



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0214872-2 B1

(22) Data do Depósito: 11/12/2002

(45) Data de Concessão: 13/12/2016



(54) Título: UNIDADE PEPTÍDICA E MULTIPEPTÍDICA, MÉTODO EX VIVO PARA DETECTAR AUTO-ANTICORPOS DE PACIENTES SOFRENDO DE ARTRITE REUMATOIDE E PARA SELEÇÃO DE UM PEPTÍDEO ADEQUADO PARA O DIAGNÓSTICO DA REFERIDA DOENÇA, E KIT DE DIAGNÓSTICO

(51) Int.Cl.: G01N 33/564; G01N 33/68; C07K 7/08; C07K 14/47

(30) Prioridade Unionista: 11/12/2001 NL 1019540

(73) Titular(es): STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN

(72) Inventor(es): WALTHERUS JACOBUS WILHELMUS VAN VENROOIJ; JAN WOUTER DRIJFHOUT; MARTINUS ADRIANUS MARIA VAN BOEKEL; GERARDUS JOZEF MARIA PRUIJN

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"UNIDADE PEPTÍDICA E MULTYPEPTÍDICA, MÉTODO *EX VIVO* PARA DETECTAR AUTO-ANTICORPOS DE PACIENTES SOFRENDO DE ARTRITE REUMATOIDE E PARA SELEÇÃO DE UM PEPTÍDEO ADEQUADO PARA O**
5 **DIAGNÓSTICO DA REFERIDA DOENÇA, E KIT DE DIAGNÓSTICO"**.

A presente invenção refere-se a um método de detectar auto-anticorpos de pacientes sofrendo de artrite reumatóide, usando um peptídeo compreendendo um resíduo de citrulina ou seu análogo.

Um tal método é conhecido do pedido de patente internacional
10 PCT/NL97/00624. Esta publicação descreve o uso de peptídeos derivados de filagrina, e que compreendem a citrulina ou um seu análogo para a detecção de auto-anticorpos de pacientes sofrendo de artrite reumatóide. Os peptídeos usados são, portanto, adequados para aplicações diagnósticas, e comparados com até então, tornam possível uma detecção mais segura. Mais em particular, isto diz respeito a
15 uma diminuição nos falsos positivos, isto é, uma especificidade maior. Além disso, a sensibilidade é relativamente alta. Um peptídeo, indicado como cfc1, foi reconhecido por 36% dos soros de pacientes sofrendo de artrite reumatóide. A variante cíclica do peptídeo pareceu ser reconhecida ainda melhor (63%).

Um método de acordo com o preâmbulo é também conhecido do
20 pedido de patente internacional PCT/FR00/01857. Esta publicação descreve o uso de peptídeos derivados de fibrina ou fibrinogênio, e que compreendem a citrulina ou um análogo da mesma para a detecção de auto-anticorpos de pacientes sofrendo de artrite reumatóide.

O PCT/EP98/07714 descreve o uso de peptídeos sintéticos derivados de (pro)filagrina para a diagnose de artrite reumatóide. Este pedido
25 também descreve peptídeos sintéticos derivados de vimentina humana, citoceratina 1, citoceratina 9 e outras proteínas de filamentos intermediárias.

Entretanto, os métodos acima mencionados ainda somente detectam um número limitado de todos os pacientes sofrendo de artrite reumatóide. Portanto, há uma forte necessidade por um método pelo qual possa
30 ser obtida uma sensibilidade aumentada, ao mesmo tempo mantendo uma especificidade substancialmente igual ou mesmo melhorada.

A fim de atingir este objetivo, a presente invenção proporciona

um método como mencionado no preâmbulo, método este que é caracterizado pelo fato de que os ditos auto-anticorpos são contatados com uma unidade peptídica compreendendo o motivo XG, e uma unidade peptídica compreendendo o motivo XnonG, em que X é um resíduo de citrulina ou um seu análogo, G é o aminoácido glicina e nonG é um aminoácido diferente da glicina.

As experiências descritas abaixo mostraram que os soros obtidos de pacientes sofrendo de artrite reumatóide contêm duas populações diferentes de anticorpos. Uma população é reativa com as unidades peptídicas XG, tal como foi descrito na literatura pré-publicada acima mencionada. A população pode, em parte, ser detectada com as unidades peptídicas XG pré-publicadas e, para uma parte ainda maior, quando usando as unidades peptídicas de acordo com a presente invenção. A outra população de anticorpos reage com as unidades peptídicas XnonG. Até agora, esta população de anticorpos não tinha ainda sido observada como tal na literatura pré-publicada. Conforme descrito abaixo em mais detalhe, a maior parte dos soros de pacientes sofrendo de artrite reumatóide compreende ambas as populações de anticorpos. Conseqüentemente, estes soros podem ser detectados por meio de um teste diagnóstico compreendendo uma unidade peptídica XG ou uma XnonG. Parece, entretanto, que uma parte significativa dos soros de pacientes sofrendo de artrite reumatóide compreende somente uma das duas populações. Portanto, os soros que compreendem anticorpos para a unidade peptídica XnonG somente não são, ou somente para uma parte muito pequena, detectados com os testes diagnósticos como descritos na literatura publicada acima mencionada. Uma grande parte destes soros pode agora ser detectada se o teste diagnóstico compreender uma unidade peptídica XnonG. Um método diagnóstico aperfeiçoado de acordo com a presente invenção, portanto, compreende pelo menos um peptídeo XG e um XnonG. Assim, o teste diagnóstico de acordo com a invenção pode ser 20% mais sensível do que um teste de acordo com a literatura publicada.

Foram obtidos resultados particularmente bons quando a unidade peptídica com o motivo XnonG compreendeu uma parte não derivada de

proteínas naturais, tais como a (pro)filagrina humana, a fibrina, ou o fibrinogênio, bem como as proteínas relacionadas vimentina, e citoceratina 1 e citoceratina 9 ou outras proteínas de filamentos intermediárias relacionadas.

Surpreendentemente foi mostrado que, quando combinando tais
 5 peptídeos XnonG não derivados de proteínas naturais com os peptídeos XG de acordo com a invenção, foi obtido um método diagnóstico mais aperfeiçoado. Mais em particular, o uso de uma tal combinação de unidades peptídicas no método de acordo com a presente invenção proporciona um método diagnóstico de uma sensibilidade muito grande, ao mesmo tempo man-
 10 tendo uma excelente especificidade. Isto é ainda mais surpreendente, visto que a literatura publicada acima mencionada é ainda baseada na idéia que os auto-anticorpos de pacientes com RA reagem especialmente bem com peptídeos derivados de proteína de ocorrência natural, tal como a (pro)filagrina, a fibrina, o fibrinogênio, a vimentina, a citoceratina 1 ou a citoceratina 9. O PCT/EP98/07714, por exemplo, descreve um peptídeo XnonG
 15 derivado de filagrina (IPG1249). Ele é reativo cruzado com 3,3% dos soros de pacientes com SLE e tem uma homologia de 82% com a filagrina.

