfuerzos los inventores no pueden todavía curar la mayoría de las enfermedades reumáticas. Un reto terapéutico incluye la cronicidad de la inflamación, la autoinmunidad y la degeneración del sistema muscular esquelético.
- 20 Aunque, las enfermedades reumáticas se diferencian en su inmunopatología, comparten mecanismos comunes de iniciación y perpetuación. Por otra parte, existe un considerable potencial de traslación para la comprensión de otras enfermedades que implican al sistema inmunitario, por ejemplo las enfermedades autoinmunitarias, la alergia y la infección. La diversidad de enfermedades reumáticas, la multiplicidad de tejidos implicados, es decir, hueso, cartílago, articulaciones, riñones, piel, vasos sanguíneos y el método interdisciplinar requieren comprender la base molecular de estas enfermedades que hacen muy difícil su diagnóstico.
- 25 Con frecuencia, el diagnóstico de la artritis y de otras enfermedades reumáticas es difícil, ya que muchos síntomas son similares entre las diferentes enfermedades. Para hacer un diagnóstico preciso, un médico puede necesitar realizar una revisión de los antecedentes médicos, llevar a cabo un examen físico, obtener análisis de laboratorio, pruebas de rayos X y otras pruebas de detección por la imagen. Las enfermedades reumáticas son, por ejemplo la artritis reumatoide, la fibromialgia, lupus eritematoso, polimialgia reumática, esclerosis generalizada progresiva, el síndrome de Sjögren, eremátodos de lupus diseminado e inflamación articular.
- 30 El American College of Rheumatology ha definido (1987) numerosos criterios para el diagnóstico, por ejemplo, de la artritis reumatoide. La rigidez matutina de más de una hora, la artritis y la hinchazón del tejido blando de más de 3 de 14 articulaciones/grupos de articulaciones, la artritis de las articulaciones de la mano, la artritis simétrica, los nódulos subcutáneos en ardores específicos, el factor reumatoide a un nivel superior al 95^o percentil y los cambios radiológicos sugeridos de erosión articular. Al menos deben cumplirse cuatro criterios para establecer el diagnóstico, aunque muchos pacientes son tratados a pesar de no reunir los criterios. Cuando la artritis reumatoide es clínicamente sospechosa se requieren estudios inmunológicos tales como el factor reumatoide (FR, anticuerpo específico). Un FR negativo no controla la artritis reumatoide. Recientemente, se ha desarrollado una nueva prueba serológica, que prueba la presencia de los llamados anticuerpos de la proteína anti-citrulinada (PAC). Como FR, esta prueba puede detectar aproximadamente el 80% de todos los pacientes de AR, pero es raramente positiva en pacientes sin AR. Además, varios otros análisis de sangre se realizan habitualmente para permitir otras causas de artritis, tales como el lupus eritematoso. Estas pruebas incluyen la velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSE), la proteína reactiva c, el recuento de sangre completa, la función renal, las enzimas del hígado y los análisis inmunológicos, por ejemplo anticuerpo antinuclear/ANA se llevan a cabo todos en esta etapa. El documento US-A1 2006/0135422 da a conocer el tratamiento de AR con los inhibidores de AT₁ losartán y candesartán.
- 35 En cuanto a lo mencionado para la artritis reumatoide como una enfermedad entre las de la familia de enfermedades reumáticas inflamatorias, el diagnóstico en este campo de las enfermedades es difícil. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una herramienta para diagnóstico seguro y fiable.
- 40 Las áreas de pinzamiento grave, estenosis, detectables por angiografía, y en menor medida la "prueba de estrés", han sido desde hace tiempo el centro de las técnicas de diagnóstico humano para la cardiopatología en general. Sin embargo, estos procedimientos se centran en detectar solamente el pinzamiento grave, no la enfermedad de arterosclerosis subyacente. Como se demostró por estudios clínicos humanos, la mayoría de los episodios graves se producen en situaciones con placa pesada, todavía poco o ningún estrechamiento de la luz presente antes de debilitar los episodios que se producen repetidamente. La rotura de la placa puede conducir a la oclusión de la luz arterial de segundos a minutos y potencial debilidad permanente y a veces a la muerte súbita. El 77% de estenosis de la luz utilizada debe considerarse por los cardiólogos como el distintivo de la enfermedad clínicamente significativo debido a que es solamente en esta gravedad de pinzamiento de las arterias mayores del corazón que se
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

observan episodios recurrentes de angina de pecho y anomalías detectables por los procedimientos analíticos de estrés. Sin embargo, las pruebas clínicas han demostrado que solamente aproximadamente el 14% de los episodios clínicamente debilitantes suceden en posiciones con esta, o mayor gravedad de pinzamiento. La mayoría de los episodios se producen debido a la ruptura de la placa de ateroma en áreas sin pinzamiento suficiente para producir alguna angina o anomalías de la prueba de estrés. Por lo tanto, hay una extrema necesidad de un procedimiento de diagnóstico para diagnosticar la arterioesclerosis. Existen varios tipos diferentes de arterioesclerosis. La arterioesclerosis tal como la arterioesclerosis coronaria, la arterioesclerosis cerebral, tal como la apoplejía y la encefalomalacia, la nefrosclerosis diabética y la nefrosclerosis juvenil maligna y la arterioesclerosis de Mönckeberg.

La presente invención estudia la necesidad de una herramienta de diagnóstico para la familia de enfermedades mencionadas anteriormente. La presente invención estudia además la necesidad de un medicamento para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente.

Se utilizan anticuerpos anti-AT₁ como marcadores de la presencia de preeclampsia (documento DE-A1 19 954 305).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de la conectivitis en el que, la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ se determina en una muestra de un paciente que debe ser diagnosticado y en el que, la presencia de un anticuerpo antireceptor T₁ es indicadora de la enfermedad.

Los inventores han descubierto que más de 1/3 de los pacientes (35%) con enfermedades reumáticas son positivos a la presencia de un antireceptor AT₁, mientras que en pacientes sin enfermedad reumática solamente el 8,3% tienen un anticuerpo anti-AT₁ detectable.

La determinación se realizó en modo de prueba a ciegas. Todos los pacientes con enfermedades reumáticas presentaban complicaciones graves y eran difíciles de tratar con los métodos habituales. Había una relación evidente entre la presencia del anticuerpo anti-AT₁ y la complicación de la enfermedad.

En una forma de realización preferida de la invención la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ se realiza detectando uno o más de los anticuerpos seleccionados de entre el grupo de IgA-anticuerpo, IgG-anticuerpo e IgM-anticuerpo y más en particular un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En una forma de realización de la invención, la invención se refiere a un inmunoanálisis. Existen numerosas formas de realizar un inmunoanálisis en una forma de realización preferida de la invención, el inmunoanálisis es un ensayo luciferasa y/o un ELISA.

La invención se refiere además a la utilización de un péptido receptor AT₁ o a un análogo del mismo para el diagnóstico de la conectivitis.

La invención se refiere a un kit de investigación y/o diagnóstico para el diagnóstico de la conectivitis en el que el kit comprende un péptido de receptor AT₁ o un análogo funcional del mismo.

En una forma de realización adicional la invención se refiere a la utilización de un inhibidor de un anticuerpo antireceptor AT₁ o a un inhibidor de un receptor AT₁ para la producción de un medicamento.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto que determinadas enfermedades pueden diagnosticarse detectando la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ en una muestra de un paciente que ha de diagnosticarse. De hecho, los investigadores han descubierto que el 35% de los pacientes que tienen una enfermedad reumática son positivos para el anticuerpo anti-AT₁. El mismo anticuerpo anti-AT₁ puede detectarse solamente en el 6,2% de los casos en pacientes sin enfermedad reumática.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad, en el que la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ se determina en una muestra de un paciente que debe ser diagnosticado.

Ha sido posible demostrar que existe una relación entre la presencia de dicho anticuerpo antireceptor AT₁ y la posibilidad de una conectivitis. Además, la presencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ es diagnóstico para una conectivitis.

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

Según la invención, la expresión "rechazo del implante" se refiere a la provocación de una reacción inmunitaria para el trasplante en el receptor. Una reacción inmunitaria en el receptor es una reacción protectora o de defensa

específica del cuerpo frente a los antígenos del trasplante.

El "receptor AT₁" puede estar presente en su medio celular natural y puede utilizarse junto con el material asociado al receptor en su estado natural así como en forma aislada con respecto a sus estructuras primaria, secundaria y terciaria, el receptor AT₁ es muy conocido por los expertos en la materia. Basándose en el peso de todo el receptor en la preparación que debe utilizarse según la invención, el receptor aislado totalizaría 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 preferida específica por lo menos el 50%. El receptor se utiliza preferentemente en forma aislada, es decir esencialmente libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otras sustancias asociadas de forma natural al receptor. La expresión "esencialmente exento de" significa que el receptor está al menos 75%, preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 95% y especialmente preferente por lo menos el 99% exento de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otras sustancias asociadas de forma natural al receptor.

En relación con la presente invención, puede utilizarse el receptor natural así como todas las modificaciones, mutantes o derivados del receptor AT₁. Asimismo, un receptor AT₁ producido por medio de técnicas recombinantes, cuyo receptor incluye modificaciones de aminoácidos, tales como inversiones, eliminaciones, inserciones, adiciones, etc. pueden utilizarse según la invención con tal que esté presente esta parte de la función esencial del receptor AT₁, a saber la capacidad de unir anticuerpos. El receptor AT₁ que se está utilizando puede también comprender aminoácidos excepcionales y/o modificaciones tales como alquilación, oxidación, modificación del tiol, desnaturalización, oligomerización y similares. El receptor puede también sintetizarse por medios químicos. Según la invención el receptor AT₁ particularmente puede ser una proteína y/o péptido o un péptido de fusión, que además de otras proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos, incluye el receptor AT₁ completo o en parte. Utilizando procedimientos convencionales, los péptidos o polipéptidos del receptor AT₁ que tienen análogos funcionales, las propiedades de los análogos pueden ser determinadas por expertos en la materia. Por ejemplo, dichos polipéptidos o péptidos presentan 50 a 60%, 70% u 80%, preferentemente 90%, más preferentemente 95%, y aun más preferentemente 98% de homología con los péptidos identificados como receptor AT₁, y dicha homología puede determinarse, por ejemplo por medio del algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman, utilizando, por ejemplo, el programa MPFRCH (Oxford Molecular).

El término "péptido" de un receptor AT₁ utilizado en la presente invención, comprende también moléculas que se diferencian de la secuencia original por eliminación o eliminaciones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones y/o por otras modificaciones bien conocidas en la técnica anterior y/o que comprenden un fragmento de la molécula de aminoácido original, presentando todavía el receptor AT₁ las propiedades mencionadas anteriormente. Además se incluyen variantes y modificaciones alélicas. Los procedimientos para producir los cambios anteriores en la secuencia de aminoácidos son bien conocidos por los expertos en la materia y han sido descritos en libros de texto habituales de biología molecular, por ejemplo Sambrook *et al.* anteriormente. Los expertos en la materia podrán determinar si un receptor AT₁, por lo tanto, modificado todavía presenta las propiedades mencionadas anteriormente. Los péptidos posibles del receptor AT₁ utilizados 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 todas las modificaciones ilustradas anteriormente del receptor AT₁ se denominarán en resumen "péptidos o proteínas funcionalmente análogos".

El término "muestra" en el sentido de la invención pueden ser todos los tejidos y fluidos biológicos tales como sangre, linfa, orina o fluido cerebral. Se recoge la muestra del paciente y se somete al diagnóstico según la invención.

El "anticuerpo antireceptor AT₁" en el sentido de la invención, que debe detectarse, se une al receptor AT₁ de modo específico. El anticuerpo también puede modificarse (por ejemplo anticuerpos oligoméricos, reducidos, oxidados y marcados). El término anticuerpo antireceptor AT₁ tal como se utiliza en la presente memoria comprende tanto moléculas intactas como también fragmentos de anticuerpo antireceptor AT₁ tales como Fab, F(ab)₂ y Fv capaces de determinancia del epítipo específica para la unión del receptor AT₁. En estos fragmentos se conserva en parte la capacidad del o de los anticuerpo(s) antireceptor(es) AT₁ de unir selectivamente su antígeno o receptor, estando definidos los fragmentos de la manera siguiente: (1) Fab, fragmento que contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo puede generarse por escisión de un anticuerpo completo utilizando la enzima papaína, obteniendo de este modo una cadena ligera intacta y parte de una cadena pesada; (2) el fragmento Fab de una molécula de anticuerpo puede producirse mediante tratamiento de un anticuerpo completo con pepsina y posterior reducción, obteniendo con ello una cadena ligera intacta y parte de una cadena pesada, se obtienen dos fragmentos Fab de molécula de anticuerpo; (3) F(ab)₂ el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse por tratamiento de un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción, F(ab)₂ es un dímero compuesto por dos fragmentos Fab mantenidos juntos por dos enlaces disulfato; (4) Fv definido como fragmento modificado por 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 monocatenario (SCA) definido como una molécula modificada por ingeniería genética, que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico para hacer una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

5 El término "epítopo" tal como se utiliza en la presente memoria representa cualquier determinante antigénico en el receptor AT₁. La determinancia del epítopo consiste normalmente en grupos de moléculas con superficie químicamente activa tales como cadenas laterales de aminoácidos o de azúcar y normalmente presentan propiedades específicas de la estructura tridimensional así como propiedades específicas a la carta.