São obtidos bons resultados quando a unidade peptídica com o motivo XnonG compreende um tri-peptídeo, no qual o aminoácido central é a
 20 citrulina ou um seu análogo, e que uma seleção é preferivelmente feita a partir de XXK, XXY, KXI, MXR, RXY, WXK, MXH, VXK, NXR, WXS, RXW, YXM, IXX, XXF, RXH, TXV, PXH, AXF, FXR, YXF, LXM, LXY, YXP, HXS e PXW.

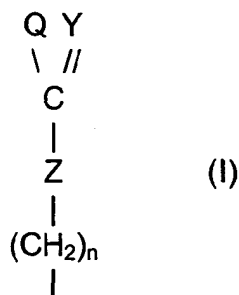
De preferência, nonG é um aminoácido selecionado de H, I, W,
 25 S, R, K, Y, M, F, V, P, Cit ou um análogo destes. Conforme mostrado nas experiências abaixo, tais unidades peptídicas XnonG são muito eficazes.

A unidade peptídica compreendendo o motivo XG pode ou não ser derivada de (pro)filagrina, fibrina, fibrinogênio, vimentina, citoceratina 1 ou citoceratina 9, e efetivamente o cfc1 conhecido do PCT/NL97/00624.

30 Neste contexto, o termo aminoácido inclui os aminoácidos tanto naturais quanto não-naturais, bem como os aminoácidos tendo uma configuração D ou uma configuração L.

No presente pedido, um aminoácido não-natural é entendido ser um aminoácido do tipo que ocorre em um peptídeo retroinverso, retropeptídeo, um peptídeo em que a cadeia lateral está localizada sobre o átomo de nitrogênio da amida do esqueleto peptídico, e um peptídeo em que um CO do esqueleto peptídico é substituído por 2, 3 ou preferivelmente um único grupo -CH₂- (pseudopeptídeo).

Os aminoácidos também podem ser modificados. Por exemplo, os grupos ácidos carboxílicos podem ser esterificados ou podem ser convertidos em uma amida, e um grupo amino pode ser alquilado, por exemplo metilado. Alternativamente, os grupos funcionais sobre o peptídeo podem ser providos com um grupo protetor ou uma marca (por exemplo, uma marca fluorescente ou radioativa). Os grupos amino e os grupos ácidos carboxílicos nos peptídeos podem estar presentes na forma de um sal formado por utilização de um ácido ou uma base. Se os peptídeos sintéticos forem usados, é muito simples preparar todos os tipos de variantes que incidem no escopo da invenção que podem ser usados. Por exemplo, os grupos laterais aromáticos, tais como de fenilalanina e tirosina, podem ser halogenados com um ou mais átomos de halogênio. As modalidades de peptidomiméticos e organomiméticos também incidem no escopo da invenção e a sua aplicação no método de acordo com a invenção. Em vez de um resíduo Cit, é também possível usar um análogo do mesmo, tal como aqueles representados na Fig. 1 na forma do aminoácido. Tais análogos e a sua preparação são conhecidos para a pessoa versada na técnica. Por exemplo, Sonke et al., em Stereoselective Biocatalysis (2000), pp. 23-58, e Greene: Protective groups in Organic synthesis (Wiley, New York 1999). De acordo com uma modalidade favorável, as cadeias laterais dos análogos de citrulina têm a fórmula (I):



em que

$Q = \text{NH}_2, \text{CH}_3, \text{NHCH}_3 \text{ ou } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Y = \text{O}, \text{NH}, \text{ ou } \text{NCH}_3;$

$Z = \text{O}, \text{NH} \text{ ou } \text{CH}_2;$ e

5 $n = 2, 3 \text{ ou } 4;$

nas condições que se $Q = \text{NH}_2$ e $Z = \text{NH}$, Y não seja NH .

Neste contexto, uma unidade peptídica é entendida ser um peptídeo que é pelo menos 7 aminoácidos comprido. As unidades peptídicas podem ter uma ou mais cadeias laterais. Também, as unidades peptídicas
10 ou as extremidades terminais da unidade peptídica podem ser acetiladas, glicosiladas, alquiladas, ou fosforiladas independentemente uma da outra.

Uma unidade peptídica neste contexto é indicada como não derivada de (pro)filagrina, fibrina, fibrinogênio, vimentina, citoceratina 1 ou citoceratina 9 e outras proteínas de filamentos intermediárias se a homologia (a
15 similaridade da sequência de aminoácidos) a estas proteínas for menos do que 80%, mais preferivelmente menos do que 75%, tal como menos do que 70% ou 65%, e mais preferivelmente menos do que 60%, tal como menos do que 55% ou 50%. As unidades peptídicas mostradas na Tabela 5, que não
20 são derivadas de (pro)filagrina, fibrina, fibrinogênio, vimentina, citoceratina 1 e citoceratina 9, têm uma homologia entre 15 e 45%. No exame da homologia, a arginina, a citrulina e os análogos de citrulina são considerados serem equivalentes (idênticos).

As unidades peptídicas compreendendo XG e XnonG podem ou não ser parte da mesma molécula. Isto será atacado posteriormente. Para
25 realizar um ensaio de detecção, as unidades peptídicas podem ser ligadas a um veículo e opcionalmente providas com uma marca. O complexo pode ser detectado em qualquer maneira bem-conhecida para a pessoa comum versada na técnica. O complexo pode ser detectado indiretamente, por exemplo no caso de um ensaio de competição, em que o complexo propriamente dito
30 não é marcado. A reação com as duas unidades peptídicas pode ocorrer simultânea ou sucessivamente e no mesmo recipiente (tal como uma cavidade de uma placa de microtítulo) ou em diferentes recipientes.

Este pedido não é pretendido como uma publicação educacional sobre como tornar uma pessoa versada na técnica. Ele está, portanto, limitado a proporcionar informação suficiente para capacitar a pessoa comum versada na técnica a entender a invenção, e a trabalhá-la, e a entender o escopo de proteção.

De preferência, as unidades peptídicas são reconhecidas por pelo menos 2 de 100 soros aleatórios de pacientes com RA reconhecidos. Obviamente, é preferido usar as unidades peptídicas que sejam reconhecidas por uma porcentagem consideravelmente mais alta, preferivelmente pelo menos 30%. O número de unidades peptídicas em um método de acordo com a invenção é preferivelmente 2 ou maior do que 2.

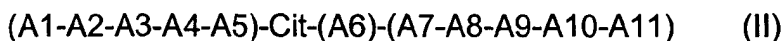
De preferência, a invenção refere-se a um método como mencionado acima, em que a unidade peptídica com o motivo XG e a unidade peptídica com o motivo XnonG são reconhecidas juntas por pelo menos 10% da série de soros dos pacientes. Obviamente, são preferidas as combinações de unidades peptídicas resultando em maiores sensibilidades. Com algumas combinações de unidades peptídicas como descritas neste documento, podem ser realizados testes diagnósticos com sensibilidades de 40, 60, 70, 80 ou mesmo 85 e mais do que 90%.

Foi mostrado que a sensibilidade da detecção pode ser adicionalmente aumentada se pelo menos uma das unidades peptídicas for uma unidade peptídica cíclica.