10 El anticuerpo antireceptor AT₁ se une específicamente al receptor AT₁ o haciendo de este modo presenta reactividad inmuno-específica cuando el anticuerpo antireceptor AT₁ asume su función en una reacción de unión en presencia de una población heterogénea de receptores AT₁ o fragmentos de los mismos, permitiendo de este modo una conclusión si está presente el receptor AT₁ u otra estructura biológica. En las presentes condiciones de un inmunoanálisis, los anticuerpos receptores anti-AT₁ preferentemente se unirán a una parte específica del receptor AT₁, aunque no tenga lugar ninguna unión significativa a otras proteínas presentes en la muestra.

15 El término "pacientes" en el sentido de la invención se refiere a todas las personas, animales, vegetales o microorganismos, independientemente ya presenten cambios patológicos o no. En el sentido de la invención, cualquier muestra recogida de células, tejidos, órganos, organismos o similares puede ser una muestra de un paciente que debe diagnosticarse. En una forma de realización de la invención más preferida el paciente es una persona susceptible de padecer conectivitis.

20 La expresión "reacción inmunitaria" en el sentido de la invención es una interacción específica entre el receptor AT₁ o los péptidos o proteínas de función análoga de los anticuerpos antireceptores AT₁. La reacción inmunitaria puede detectarse utilizando varios inmunoanálisis.

25 El término "inmunoanálisis" en el sentido de la invención son análisis que utilizan la interacción específica entre el receptor AT₁ y los péptidos o proteínas de función análoga y los anticuerpos antireceptores AT₁, a fin de detectar la presencia o determinar la concentración de los anticuerpos antireceptores AT₁. Por ejemplo, una detección en la cuantificación de los anticuerpos antireceptores AT₁ puede realizarse con ayuda de dichos péptidos o proteínas de función análoga, por ejemplo por inmunoprecipitación o inmunocoagulación.

30 Según la invención, la enfermedad es una conectivitis.

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

En una forma de realización muy preferida la conectivitis es la esclerosis generalizada.

40 En una forma de realización preferida de la invención la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ se realiza detectando uno o más de los anticuerpos seleccionados de entre el grupo constituido por IgA-anticuerpo, IgG-anticuerpo y IgM-anticuerpo.

45 Los anticuerpos humanos pueden dividirse en cinco clases de inmunoglobulinas. La clase inmunoglobulina A (IgA) existe en forma que está disuelta en la sangre así como en variante secretora. IgA comprende dos clases básicas. IgA secretora consta de dos moléculas de inmunoglobulina básicas, junto con una cadena J y un componente secretor. Más específicamente las moléculas de IgA pueden ser corrientes en secreciones corporales.

50 Las inmunoglobulinas de clase IgG representan la mayor parte entre las inmunoglobulinas. Los anticuerpos de la respuesta inmunitaria secundaria tienen lugar en el contacto del sistema inmunitario de un antígeno específico que pertenece en gran medida a la clase IgG.

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

55 El término "inmunoanálisis" en el sentido de la invención se refiere a los análisis que utilizan la interacción específica entre el receptor AT₁ y los péptidos o proteínas de función análoga y el anticuerpo antireceptor AT₁, para detectar la presencia o determinar la concentración de los anticuerpos antireceptores AT₁. Por ejemplo, una detección en la cuantificación del anticuerpo antireceptor AT₁ puede hacerse con ayuda de dichos péptidos o proteínas de función análoga, por ejemplo por inmunoprecipitación o inmunotransferencia. Por ejemplo, los inmunoanálisis en el sentido de la invención pueden subdividirse en las siguientes etapas (1) reacción del anticuerpo antireceptor AT₁ con el receptor AT₁, (2) si se necesita separación del complejo anticuerpo antireceptor AT₁ de otros componentes de la mezcla de reacción especialmente de los anticuerpos antireceptores AT₁ no unidos un receptor AT₁ y (3) midiendo la respuesta. Como para la reacción del anticuerpo antireceptor AT₁ con el receptor AT₁ son posibles varias configuraciones, por ejemplo (a) precipitación de una reacción con un acceso de la otra o (b) competencia entre cantidades conocidas de anticuerpo antireceptor AT₁ o del receptor AT₁ y el material que debe investigarse.

65 Por ejemplo, un análisis de anticuerpos antireceptores AT₁ puede realizarse a) utilizando receptores/péptidos de AT₁

de acceso o proteínas de función análoga o b) competencia entre el anticuerpo antireceptor AT₁ marcado de cantidad conocida y anticuerpo no marcado de cantidad desconocida para una cantidad definida de receptor o péptidos de AT₁ de proteínas de función análoga.

5 El receptor AT₁ puede inmovilizarse sobre un soporte sólido para permitir la separación del anticuerpo antireceptor AT₁ del 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 microvaloración). El inmunoanálisis puede tener lugar en un medio microfluido. Para medir la interacción entre el anticuerpo antireceptor AT₁ y el receptor AT₁, es posible utilizar, por ejemplo, anticuerpos antireceptores AT₁ marcados, receptores AT₁ marcados o reactivos secundarios. El receptor AT₁ puede marcarse por radioactividad o con enzimas o con compuestos fluorescentes. Independientemente del marcador que se utilice, la respuesta de la interacción ente el anticuerpo antireceptor AT₁ y el receptor AT₁ puede aumentarse utilizando la afinidad de las proteínas avidina o estreptavidina por la biotina. El inmunoanálisis utilizado según la invención puede ser: (1) inmunoanálisis utilizando un marcador radioactivo: (a) radioinmunoanálisis con unión competitiva (RIA) y (b) análisis inmunorradiométrico (IRMA); (2) inmunoanálisis utilizando un marcador enzimático: (a) inmunoanálisis enzimático (EIA) y (b) ensayo inmunosorbente con enzima ligada (ELISA); (3) inmunoanálisis que utiliza una combinación de marcadores de radioisótopo y enzimas (radioinmunoanálisis enzimático ultrasensible) (USERIA). Además, el inmunoanálisis según la invención puede ser un inmunoanálisis fluorescente, un análisis quimioluminiscente, un análisis de aglutinación, un análisis nefelométrico, un análisis turbidimétrico, una inmunotransferencia Western, un inmunoanálisis competitivo, un inmunoanálisis no competitivo, un inmunoanálisis homogéneo, un inmunoanálisis heterogéneo, un análisis indicador, por ejemplo un análisis con luciferasa.

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

25 La invención se refiere además a la utilización de un péptido de receptor AT₁ o un análogo funcional del mismo para el diagnóstico de una conectivitis.

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

La invención se refiere además a la utilización de un kit de investigación y/o diagnóstico para el diagnóstico de una conectivitis, en el que el kit comprende un péptido de receptor AT₁ o un análogo funcional del mismo.

35 En una forma de realización preferida, el kit de investigación y/o diagnóstico comprende un péptido de receptor AT₁ o un análogo funcional del mismo.

En una forma de realización preferida, el kit de investigación y/o diagnóstico utilizado en la invención destinado al diagnóstico de una enfermedad de conectivitis se selecciona de entre el grupo constituido por lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome CREST y síndrome SHARP.

45 El kit de ensayo inmunológico utilizado en la invención comprende un receptor AT₁ o un análogo funcional del mismo o péptidos o proteínas de función análoga de por sí. El kit de ensayo de la invención comprende por lo menos un receptor AT₁ completo o péptidos o proteínas funcionalmente análogos de dicho receptor, opcionalmente unidos a una fase sólida. Además, el kit de ensayo puede comprender también tampones, conjugado específico junto con una enzima, solución de lavado, solución de sustrato para detectar la reacción inmunitaria y/o una solución de extinción. Utilizando estas sustancias un experto en la materia podrá realizar, por ejemplo un ELISA para detectar los anticuerpos antireceptores AT₁. Los tampones, el conjugado específico más enzima, la solución de lavado, la solución de sustrato para detectar la reacción inmunitaria y la solución de extinción son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, sería suficiente tener el ensayo compuesto por un receptor AT₁ liofilizado o péptidos o proteínas de la función análoga al receptor AT₁ y añadir los tampones y otras soluciones inmediatamente antes de analizar el material biológico. Sin embargo, también es posible proporcionar el kit de ensayo con el receptor AT₁ o sus péptidos funcionalmente análogos de las proteínas unidas a una fase sólida. Para detectar los anticuerpos antireceptores AT₁ el conjugado específico, la solución de lavado, la solución de sustrato y la solución de extinción, que pueden ser componentes del kit de ensayo, tienen que añadirse según un modo bien conocido por los expertos en la materia.

60 En otra forma de realización ventajosa de la invención, está previsto que el kit de ensayo sea 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 suero u 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 antireceptor AT₁, puede desencadenarse una reacción colorimétrica específica mediante la cual puede detectarse el anticuerpo antireceptor AT₁.

El sistema de ensayo de la invención permite la cuantificación de los anticuerpos antireceptores AT₁ directamente en una muestra (por ejemplo, en el plasma de pacientes). El método de detección según la invención supone ahorro de tiempo y de coste. Pueden analizarse grandes cantidades de muestras y debido a la baja cantidad de equipo requerido, pueden utilizarse laboratorios de rutina.

5 La invención se refiere además a un inhibidor de un anticuerpo antireceptor AT₁ para la producción de un medicamento.

10 El término "inhibidor" se refiere a un agente que se une al receptor pero no provoca la respuesta biológica normal. Por ejemplo, un inhibidor puede ser cualquier molécula que, cuando se une a un receptor AT₁, disminuye la actividad del receptor AT₁ o reduce los niveles de expresión del mismo.

15 En una forma de realización preferida el medicamento está destinado al tratamiento de una conectivitis. En la forma de realización preferida específica la conectivitis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo de lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome CREST y síndrome SHARP.

20 En una forma de realización preferida el inhibidor del anticuerpo antireceptor AT₁ es un anticuerpo contra el anticuerpo antireceptor AT₁.

25 La plasmaféresis (del griego *plasma*, algo moldeado y *apheresis*, eliminación) es la eliminación de (componentes del) plasma sanguíneo de la circulación. Se utiliza como terapia en enfermedades específicas, y es también un procedimiento mediante el cual los donantes de sangre donan solo plasma, quedando los glóbulos rojos y las plaquetas devueltas a sus sistemas circulatorios, permitiendo hasta doce donaciones de plasma a la semana.

Una utilización importante de la plasmaféresis está en la terapia de trastornos autoinmunitarios, en los que los síntomas son tan catastróficos que la terapia médica es insuficiente para controlar los síntomas. La plasmaféresis elimina anticuerpos de la circulación.

30 Otras utilidades son la eliminación de proteínas de la sangre donde son abundantes en exceso y producen el síndrome de viscosidad.

35 En una forma de realización de la invención, la invención se refiere al procedimiento para la eliminación de anticuerpo antireceptor AT₁, en el que en una primera etapa un paciente es diagnosticado de la presencia de una conectivitis al determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ en una muestra de sangre de dicho paciente en el que en la determinación de la presencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ la sangre del paciente se somete a una plasmaféresis.

40 La plasmaféresis puede realizarse muchas veces en una forma de realización preferida se lleva a cabo a intervalos de 4 semanas hasta que el valor del anticuerpo antireceptor AT₁ está por debajo del nivel de detección.

Ejemplos

Ejemplo I: ELISA del receptor AT₁

45 Una placa de microvaloración recubierta con estreptavidina adecuada se carga con el péptido biotimidado que codifica el receptor AT₁.

50 Dichos péptidos pueden ser AVHYQSN (SEC. ID. nº 1), SHFYQTR (SEC. ID. nº 2) y/o GYYFDTN (SEC. ID. nº 3).

55 Con este fin, se incuban 100 µl de una solución por pocillo en la placa de microvaloración con 5 µg/ml en un tampón de dilución adecuado. Para medir la unión inespecífica, se llenan también los pocillos con 100 µl de tampón de dilución. El tampón de dilución puede comprender albúmina de suero bovino al 0,5%, tampón fosfato 10 mM (pH 7,4), NaCl 140 mM y TWEEN 20 al 0,05%.

60 Después del período de reacción, la solución del péptido se desplaza por decantación y cada pocillo se lava tres veces con 250 µl de tampón de lavado adecuado. El tampón de lavado adecuado puede comprender tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) NaCl 140 mM y TWEEN 20 al 0,1%. Después, se diluyen 100 µl por pocillo de suero en un tampón de dilución y se colocan en las placas cargadas con péptido y comparativa y se incuban. Posteriormente, se lavan los pocillos tal como se describió anteriormente.

65 Los anticuerpos unidos se detectan utilizando anticuerpo con inmunoglobulina G anti-humana de cabra que tiene acoplada peroxidasa a la misma. Con este fin, se diluye el anticuerpo en el tampón de dilución y se incuban (100 µl/pocillo) y esto se sigue en tres etapas de lavado (véase anteriormente).

Después de la adición de 100 µl sobre la solución de sustrato lista para su uso (por ejemplo, 3,3',5,5'-

tetrametilbencidina), se desarrolla color dependiendo de la cantidad de peroxidasa en el pocillo. La reacción del sustrato se determina por adición de 100 µl de ácido sulfúrico 0,5 M. La absorción se mide a 450 nm. Para la evaluación la diferencia entre las absorciones de la placa de microvaloración cargada con péptido y la placa comparativa no se forma ningún péptido. Las muestras que tienen mayor absorción a continuación del corte son positivas. El corte se calcula a partir del valor medio de la absorción de donantes negativos más tres veces la desviación estándar. En general, un control del corte o una serie de dilución patrón que permite la cuantificación en unidades relativas se realiza conjuntamente en el ensayo.