A unidade peptídica com o motivo XG e a unidade peptídica com o motivo XnonG são preferivelmente parte de um multipeptídeo. No contexto da presente invenção, um multipeptídeo é uma molécula compreendida de pelo menos duas unidades peptídicas antigênicas, isto é combinações de unidades peptídicas que podem ou não ser ligadas por uma ligação covalente. Tais multipeptídeos pode ser compreendidos de unidades peptídicas lineares, ramificadas, cíclicas ou uma combinação destas. Os multipeptídeos podem ser compreendidos tanto de unidades peptídicas tendo a mesma sequência de aminoácidos, quanto de unidades peptídicas tendo diferentes sequências de aminoácidos. Um multipeptídeo de acordo com a invenção

compreende pelo menos 7, preferivelmente pelo menos 10 aminoácidos, isto é as unidades peptídicas podem sobrepor-se. Nem é preciso dizer que os motivos XG e XnonG não podem sobrepor-se.

A invenção também refere-se a uma unidade peptídica XnonG, muito útil para o método de acordo com a presente invenção, compreendendo uma seqüência com a fórmula (II):



em que

- A1-A2-A3-A4-A5 é uma seqüência de aminoácidos selecionada de

- 10 - RHGRQ
- IRCitYK
- HGRQCit
- GRQCitCit
- FQMCitH
- 15 - CitWRGM
- ARFQM
- QCitYKW
- KPYTV
- RNLRL
- 20 - RRRCitY
- RFKSN
- RGKSN
- RWVSQ
- MKPRY
- 25 - KSFVW
- YSFVW
- FQMRH
- RNMNR
- RMGRP

30 e as suas seqüências homólogas;

- A7 um aminoácido diferente da glicina;
- A7-A8-A9-A10-A11 uma seqüência de aminoácidos selecionada de

- KYIIY
- TNRKF
- KWCitKI
- CitRAVI
- 5 - RCitGHS
- CitGRSR
- CitYIIY
- CitRLIR
- IERKR
- 10 - FMRKP
- FMRRP
- ERNHA
- AVITA
- TPNRW
- 15 - TYNRW
- RTPTR
- RIVVV
- HARPR
- RGMCitR
- 20 - IRFPV

e as suas seqüências homólogas;

bem como os análogos funcionais do peptídeo com a fórmula (II).

- A invenção também refere-se a uma unidade peptídica XnonG, muito útil para o método de acordo com a presente invenção, compreendendo uma seqüência com a fórmula (III):

(B1-B2-B3-B4-B5-B6)-Cit-(B7)-(B8-B9-B10-B11) (III)

em que

- B1-B2-B3-B4-B5-B6 é uma seqüência de aminoácidos selecionada de
- INCitRAS
- 30 - ICitKRLY
- KCitCitYNI
- RLYFICit

- IRQGAR
 - CitERCitVQ
 - CitHQRIT
 - RICitRVCit
 - 5 - GRNQRY
 - RCitRQHP
 - CitCitRCitVA
 - RPKQHV
 - RKCitGCitR
 - 10 - RCitCitRNT
 - RCitQCitFT
 - QLVYLQ
 - QYNRFK
 - CitLRHIR
 - 15 - PRCitCitCitK
 - RCitQVRY
 - GRCitHAH
 - ARHVIR
 - RCitGHMF
 - 20 - GRNIRV
 - QIFYLCit
 - RQGPIA
 - GVYLR
 - NCitCitRRV
 - 25 - KCitRLCitY
 - GRRCitCitL
 - RMPHCitH
- e as suas seqüências homólogas;
- B7 é um aminoácido diferente da glicina;
 - 30 - B8-B9-B10-B11 uma seqüência de aminoácidos selecionada de
 - CitHRR
 - CitIRR

- FRRN
- AQTT
- GYPK
- RPPQ
- 5 - GCitRK
- PIPR
- YTIH
- RIKA
- CitRVR
- 10 - TRRP
- TIRP
- IKCitR
- RNVV
- CitRRY
- 15 - CitRPR
- TRCitCit
- CitCitGR
- LCitRCit
- RVRCit
- 20 - VPRT
- YCitFR
- ARCitCit
- RQCitR
- HIRR
- 25 - CitMMR
- CitRICit
- VRKS
- PCitCitR
- CitRRK

30 e as suas seqüências homólogas;

bem como os análogos funcionais do peptídeo com a fórmula (III).

O termo "seqüência homóloga", como usado em conexão com

A1-A2-A3-A4-A5, A7-A8-A9-A10-A11, B1-B2-B3-B4-B5-B6 e B8-B9-B10-B11, significa que no máximo dois aminoácidos de cada seqüência de aminoácidos podem ser substituídos por outros tantos aminoácidos (incluindo a citrulina e/ou o seu análogo), no máximo dois aminoácidos (incluindo ou um seu análogo) podem ser introduzidos e no máximo dois aminoácidos podem estar ausentes.

O termo "análogo", como usado em conexão com o peptídeo da fórmula (II) ou (III), significa que opcionalmente

- um ou mais aminoácidos podem ter a configuração D,
- uma ou mais cadeias laterais (diferentes daquela de citrulina ou um análogo da mesma) ou extremidades terminais do peptídeo podem ser acetiladas, glicosiladas, alquiladas, ou fosforiladas independentemente uma da outra, e
- um ou mais aminoácidos podem ser substituídos por aminoácidos não-naturais.

A6 e B7 (independente um do outro) são preferivelmente selecionados de Cit, H, I, K, R, S, W, Y, M, F, V e P.

Os peptídeos preferidos específicos a serem usados no método de acordo com a invenção são caracterizados pelo fato de que eles compreendem pelo menos uma seqüência de peptídeos selecionada de

20 R H G R Q **Cit Cit K Y I I Y**
 I R **Cit Y K Cit I T N R K F**
 R H G R Q **Cit Cit Cit Y I I Y**
 A R F Q M **Cit H Cit R L I R**
 Q **Cit Y K W Cit K I E R K R**
 25 K P Y T V **Cit K F M R K P**
 K P Y T V **Cit K F M R R P**
 R N L R L **Cit R E R N H A**
 R R R **Cit Y Cit R A V I T A**
 R F K S N **Cit R T P N R W**
 30 R G K S N **Cit R T Y N R W**
 R F K S N **Cit R T Y N R W**
 R G K S N **Cit R T P N R W**