Ejemplo II

Varios grupos de pacientes (con diagnóstico positivo) así como referencias se ensayaron con respecto a la presencia o ausencia del anticuerpo antireceptor AT₁. La Tabla I muestra el resultado obtenido.

Tabla I

Enfermedad	Presencia del anticuerpo antireceptor AT ₁ en %
enfermedad reumática	35
pacientes sin enfermedad reumática inflamatoria	8,3

Ejemplo III

Los inventores analizaron en los sueros de 212 pacientes con esclerosis generalizada (SSc), 60 personas de referencia sanas, 120 pacientes de artritis reumática y 124 personas de referencia adicionales con morfea, fenómeno de Raynaud primario o hipertensión pulmonar idiopática, la presencia de anticuerpos dirigidos contra el receptor tipo 1 de angiotensina II (AT₁R) y el receptor tipo A de endotelina-1 (ET_AR) mediante un ensayo en fase sólida. Se evaluaron además la implicación orgánica individual, la supervivencia del paciente y el efecto inmunosupresor o las terapias celulares. La sensibilidad vascular a los ligandos del receptor natural, angiotensina II y endotelina-1 se estudió *ex vivo* en las arterias de resistencia pulmonar.

Se detectó AT₁R-AA en el 56,6% de los pacientes de SSc, respectivamente, pero solamente en el 9,6% de las personas con enfermedades de referencia, y el 2,8% de las personas normales. Los pacientes con AT₁R-AA padecían enfermedad más grave. El carácter positivo para AT₁R-AA predijo de manera acusada el desarrollo de la hipertensión arterial pulmonar y la mortalidad relacionada con SSc. Las concentraciones de anticuerpo no fueron influidas por la inmunosupresión o el trasplante de células madre generalmente utilizados. La estimulación de los vasos con resistencia pulmonar con AT₁R-AA *ex vivo* aumentó la sensibilidad vasoconstrictora para con la endotelina-1 y la angiotensina II que pudieron ser bloqueadas por los antagonistas del receptor correspondientes.

Pacientes y evaluación de manifestaciones clínicas

Se recogieron muestras de suero en 212 pacientes consecutivos con esclerodermia entre enero de 2004 y noviembre de 2006. Los pacientes presentaban SSc limitada (n=89), difusa (n=78) o un síndrome de solapamiento (n=45) con otras enfermedades del tejido conectivo tal como las definidas por LeRoy *et al.*, y cumplían con los criterios de American College of Rheumatology de la clasificación de SSc (LeRoy-EC, *J. Rheumatol.* 1988, Massi). Los inventores extrajeron sueros de referencia de 71 personas sanas y de 239 pacientes de enfermedad de referencia incluyendo 115 pacientes de artritis reumatoide, 33 pacientes con morfea, 31 pacientes con fenómeno primario de Raynaud, y 60 pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática. El diagnóstico en cada grupo de referencia se hizo según los criterios establecidos para cada enfermedad. Se obtuvo de cada paciente el consentimiento informado por escrito para utilizar muestras de suero para investigación.

Los inventores estudiaron además 11 pacientes al azar con esclerosis generalizada difusa precoz antes del inicio de la terapia de pulsación intravenosa con ciclofosfamida (750 mg/m² por pulsación), 3 pacientes se trataron con rituximab y receptores de trasplantes autólogos de células madre incluidos en la prueba ASTIS (Laar). Se obtuvieron las primeras muestras antes del inicio de la terapia y hasta siete muestras de referencia durante los 24 meses de seguimiento.

Un procedimiento normalizado por el grupo European Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) se utilizó para recoger datos de todos los pacientes, y se recogieron las variables siguientes en los primeros meses de seguimiento después de la tomas de muestras de suero. La fibrosis cutánea fue evaluada por al menos dos investigadores independientes con utilización de la puntuación de la piel de Rodnan modificada. La concentración de hemoglobina y de ESR procedía de muestras de sangre. En el suero se analizó la presencia de anticuerpos anti-centrómero (ACA), anticuerpos antitopoisomerasa (Scl-70), anti-AT₁R y los anti-ET_AR-autoanticuerpos. La función pulmonar se evaluó por la capacidad vital forzada (CVF) prevista y la capacidad de difusión ajustada para la concentración de hemoglobina (DLCO) por un solo método de respiración. Los pacientes con la prueba de la función pulmonar patológica se examinaron mediante una exploración CT de alta resolución; a los restantes pacientes se les hizo una exploración de rayos X del tórax. La implicación cardíaca fue confirmada por un médico si se presentaban dos de los cambios siguientes: disfunción diastólica, cambios en el ECG, disminución de la fracción de rechazo o palpitaciones.

Había sospechas de PAH secundaria para SSc en pacientes con disnea progresiva en ejercicio moderado (NYHA III), > 25 mm Hg de presión sistólica de la arteria pulmonar por ecocardiografía, más de 1,4 veces de aumento de la relación CVF/DLCOcSB, o signos de insuficiencia ventricular derecha evaluada por ecocardiograma (por ejemplo efusión pericárdica, aumento de los diámetros del ventrículo derecho). Se consideró PAH probado por > 25 mm Hg de presión arterial pulmonar media (mPAP) en reposo o ≥ 35 mm Hg en ejercicio en presencia de resistencia vascular pulmonar > 3 mm Hg/l/min y una presión de enclavamiento capilar pulmonar < 15 mm Hg por cateterizaciones del corazón derecho. Las muertes y reanimaciones se incluyeron solamente en el estudio cuando estaban relacionadas con SSc.

Ensayo en fase sólida

Los autoanticuerpos anti-AT₁R y anti-ET_AR fueron medidos por un ELISA celular. El ensayo emplea extractos de membrana de AT₁R o de las células CHO que sobreexpresan ET_AR que sirven como fase sólida. La especificidad del ELISA de anti-AT₁R y el anti-ET_AR se demostró bloqueando los experimentos que utilizan extracto de membrana de las correspondientes estirpes celulares que presentan una disminución en función de la dosis y limitadas por el antígeno en el anticuerpo que une antígenos respectivos. En cambio, los extractos de membrana de las células CHO no transfectadas no presentaban ningún efecto de bloqueo en la unión del anticuerpo AT₁R y del anti-ET_AR.

Corte y variabilidad inter-ensayo: Se ordenaron al azar muestras de suero para el análisis y los ensayos fueron realizados por personal que desconocía la patología de los pacientes. Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado tanto para el anticuerpo anti-AT₁R como el anti-ET_AR.