RWVSQ **Cit** RRTPT R
 MKPRY **Cit** RRIVVV
 KSFVW **Cit** SHARPR
 YSFVW **Cit** SHARPR
 5 RNMNR **Cit** WRGM **Cit** R, e
 RMGRP **Cit** WIRFPV
 bem como
 IN **Cit** RAS **Cit** K **Cit** HRR
 I **Cit** KRLY **Cit** M **Cit** IRR
 10 K **Cit** **Cit** YNI **Cit** **Cit** FRRN
 RLYFI **Cit** **Cit** RAQTT
 IRQGAR **Cit** RGYPK
Cit ER **Cit** VQ **Cit** RRPPQ
Cit HQRIT **Cit** VG **Cit** RK
 15 RI **Cit** RV **Cit** **Cit** TPIPR
 GRNQRY **Cit** LYTIH
 R **Cit** RQHP **Cit** HRIKA
Cit **Cit** R **Cit** VA **Cit** F **Cit** RV R
 RPKQHVCit HTRRP
 20 RK **Cit** G **Cit** R **Cit** **Cit** TIRP
 R **Cit** **Cit** RNT **Cit** HIK **Cit** R
 R **Cit** Q **Cit** FT **Cit** **Cit** RNVV
 QLVYLQ **Cit** **Cit** **Cit** RRY
 QYNRFK **Cit** **Cit** **Cit** RPR
 25 **Cit** LRHIR **Cit** QTR **Cit** **Cit**
 PR **Cit** **Cit** **Cit** K **Cit** R **Cit** **Cit** GR
 R **Cit** QVRY **Cit** **Cit** L **Cit** R **Cit**
 GR **Cit** HAH **Cit** PRVR **Cit**
 ARHVIR **Cit** **Cit** VPRT
 30 R **Cit** GHMF **Cit** VY **Cit** FR
 GRNIRV **Cit** **Cit** AR **Cit** **Cit**
 QIFYL **Cit** **Cit** HRQ **Cit** R

R Q G P I A Cit L H I R R
 G V Y L V R Cit L Cit M M R
 N Cit Cit R R V Cit M Cit R I Cit
 K Cit R L Cit Y Cit P V R K S
 5 G R R Cit Cit L Cit R P Cit Cit R
 R M P H Cit H Cit S Cit R R K

ou um seu análogo.

Os peptídeos XG adequados, a serem usados no método de acordo com a invenção, preferivelmente compreendem a seqüência com a fórmula (IV)

(C1-C2)-(C3-C4-C5)-X-G-C6-(C7-C8-C9-C10) (IV)

em que

C1-C2 é HQ, GF, EG ou GV;

C3-C4-C5 representa 3 aminoácidos dos quais pelo menos 1, e preferivelmente 2 independentemente um do outro são básicos, aromáticos ou V;

C6 é igual a um aminoácido básico ou aromático, ou igual a A, G, E, P, V, S ou Cit ou seu análogo; e

C7-C8-C9-C10 é SRAA, SCitAA, RPLD, RVVE ou PGLD;

bem como os análogos do peptídeo com a fórmula (IV).

O termo 'análogo', como usado em conexão com o peptídeo da fórmula (IV), significa que opcionalmente

- um ou mais aminoácidos podem ter a configuração D,
- uma ou mais cadeias laterais (diferentes daquela de citrulina ou um análogo da mesma) ou extremidades terminais do peptídeo independentemente uma da outra podem ser acetiladas, glicosiladas, alquiladas, ou fosforiladas, e
- um ou mais aminoácidos podem ser substituídos por aminoácidos não-naturais.

Os exemplos específicos de peptídeos XG adequados para serem usados no método de acordo com a invenção compreendem uma seqüência selecionada de

HQRKW **Cit** GASRAA
 HQHWR **Cit** GASRAA
 HQFRF **Cit** G **Cit** SRAA
 HQERR **Cit** GESRAA
 5 HQKWR **Cit** GFSRAA
 HQRWK **Cit** GGSRAA
 HQRRT **Cit** GGSRAA
 HQRRG **Cit** GGSRAA
 HQ **Cit** FR **Cit** GHSRAA
 10 GFFSA **Cit** GHRPLD
 HQERG **Cit** GKSRAA
 HQEKR **Cit** GKSRAA
 HQRWL **Cit** GKSRAA
 HQKRN **Cit** GKSRAA
 15 EGGGV **Cit** GPRVVE
 HQWRH **Cit** GRS **Cit** AA
 HQKWN **Cit** GRSRAA
 HQKFW **Cit** GRSRAA
 HQK **Cit** K **Cit** GRSRAA
 20 HQKWR **Cit** GRS **Cit** AA
 HQAWR **Cit** GRS **Cit** AA
 HQNQW **Cit** GRSRAA
 HQNSK **Cit** GRSRAA
 HQKRR **Cit** GRSRAA
 25 HQKRF **Cit** GRSRAA
 HQKRY **Cit** GRSRAA
 HQKRH **Cit** GRSRAA
 HQERA **Cit** GSSRAA
 HQEKM **Cit** GVSRAA
 30 HQKRG **Cit** GWSRAA
 HQRRV **Cit** GWSRAA
 HQWNR **Cit** GWSRAA

H Q Q R M Cit G W S R A A
 H Q S H R Cit G W S R A A
 H Q F R F Cit G W S R A A
 H Q K R R Cit G W S R A A
 5 G V K G H Cit G Y P G L D

ou um seu análogo.

Os peptídeos de acordo com a invenção são preferivelmente peptídeos cíclicos dos quais o anel compreende pelo menos 10 aminoácidos, e mais preferivelmente pelo menos 11 aminoácidos. A pessoa versada na técnica está inteirada com os diversos métodos para a preparação de peptídeos cíclicos e uma explicação adicional não é requerida.

De acordo com o método mais preferido da invenção, um peptídeo XG é usado em combinação com pelo menos um peptídeo XnonG, em que o peptídeo XG é selecionado do grupo compreendido de:

15 0002-27 H Q K R G Cit G W S R A A
 0002-29 H Q R R V Cit G W S R A A
 0002-31 H Q R R T Cit G G S R A A
 0002-32 H Q R K W Cit G A S R A A
 0002-36 H Q F R F Cit G Cit S R A A
 20 0002-37 H Q K W R Cit G R S Cit A A
 0002-63 H Q F R F Cit G W S R A A

e o peptídeo XnonG é escolhido do grupo compreendido de:

0107-32 K P Y T V Cit K F M R R P
 0107-35 A R F Q M Cit H Cit R L I R
 25 0107-45 Y S F V W Cit S H A R P R
 0113-30 A R F Q M R H Cit R L I R
 0218-36 R N L R L Cit R E R N H A

Dependendo da especificidade desejada e da sensibilidade do teste diagnóstico e da população respectiva de soro de artrite reumatóide sob exame, é selecionada uma combinação preferida de unidades peptídicas XG e XnonG a partir do grupo compreendido de:

0002-27 e 0107-32; 0002-27 e 0107-35; 0002-27 e 0107-45;

0002-27 e 0113-30; 0002-27 e 0218-36; 0002-29 e 0107-32; 0002-29 e 0107-35; 0002-29 e 0107-45; 0002-29 e 0113-30; 0002-29 e 0218-36; 0002-31 e 0107-32; 0002-31 e 0107-35; 0002-31 e 0107-45; 0002-31 e 0113-30; 0002-31 e 0218-36; 0002-32 e 0107-32; 0002-32 e 0107-35; 0002-32 e 0107-45; 0002-32 e 0113-30; 0002-32 e 0218-36; 0002-36 e 0107-32; 0002-36 e 0107-35; 0002-36 e 0107-45; 0002-36 e 0113-30; 0002-36 e 0218-36; 0002-37 e 0107-32; 0002-37 e 0107-35; 0002-37 e 0107-45; 0002-37 e 0113-30; 0002-37 e 0218-36; 0002-63 e 0107-32; 0002-63 e 0107-35; 0002-63 e 0107-45; 0002-63 e 0113-30; 0002-63 e 0218-36.