Estadística

Se representó la sensibilidad de las pruebas de detección del anticuerpo AT₁R y ET_AR en curvas características de la operación del receptor (COR) frente a 1 menos la especificidad de todas las enfermedades estudiadas y se determinaron los valores de corte respectivos. Los datos continuos se presentan como medias (con intervalos). Los inventores realizaron comparaciones entre los grupos con la utilización de la prueba U de Mann-Whitney para variables continuas. Además, se evaluaron relaciones de riesgo mediante análisis de Kaplan-Meyer para la primera manifestación de hipertensión pulmonar, úlceras digitales y muerte o reanimación durante el período de observación. Se calcularon relaciones raras y riesgo relativo para determinar asociaciones con implicaciones orgánicas individuales. Los datos de la miografía de los vasos pequeños fueron analizados por ANOVA. Un valor P inferior a 0,05 se consideró significativo. Los resultados se expresan en medias \pm SEM, n representa el número de segmentos anulares estudiados de la arteria pulmonar.

Autoanticuerpos ET_AR y AT₁R en diferentes enfermedades.

Entre 212 pacientes de SSc, 120 (56,6%), presentaban niveles medios aumentados (24 U por CI 95% 21,7-25,4 U) de autoanticuerpos (AA) AT₁R (figura 1, panel A). Por el contrario solamente 2 de 71 (2,8%) personas normales, 11 de 115 pacientes con AR (9,6%), 2 de 33 pacientes con morfea (6,1%) y 4 de 31 pacientes (12,9%) con fenómeno primario de Raynaud tenían AT₁R-AA. ET_AR-AA (Fig. 1, panel B) se detectó en 123 de los 212 SSc (57,6%), pero en solo 2,8% de las personas normales, 8,7% de los pacientes de AR, 9,1% de los pacientes con morfea y 12,9% de los pacientes con fenómeno primario de Raynaud. La mayoría de los pacientes (84%) de los inventores presentaban tanto AT₁R-AA como ET_AR-AA (P<0,001, $r^2=0,75$, Fig. 1, panel B). Se detectó carácter positivo singular para AT₁R-AA en el 6% de los pacientes con SSc y en el 10% para ET_AR-AA solamente.

Los pacientes con SSc difusa eran positivos con más frecuencia para ambos autoanticuerpos y su presencia se correlacionó negativamente con la enfermedad limitada. Particularmente, el riesgo a haber experimentado o ser sospechoso de PAH aumentó en los pacientes con SSc positivos a AT₁R-AA y ET_AR-AA (Tabla II). Entre 32 pacientes con PAH probado y SSc difusa, 30 eran positivos tanto a AT₁R-AA como a ET_AR-AA. A pesar de la correlación inversa de AT₁R-AA y ET_AR-AA con SSc limitada, todos los pacientes con PAH y SSc limitada fueron positivos al autoanticuerpo. 12 de cada 39 pacientes (30,7%) con esclerosis generalizada limitada y anticuerpos AT₁R o ET_AR padecieron PAH pero ninguno de los 50 pacientes con enfermedad limitada sin estos anticuerpos, pacientes con esclerosis generalizada limitada y anticuerpos AT₁R son de alto riesgo para tener PAH. Las úlceras digitales, la fibrosis pulmonar, el carácter positivo anti-Scl 70 y las contracturas fueron más frecuentes en los pacientes positivos a AT₁R-AA y ET_AR-AA (Tabla II).

Tabla II: Carácter positivo de AT₁R-AA y ET_AR-AA y manifestaciones de la enfermedad determinadas por parámetros clínicos y de laboratorio

Meses después de la detección del Ab	0	5	10	15	20	25	30	35
Anti-AT1R + pacientes en riesgo	110	104	91	82	72	60	35	5
Anti-AT1R - pacientes en riesgo	82	82	63	52	40	25	11	0

La asociación entre pacientes positivos al anticuerpo anti-receptor y la fibrosis pulmonar estaba también apoyada al

analizar los parámetros de la función pulmonar. El porcentaje de CVF previsto y DLCO era inferior en el grupo de pacientes positivos al anticuerpo cuando se comparaba a los pacientes negativos a la prueba. El mayor grado de cambios fibróticos en la cohorte positiva de anticuerpos estaba además acentuado por la mayor puntuación en la piel de Rodnan modificada en el grupo positivo al anticuerpo. Los pacientes con anticuerpos anti-receptor tienen también un curso de enfermedad más largo y tienen una ESR mayor cuando se compara con el grupo negativo al autoanticuerpo receptor vascular (Tabla II).

PAH y relación de ambos anticuerpos.

Además del alto número de casos de PAH en pacientes con anticuerpos anti-AT₁R o anti-ET_AR las concentraciones de ambos anticuerpos anti-receptor fueron mayores en pacientes con PAH relacionada con SSc cuando se comparan con los pacientes de SSc sin PAH (Fig. 2 A, B). Por el contrario, los pacientes con PAH idiopático no manifestaban ningún aumento de frecuencia de anticuerpos frente a los receptores (10% de los 60 pacientes). Las concentraciones de ambos anticuerpos anti-AT₁R o anti-ET_AR en pacientes con IPAHA fueron menores cuando se comparan con los pacientes con PAH relacionados con SSc.

Valor pronóstico

Para determinar el valor pronóstico tanto de los autoanticuerpos anti-AT₁R como anti-ET_AR, los inventores han realizado un análisis prospectivo de la mortalidad relacionada con SSc y PAH después del análisis de anticuerpos (Figura 3 A). Los anticuerpos anti-AT₁R y los anticuerpos anti-ET_AR tienen ambos un valor predictivo de mortalidad (P=0,002 y P=0,001, respectivamente) durante un periodo de observación medio de 22 meses. 14 de cada 110 pacientes de SSc con anticuerpos anti-AT₁R o anti-ET_AR murieron (N=11) o han sido reanimados (N=3), pero ni un solo paciente en el grupo negativo a anticuerpos (P=0,004). Las causas de muerte relacionadas con SSc fueron la insuficiencia multiorgánica con y sin PAH (N=7), PAH (N=3) e implicación cardíaca con taquicardia ventricular (N=4).

Además, los anticuerpos anti-receptores también predicen la hipertensión arterial pulmonar. Durante el periodo de observación, el diagnóstico de PAH se realizó en 21 pacientes con anticuerpos anti-AT₁R pero no en un solo paciente sin anticuerpos anti-AT₁R (P<0,001, Figura 3B). Resultados similares se obtuvieron también para los pacientes positivos a anticuerpos anti-ET_AR (P< 0,001). Los dos pacientes negativos para anticuerpos anti-ET_AR pero desarrollando PAH fueron positivos a los anticuerpos anti-AT₁R y presentan anticuerpos anti-ET_AR por encima de 16U. Para los pacientes que tienen ambos anticuerpos anti-receptor, aumentó también la frecuencia de PAH probada (P<0,001).