10 As combinações acima mencionadas foram mostradas produzir um aumento médio na sensibilidade de 6%, levando a sensibilidade total de um tal teste de combinação de um peptídeo XG e um XnonG para 75 a 78%.

Os resultados descritos nos exemplos abaixo adicionalmente mostraram que as diversas unidades peptídicas também detectaram diferentes coortes de soros. Foi obtido um aumento adicional na sensibilidade por adição de uma terceira unidade peptídica ou mesmo uma quarta ou mais unidades peptídicas. Dependendo da combinação de unidades peptídicas selecionadas a partir dos grupos acima mencionados, um teste diagnóstico de acordo com a invenção permitiu que sensibilidades de 88-92% fossem atingidas.

A invenção também refere-se a um multipeptídeo, caracterizado pelo fato de que ele é um multipeptídeo linear ou ramificado, compreendendo pelo menos duas seqüências de peptídeos lineares ou cíclicas selecionadas independentemente uma da outra de

- 25 - uma unidade peptídica selecionada de unidades peptídicas com as fórmulas (II) e (III) e seus análogos;
- uma unidade peptídica com a fórmula (IV) e seus análogos.

Um tal multipeptídeo é muito adequado para uso no método de acordo com a invenção. Ele torna possível realizar o método de modo mais simples e mais seguro, visto que os peptídeos são usados na mesma razão conhecida, e as operações extras durante o ensaio ou durante o trabalho preliminar (por exemplo, o revestimento de uma placa de microtítulo com o

multiptéideo) são evitadas.

A invenção adicionalmente refere-se a um kit diagnóstico para determinar a presença de auto-anticorpos de pacientes sofrendo de artrite reumatóide, em que o kit diagnóstico compreende um peptídeo de acordo com uma das reivindicações 5 a 13, ou um multiptéideo de acordo com a reivindicação 14, ou uma mistura destes, juntamente com pelo menos um reagente adicional.

A invenção também se refere a um peptídeo ou um anticorpo de uma molécula de imunotoxina como descrita acima, ou uma composição destes para uso como uma composição farmacêutica.

A presente invenção adicionalmente se refere a um peptídeo ou um anticorpo de uma molécula de imunotoxina como descrita acima, ou uma composição destes para preparar uma composição farmacêutica ou um agente diagnóstico para artrite reumatóide.

A presente invenção também se refere à aplicação de um peptídeo ou uma composição deste como descrita acima para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças auto-imunes, por aumento do tamanho dos complexos imunológicos de antígenos, o que aperfeiçoa a clarificação dos complexos imunológicos formados.

A presente invenção, portanto, também se refere a um método para o tratamento de artrite reumatóide, por introdução no corpo de um paciente requerendo tal tratamento de pelo menos um peptídeo de acordo com a invenção.

A invenção adicionalmente refere-se a um método para a seleção de um peptídeo adequado para a diagnose de RA, em que a biblioteca de peptídeos é examinada com os anticorpos obtidos de pacientes com RA e em que a biblioteca de peptídeos é selecionada de um grupo compreendido de:

Bib (1): H Q E X X Cit X X S R A A

Em que X = qualquer aminoácido, exceto a cisteína e o triptofano

Bib (2): H Q X X X Cit G X S R/Cit A A

Em que X = qualquer aminoácido, exceto a cisteína, porém incluindo a Citru-

lina

Bib (3): H Q E X X Cit X X S R/Cit A A

Em que X = qualquer aminoácido, exceto a cisteína, porém incluindo a Citru-
lina

5 Bib (4): X X X X X X Cit X X X X X

Em que X = qualquer aminoácido, exceto a cisteína, porém incluindo a Citru-
lina

ou seus equivalentes.

10 Finalmente, a invenção refere-se a um peptídeo que pode ser
obtido com o auxílio do método antes mencionado a ser usado em um en-
saio diagnóstico.

Os termos "uma composição farmacêutica para o tratamento" ou
"uma droga para o tratamento" ou "o uso de proteínas para a preparação de
uma droga para o tratamento" referem-se a uma composição compreenden-
15 do um peptídeo, como descrito acima, ou um anticorpo que se liga especifi-
camente ao peptídeo e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitá-
vel (os dois termos são intercambiáveis) para o tratamento de doenças,
como descrito acima. Os veículos ou os excipientes adequados com os
quais a pessoa comum versada na técnica está familiarizada são a solução
20 salina, a solução de Ringer, a solução de dextrose, a solução de Hank, os
óleos, o oleato de etila, a dextrose a 5% em solução salina, as substâncias
que aperfeiçoam a isotonicidade e a estabilidade química, os tampões e os
conservantes. Os outros veículos adequados incluem qualquer veículo que
não induza, ele próprio, a produção de anticorpos nocivos para o indivíduo
25 recebendo a composição, tal como as proteínas, os polissacarídeos, os áci-
dos polilácticos, os ácidos de poliglicol, os aminoácidos poliméricos e os po-
límeros de aminoácidos. A "droga" pode ser administrada em qualquer ma-
neira conhecida para a pessoa comum, versada na técnica.

Os peptídeos de acordo com a invenção podem ser marcados
30 (radioativos, fluorescentes ou de outro modo, conforme bem-conhecido na
técnica) ou podem ser providos com um veículo. Nesta forma também tais
peptídeos incidem no escopo da invenção. Por exemplo, um peptídeo pode

ser acoplado a uma proteína veículo, tal como a Hemocianina de Lapa de Buraco de Fechadura ou a soro albumina bovina. Também, o peptídeo de acordo com a invenção pode ser acoplado de modo não-covalente ou covalente a um veículo sólido, tal como uma microesfera (ouro, poliestireno, etc.), lâminas, fragmentos, ou uma parede de um vaso reator ou de uma cavidade de uma placa de microtítulo. O peptídeo pode ser marcado com uma marca direta ou uma indireta. Os exemplos incluem a biotina, a fluoresceína e uma enzima, tal como a peroxidase da raiz-forte. Tudo isto é geralmente conhecido para a pessoa comum, versada na técnica, e não requer nenhuma explicação adicional.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Síntese dos Peptídeos

Os peptídeos citrulinados foram sintetizados conforme descrito por De Koster H.S. et al., (J. Immunol. Methods, 187, pp. 177-188, (1995)). Foram usadas contas, às quais foram ligadas as moléculas peptídicas via uma ligação de amida de modo que, após a remoção dos grupos protetores, as moléculas peptídicas ainda estavam ligadas à conta. Para a síntese dos peptídeos, foi usado um sintetizador de peptídeos múltiplos automatizado (Abimed AMS422, Abimed, Langenfeld, Alemanha). Os aminoácidos incorporados e o ligador de peptídeo ácido 6-aminoexano foram protegidos por um grupo Fmoc, e para facilitar o acoplamento, os aminoácidos protegidos foram ativados com PyBOP e N-metilmorfolina. Onde necessário, as cadeias laterais foram protegidas com grupos que protegem as cadeias laterais sensíveis a ácidos. As contas usadas tinham um diâmetro de aproximadamente 100 μm e compreendiam aproximadamente 100 pmoles de peptídeo cada. É estimado que aproximadamente 0,5% desta quantidade é ligada ao lado de fora e está, em princípio, acessível para os anticorpos.