Títulos de las Figuras

Figura 1: Niveles y valor diagnóstico de autoanticuerpos AT₁R-AA y ET_AR-AA en diferentes patologías autoinmunitarias. Niveles de autoanticuerpos AT₁R (panel A) y ET_AR (panel B) medidos en el suero de personas de referencia sanas (N), pacientes con artritis reumatoide (AR), esclerosis generalizada (SSc), morfea (M) y fenómeno primario de Raynaud (PRP). Los niveles medios se presentan como líneas: las líneas de puntos representan los intervalos normales superiores comparados con los niveles de anticuerpo encontrados en la esclerosis generalizada, todas las demás enfermedades pusieron de manifiesto niveles menores (P<0,001). Los niveles de autoanticuerpos AT₁R y ET_AR presentan correlación acusada (P<0,001, r²= 0,74).

Figura 2: Comparación de los niveles de autoanticuerpos AT₁R (Panel A) y ET_AR en pacientes de SSc con PAH pacientes de SSc sin PAH o pacientes con IPAHA.

Figura 3: Curvas de Kaplan-Meier para analizar el valor esperado de anticuerpos anti-AT₁R y anti-ET_AR. Pacientes de SSc con anticuerpos anti-AT₁R, anti-ET_AR o con ambos anticuerpos anti-receptor están en situación de riesgo mayor de mortalidad relacionada con SSc (Panel A) definida por muerte (n=12) o reanimación (n=3) y están en mayor situación de riesgo de PAH (Panel B) durante un periodo de observación medio de 22 meses. Obsérvese que los ejes Y empiezan en el 70%.

Listado de secuencias

<110> Celltrend GmbH

<120> Procedimiento de diagnóstico de una enfermedad que implica un anticuerpo antireceptor AT₁

<130> N1225 PCT BLN

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 1

Ala Val His Tyr Gln Ser Asn
1 5

10 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 2

Ser His Phe Tyr Gln Thr Arg
1 5

20 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

25 **Gly Tyr Tyr Phe Asp Thr Asn**
1 5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico de la conectivitis en el que, la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ (receptor de angiotensina II tipo 1) se determina en una muestra de un paciente que debe ser diagnosticado y en el que, la presencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ es indicadora de la enfermedad. 5
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la conectivitis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome CREST y síndrome SHARP. 10
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ se realiza detectando uno o más de los anticuerpos seleccionados de entre el grupo constituido por IgA-anticuerpo, IgG-anticuerpo e IgM-anticuerpo. 15
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el IgG-anticuerpo se selecciona de entre el grupo constituido por IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el inmunoanálisis se selecciona de entre el grupo constituido por inmunoprecipitación, inmunoanálisis enzimático (IAE), radioinmunoanálisis (RIA) o inmunoanálisis fluorescente, un análisis quimioluminiscente, un análisis de aglutinación, un análisis nefelométrico, un análisis turbidimétrico, una inmunotransferencia Western, un inmunoanálisis competitivo, un inmunoanálisis no competitivo, un inmunoanálisis homogéneo, un inmunoanálisis heterogéneo, un bioanálisis y análisis indicador tal como un análisis con luciferasa. 20
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el inmunoanálisis es un ELISA. 25
7. Utilización de un péptido de receptor AT₁ para la detección de un anticuerpo antireceptor AT₁ para el diagnóstico *in vitro* de la conectivitis. 30
8. Utilización según la reivindicación 7, en la que la conectivitis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome CREST y síndrome SHARP. 35
9. Utilización de un kit de investigación y/o diagnóstico para el diagnóstico de la conectivitis, en la que el kit comprende un péptido de receptor AT₁ o un análogo funcional del mismo.
10. Utilización según la reivindicación 9, en la que la conectivitis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome CREST y síndrome SHARP. 40
11. Utilización de un inhibidor del anticuerpo antireceptor AT₁ para la producción de un medicamento destinado al tratamiento de la conectivitis. 45
12. Utilización según la reivindicación 11, en la que la conectivitis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome CREST y síndrome SHARP. 50
13. Utilización según la reivindicación 11 ó 12, en la que el inhibidor del anticuerpo antireceptor AT₁ es un anticuerpo contra el anticuerpo antireceptor AT₁.
14. Procedimiento para la eliminación de anticuerpos antireceptores AT₁ aislados de la sangre,
 - a. en el que en una primera etapa a un paciente se le diagnostica la presencia de conectivitis al determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ en una muestra de sangre de dicho paciente,
 - b. en el que en la determinación de la presencia de un anticuerpo antireceptor AT₁ la sangre aislada del paciente se somete a una plasmaféresis. 60
15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la conectivitis es una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por lupus eritematoso diseminado, esclerosis generalizada, eosinofilia infecciosa, polimiositis, dermatomiositis, periarteritis nodular, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, síndrome CREST y síndrome SHARP. 65