Para a síntese em quantidades maiores, foram usadas contas que foram proporcionadas com um ligador sensível a ácido. A química da síntese de peptídeos era largamente comparável com a já descrita acima. Os peptídeos foram separados com ácido trifluoracético e isolados por meio de precipitação com éter, tudo em concordância com os métodos bem-

conhecidos na técnica e para os quais a pessoa comum versada na técnica não requer nenhuma explicação adicional. É obviamente também possível adquirir peptídeos com uma seqüência desejada comercialmente. A pureza e a identidade dos peptídeos individuais foram checadas por meio de RP-
 5 HPLC analítica e espectrometria de massa de tempo de voo (MALDI-TOF).

Com o auxílio do método acima mencionado, 4 bibliotecas de peptídeos foram criadas, cada uma compreendendo um grande número (8×10^6) de peptídeos citrulinados. As fórmulas abaixo mostram a seqüência de aminoácidos dos peptídeos em cada biblioteca.

10 Bib (1): H Q E X X Cit X X S R A A

Em que X = qualquer aminoácido, exceto a cisteína e o triptofano

Bib (2): H Q X X X Cit G X S R/Cit A A

Em que X = qualquer aminoácido, exceto a cisteína, porém incluindo a Citru-
 lina

15 Bib (3): H Q E X X Cit X X S R/Cit A A

Em que X = qualquer aminoácido, exceto a cisteína, porém incluindo a Citru-
 lina

Bib (4): X X X X X X Cit X X X X

Em que X = qualquer aminoácido, exceto a cisteína, porém incluindo a Citru-
 20 lina

Estas bibliotecas foram examinadas de acordo com o método descrito abaixo, usando soros de pacientes sofrendo de artrite reumatóide.

Exemplo 2: Reação dos peptídeos ligados às contas com os soros de paci-
 entes sofrendo de artrite reumatóide (RA)

25 Com o auxílio da Proteína A-Sepharose, a IgG foi isolada do soro de pacientes clinicamente diagnosticados estarem sofrendo de RA. As contas foram incubadas com uma solução compreendendo i) soro total do paciente, ou ii) IgG de um paciente conjugada a uma enzima relatora (kit de marcação de fosfatase alcalina; Roche/Boehringer, Mannheim, Alemanha).
 30 Para o soro (i) foi efetuada uma segunda incubação com um anticorpo anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina (Dako D0336; Dako Immunoglobulins, Glostrup, Dinamarca). Após cada incubação, as contas foram com-

pletamente lavadas com tampão Tris-HCl pH 8,9 (50 mM de Tris pH 8,9, 150 mM de NaCl, 0,5% de Tween® 20).

As contas com os peptídeos que tinham ligado a maior quantidade de IgG humana (após tingimento com um substrato de fosfatase alcalina que é convertido em um produto colorido insolúvel, estas tornaram-se as
5 contas mais intensamente coloridas) foram selecionadas com o auxílio de um microscópio.

Exemplo 3: ELISA

Os peptídeos mais interessantes foram sintetizados em uma
10 quantidade ligeiramente maior para formar uma variante linear e uma cíclica, e na maioria dos casos em uma variante de citrulina e arginina (=controle). Estes peptídeos foram testados quanto à reatividade com uma série de soros de pacientes com RA. Os peptídeos foram revestidos para placas de ELISA e incubados com os soros de pacientes com RA. Cada soro foi testa-
15 do em duplicata. Os soros de pessoas saudáveis foram usados como controle negativo.

Exemplo 4: A família dos peptídeos XG

Por utilização dos soros que deram uma reação positiva com cfc1 (ver o PCT/NL97/00624, que é desse modo incluído como forma de re-
20 ferência), os peptídeos com glicina foram encontrados sobre a posição +1 (isto é, C-terminal) em relação ao resíduo de citrulina. A substituição de G sobre +1 com, por exemplo, A (alanina) reduz a reatividade em 65%. Em certos peptídeos, o E (ácido glutâmico) sobre a posição -3 é preferivelmente não substituído por A (47% de perda de atividade). Similarmente, o Q (glu-
25 tamina) sobre -4, o H (histidina) sobre -5 e o S (serina) sobre +3 com frequência pareceram ser vantajosos.

Assim, foram selecionadas diversas seqüências dos peptídeos com a combinação -XG-, todas as quais reagiram com os soros de RA. Os exemplos específicos de membros preferidos desta família de XG são

30 Tabela 1: Família dos peptídeos XG:

H Q R K W Cit G A S R A A	(0002-32)
H Q H W R Cit G A S R A A	(0002-42)

	HQFRFCit G Cit S R A A	(0002-36)
	HQERRCit G E S R A A	(020699-2)
	HQKWRCit G F S R A A	(0102-74)
	HQRWKCit G G S R A A	(0002-28)
5	HQRRTCit G G S R A A	(0002-31)
	HQRRGCit G G S R A A	(0002-33)
	HQCit F RCit G H S R A A	(0002-43)
	GFFSACit G H R P L D	(0101-7)
	HQERGCit G K S R A A	(020699-1)
10	HQEKRCit G K S R A A	(020699-4)
	HQRWLCit G K S R A A	(0002-30)
	HQKRNCit G K S R A A	(0002-38)
	EGGGVCit G P R V V E	(0101-5)
	HQWRHCit G R S Cit A A	(0002-34)
15	HQKWCit G R S R A A	(0002-24)
	HQKFWCit G R S R A A	(0002-25)
	HQKCit K Cit G R S R A A	(0002-26)
	HQKWRCit G R S Cit A A	(0002-37)
	HQAWRCit G R S Cit A A	(0002-40)
20	HQNQWCit G R S R A A	(0002-44)
	HQNSKCit G R S R A A	(0002-45)
	HQKRRCit G R S R A A	(0102-76)
	HQKRFCit G R S R A A	(0102-77)
	HQKRYCit G R S R A A	(0102-78)
25	HQKRHCit G R S R A A	(0102-79)
	HQERACit G S S R A A	(020699-3)
	HQEKMCit G V S R A A	(020699-5)
	HQKRGCit G W S R A A	(0002-27)
	HQRRVCit G W S R A A	(0002-29)
30	HQWNRCit G W S R A A	(0002-35)
	HQQRMCit G W S R A A	(0002-41)
	HQSHRCit G W S R A A	(0002-39)

H Q F R F Cit G W S R A A	(0002-63)
H Q K R R Cit G W S R A A	(0102-75)
G V K G H Cit G Y P G L D	(0101-3)

5 A partir dos dados acima, uma seqüência de consenso é derivada de aminoácidos que parecem ter uma preferência por uma posição particular. Uma unidade peptídica XG sendo preferivelmente reconhecida por soros de RA pode, portanto, ser representada por:

-3	-2	-1	0	+1	+2
K	R	R	X	G	R
R	W				W
E					K

Todos estes peptídeos mostraram resultados bons a excelentes. Especialmente os peptídeos 0002-35, 0002-36 e 0002-63 foram muito satisfatórios. Na maioria dos casos, a variante cíclica de um tal peptídeo reagiu
10 ainda melhor (ver posteriormente). Incidentalmente, este não é sempre o caso. Por exemplo, o peptídeo linear 0101-7 reagiu com 55% dos soros. A variante cíclica deste peptídeo reagiu com "somente" 45% dos 186 soros de RA. Conforme esperado, as variantes de arginina destes peptídeos (em que
15 a(s) citrulina(s) é/são substituída(s) por arginina(s)) não reagiram com os soros de RA.