Fig. 1A

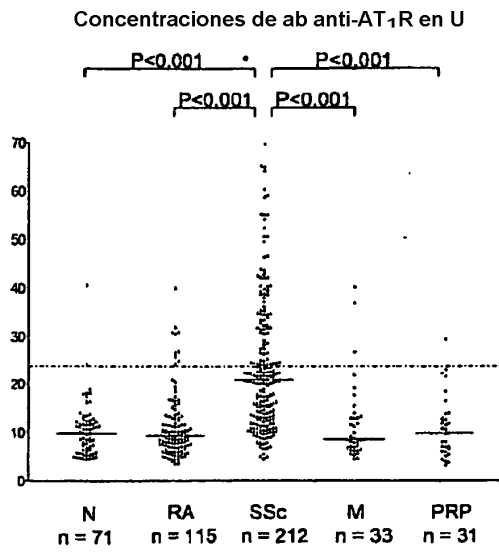


Fig. 1B

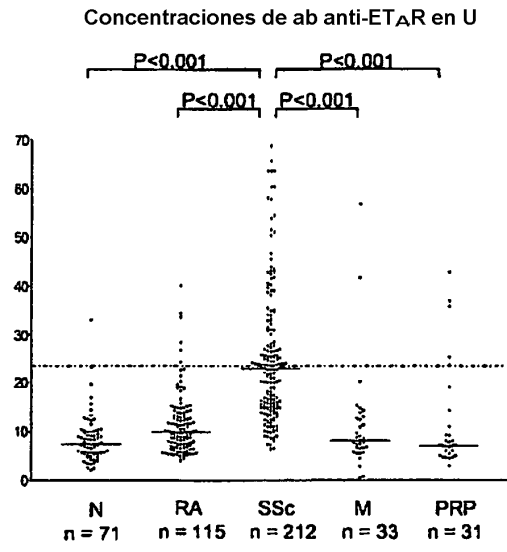


Fig. 2A

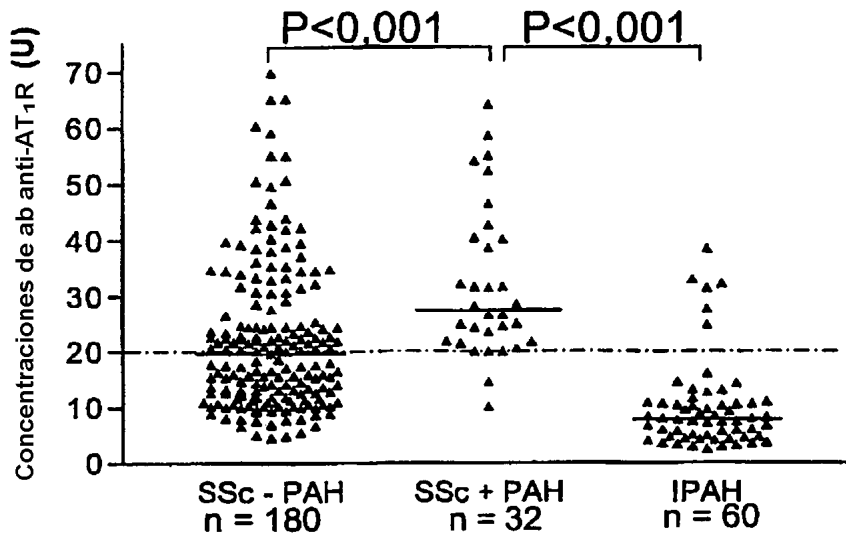


Fig. 2B

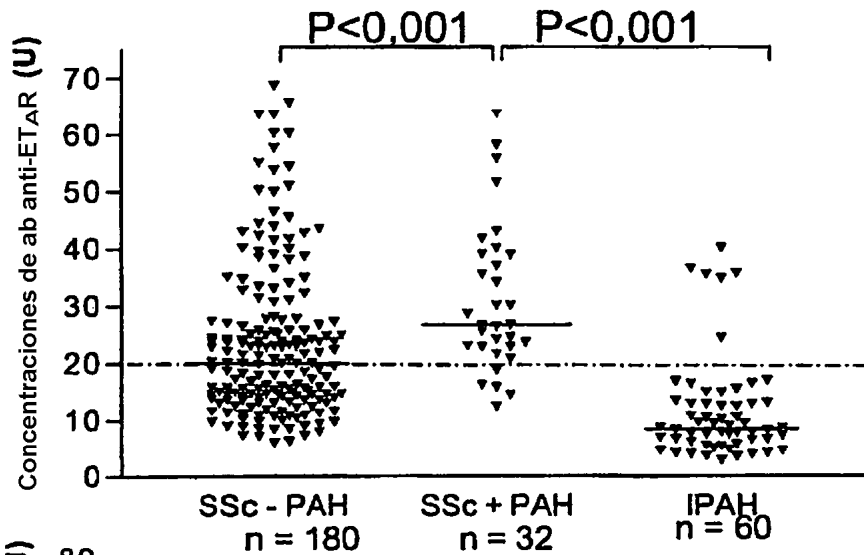


Fig. 2C

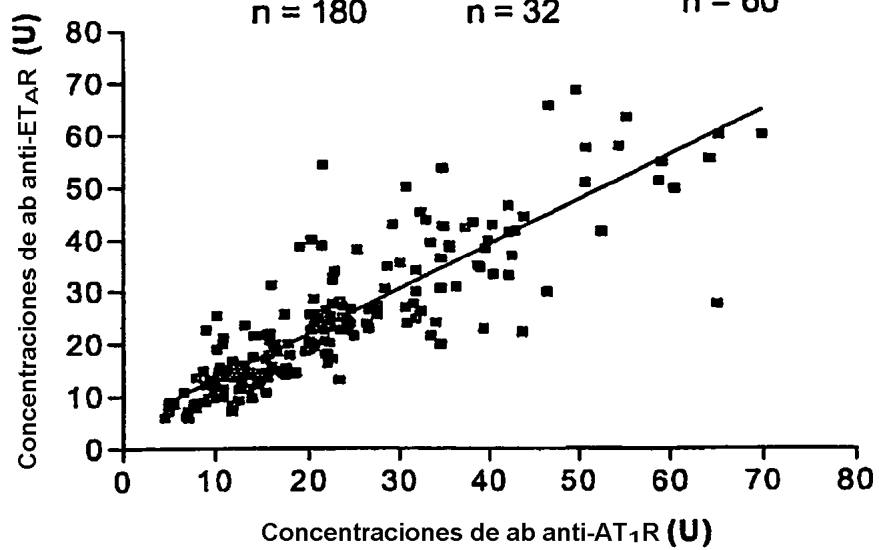


Fig. 3A

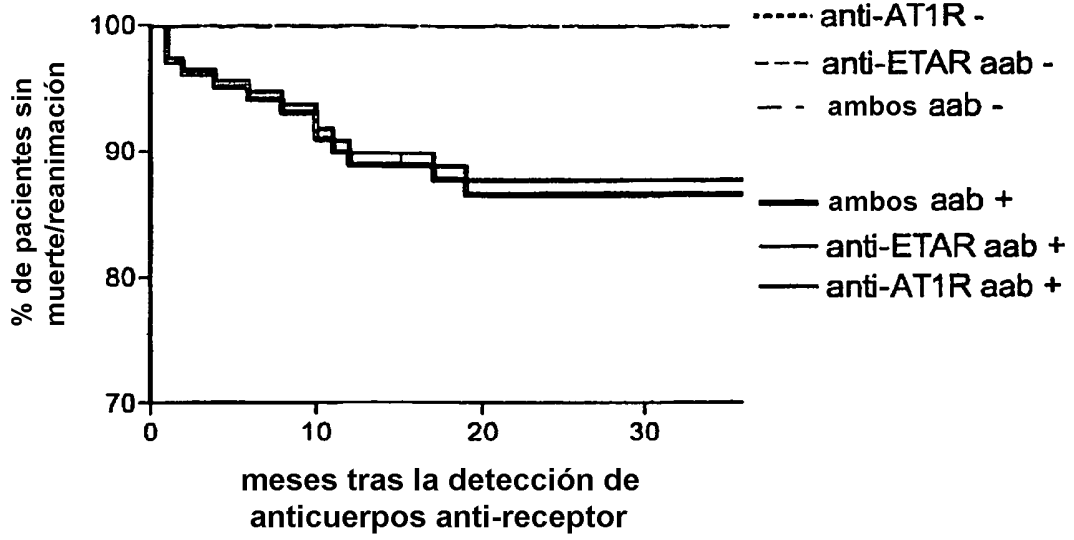


Fig. 3B