Exemplo 5: Variantes cíclicas dos peptídeos XG

Os peptídeos descritos abaixo foram ciclizados de acordo com o método de cisteína-ácido bromoacético. Diversas variantes cíclicas foram
20 testadas, com, em particular, as variantes cíclicas dos peptídeos 0002-27, 0002-29, 0002-31, 0002-36, e 0002-63 provando serem de interesse.

Tamanho do anel: diversos peptídeos que reagem adequadamente foram usados para sintetizar peptídeos cíclicos adicionais que cada um tinha um tamanho de anel diferente. Destes, os meros 8, 9, 10, 11 e 12
25 foram subseqüentemente testados. Todos estes peptídeos foram testados em ELISA com 48 soros de RA e 8 soros normais, respectivamente. Os meros 8 e 9 reagiram com alguns dos soros (com 22% (título 0,47) e 28% (título 0,5), respectivamente), porém os títulos (os valores de DO encontrados) eram muito menores do que quando foram usados anéis maiores (mero 10,

33%, com um título de 0,60; meros 11 e 12, 50%, com um título médio de 0,74).

Tabela 2: Resultados das análises dos soros usando o peptídeo cíclico 0002-36.

	N	% de soros positivos
RA	318	71
Lúpus Eritematoso Sistêmico	24	0
Síndrome de Sjögren prim	34	3
SSc Esclerodermia	10	0
PM, Polimiosite	11	0
Osteoartrite	29	0
Doença de Crohn	40	0
Colite ulcerosa	40	0
Doenças infecciosas (malária, clamídias, micoplasma, etc.)	250	1
Psoríase	10	0
Vasculite	30	0
Soro humano normal	84	0

- 5 A tabela acima descrita representa os ELISAs com soros obtidos de pacientes sofrendo de RA e de pacientes sofrendo de diversas outras doenças auto-imunes. Isto mostra a alta especificidade dos soros de RA por um peptídeo tal como o 0002-36. Praticamente nenhum dos casos mostrou serem positivos os soros obtidos de outras doenças auto-imunes e o material de pessoas saudáveis normais. A variante de arginina do peptídeo 0002-36 (R sobre a posição 0 e +2, isto é, em vez de Cit na fórmula) foi também testada e mostrada ser negativa com todos os soros de RA e normais testados.

- 10 **Tabela 3:** ELISA com 132 soros de RA com o peptídeo 36 comparado com o peptídeo cfc1 do [PCT/NL97/00624]:

peptídeo	cfc1 (linear)	cfc1 (cíclico)	0002-36 (linear)	0002-36 (cíclico)
soros positivos	48/132 36%	83/132 63%	80/132 61%	94/132 71%

Por utilização do cfc1 cíclico, bem como do 0002-36 cíclico,

pode ser ganha uma sensibilidade de 2% adicional (total 73%, ver a Tabela 4), que, para este tipo de aplicação, é um aperfeiçoamento bem-vindo, desde que não seja acompanhado por uma especificidade declinante. Este não parece ser o caso. Assim, dentro do grupo de peptídeos XG há uma diversidade com relação à sua capacidade de reagir com os anticorpos RA.

Tabela 4: ELISA com 186 soros de RA e variantes cíclicas de cfc1, 0002-36, e 0002-63

peptídeo	cfc1 (cíclico)	0002-63 (cíclico)	0002-36 (cíclico)	cfc1 + 0002-36 (cíclico)
soros positivos	51%	71%	71%	73%

Comparando as variantes lineares e as cíclicas de 0002-36 em duas coortes de soros de RA (no total 318 soros), a variante cíclica foi mostrada reagir mais freqüentemente (e melhor) do que a variante linear. Melhor, porque os valores de DO verificados com a variante cíclica eram também muito maiores do que com a composição linear. Quer fosse a variante cíclica criada via ligações -S-S- entre duas cisteínas, quer fosse via um tioéter formado, por exemplo, reagindo uma cisteína e um grupo bromoacetila (formado por reação de um tiol na cadeia lateral de uma cisteína com um grupo bromoacetila N-terminal, formando um tioéter), é irrelevante. O grupo bromoacetila N-terminal é formado, após a síntese do peptídeo, deixando o peptídeo ligado à conta (resina de peptila) reagir com o éster de N-hidróxi succinimida de ácido bromoacético no mesmo peptídeo. O fechamento do anel ocorre em uma solução de acetonitrila aquosa tamponada com fosfato, pH = 8.

Exemplo 6: A família dos peptídeos XnonG

Surpreendentemente, existiam também peptídeos encontrados que não foram derivados de (pro)filagrina, fibrina, fibrinogênio, vimentina, citoceratina 1 e citoceratina 9, e que foram reconhecidos pelos soros de RA que não, ou somente ligeiramente, reagiram com os peptídeos da família de XG descrita acima. Uma característica destes peptídeos é que a cadeia de aminoácidos e a C-terminal do Cit é básica (R, K, H), aromática (W, Y, F)

alifática (M, I, V) ou Cit, S ou P (ver a tabela 5), porém não G. Daí, o nome família de XnonG. Notavelmente, os peptídeos XnonG compreendem de modo relativo aminoácidos muito positivamente carregados sobre as posições -2, -1, +1 e +2. Assim, os anticorpos nestes soros de RA reagem com uma citrulina em um contexto de peptídeo diferente.

Os peptídeos XnonG mencionados todos reagem com um ou mais soros negativos para XG. Por exemplo, os peptídeos 0107-32, 0107-35, e 0107-45 reagem com aproximadamente 15-18% dos soros negativos para XG. Um teste de ELISA baseado em um ou mais destes peptídeos induz um aumento na sensibilidade de pelo menos 5% (até 73% a 78%) comparado com a combinação de cfc1 cíclico e 0002-36 cíclico. De maneira muito importante, nenhum dos peptídeos XnonG mencionados reagiu com os soros de controle.

Tabela 5: Peptídeos da família de XnonG:

15	R H G R Q Cit Cit K Y I I Y	(0107-33)
	R H G R Q Cit Cit Cit Y I I Y	(0107-34)
	I R Cit Y K Cit I T N R K F	(0107-37)
	A R F Q M Cit H Cit R L I R	(0107-35)
	Q Cit Y K W Cit K I E R K R	(0107-43)
20	K P Y T V Cit K F M R K P	(0107-31)
	K P Y T V Cit K F M R R P	(0107-32)
	R N L R L Cit R E R N H A	(0107-36)
	R R R Cit Y Cit R A V I T A	(0107-38)
	R F K S N Cit R T P N R W	(0107-42)
25	R G K S N Cit R T Y N R W	(0107-39)
	R F K S N Cit R T Y N R W	(0107-40)
	R G K S N Cit R T P N R W	(0107-41)
	R W V S Q Cit R R T P T R	(0102-71)
	M K P R Y Cit R R I V V V	(0102-73)
30	K S F V W Cit S H A R P R	(0107-44)
	Y S F V W Cit S H A R P R	(0107-45)
	R N M N R Cit W R G M Cit R	(0107-30)

	RMGRP Cit WIRFPV	(0102-72)
	assim como	
	IN Cit RAS Cit K Cit HRR	0215-46
	ICit KRLY Cit M Cit IRR	0219-44
5	K Cit Cit YNI Cit Cit FRRN	0222-56
	RLYFI Cit Cit RAQT T	0222-57
	IRQGARCit RGYPK	0223-12
	Cit ER Cit VQ Cit RRP PQ	150202RA02
	Cit HQRIT Cit VG Cit RK	150202RA03
10	RI Cit RV Cit Cit TP IPR	061102RA01
	GRNQRY Cit LYTIH	061102RA02
	RCit RQHPCit HRIKA	061102RA03
	Cit Cit R Cit VA Cit F Cit RV R	061102RA05
	RPKQHVCit HTRRP	061102RA06
15	RK Cit G Cit R Cit Cit TIRP	061102RA07
	RCit Cit RNT Cit HIK Cit R	061102RA08
	RCit Q Cit FT Cit Cit RNVV	061102RA09
	QLVYLQ Cit Cit Cit RRY	061102RA11
	QYNRFK Cit Cit Cit RPR	061102RA12
20	Cit LRHIR Cit QTR Cit Cit	061102RA14
	PR Cit Cit Cit K Cit R Cit Cit GR	061102RA15
	RCit QVRY Cit Cit L Cit R Cit	061102RA16
	GR Cit HAH Cit PRVR Cit	061102RA17
	ARHVIR Cit Cit VPR T	181102RA01
25	RCit GHMF Cit VY Cit FR	181102RA02
	GRNIRV Cit Cit AR Cit Cit	181102RA04
	QIFYL Cit Cit HRQ Cit R	221102RA01
	RQGPIA Cit LHIRR	221102RA02
	GVYLVRCit L Cit MMR	0218-36
30	NCit Cit RRV Cit M Cit RI Cit	271102RA01
	K Cit RL Cit Y Cit PVRKS	271102RA02
	GRR Cit Cit L Cit RP Cit Cit R	271102RA03

R M P H Cit H Cit S Cit R R K

271102RA04

A partir dos dados acima descritos, é possível derivar uma sequência de consenso de aminoácidos que parecem ter uma preferência por certas posições. Portanto, uma unidade peptídica XnonG preferivelmente reconhecida pelos soros de RA pode ser representada por:

-5	-4	3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R
	N	Y	V	Q		H	T	I	I	K
		F	I	Y				Y	P	P
		H	S	V					N	
		G								

As experiências mostraram que, por exemplo, o peptídeo 0107-35 na forma cíclica reage com 18% dos soros que não são reativos com o 0002-36 cíclico. Esta sensibilidade pode ser mais aumentada por outros peptídeos. Por exemplo, uns 8% mais podem ser adicionados pelo peptídeo cíclico 0107-32. Isto permite que a sensibilidade seja aumentada até 80%. Um valor similar foi verificado para o peptídeo 0107-45. No total, 17 dos 52 (32%) soros negativos para XG foram mostrados reagir com um ou mais peptídeos XnonG. Isto significa que, com as combinações de mais do que 2 peptídeos XG e XnonG, uma modalidade preferida da invenção, pode ser atingida uma sensibilidade de acima de 80%. Isto é, portanto, melhor do que o que pode ser obtido por uma combinação dos peptídeos com a fórmula IV, e aqueles conhecidos do PCT/NL97/00624.

A sensibilidade pode ser aumentada até mais por utilização de mais peptídeos ainda. Quando testando os soros de RA com um peptídeo cíclico XG (por exemplo, o 0002-63 ou o 0002-36) juntamente com um peptídeo linear ou cíclico XnonG (por exemplo, o 0107-35), uma sensibilidade de 78% foi obtida para os 318 soros de RA. A adição de um 3º, 4º e possivelmente 5º peptídeo aumentou a sensibilidade para 85% (peptídeos 0107-32, 0107-42, respectivamente, 0107-34). Um mero 48 dos 318 soros de RA não reagiu com um dos peptídeos mencionados.

Exemplo 7: Sensibilidade e especificidade de testes diagnósticos compreendendo unidades peptídicas XG e XnonG

- Usando os métodos acima descritos, sete unidades peptídicas XG foram testadas quanto à reatividade com os 318 soros mencionados na Tabela 2 a partir de pacientes sofrendo de artrite reumatóide. A especificidade foi determinada com o auxílio dos soros mencionados na Tabela 2 de pacientes de controle e doadores normais. A Tabela 6 mostra a especificidade e a sensibilidade das unidades peptídicas individuais.

Tabela 6

Unidades peptídicas XP	Sensibilidade [%]		Especificidade [%]	
	Linear	cíclico	linear	cíclico
0002-27	56	71	98	98
0002-29	57	70	98	98
0002-31	51	69	98	98
0002-32	61	71	98	98
0002-36	61	71	99	99
0002-37	60	70	98	98
0002-63	60	71	98	98
cfc1	36	56	-	-

- De acordo com os métodos descritos neste documento, cinco unidades peptídicas XnonG foram testadas quanto à reatividade com os mesmos 318 soros mencionados na tabela 2 de pacientes sofrendo de artrite reumatóide. A especificidade foi novamente determinada com o auxílio dos soros mencionados na tabela 2 de pacientes de controle e doadores normais. A Tabela 7 mostra a especificidade e a sensibilidade das unidades peptídicas individuais.

Tabela 7

Unidade peptídica	Sensibilidade [%]		Especificidade [%]	
	Linear	cíclico	linear	cíclico
0107-32	48	63	98	98
0107-35	52	61	98	99
0107-45	51	69	98	99
0113-30	49	71	99	100
0218-36	50	70	98	98

A reatividade das unidades peptídicas XnonG mencionadas na tabela 7 foi testada com 80 soros do painel de 318 soros descritos acima que não reagiram com nenhum peptídeo XG da tabela 6. As porcentagens mencionadas na tabela 8, portanto, mostram a porcentagem dos soros que de fato compreendiam anticorpos para as unidades peptídicas XnonG, porém não compreendiam nenhum anticorpo reativo para XG.

Tabela 8

Unidade peptídica	Sensibilidade [%]	
	Linear	cíclico
0107-32	15	18
0107-35	17	18
0107-45	16	18
0113-30	18	19
0218-36	17	17

Os resultados acima mencionados mostram que pode ser esperada uma sensibilidade aumentada se cada uma das unidades peptídicas XG da Tabela 6 for combinada com cada uma das unidades peptídicas da Tabela 7. Todas as combinações de unidades peptídicas dadas abaixo foram testadas com uma porção representativa do painel acima mencionado de 318 soros de pacientes sofrendo de artrite reumatóide. Esta experiência de fato mostra que foi obtido um ganho médio na sensibilidade de 6%, levando a sensibilidade total de um teste de combinação para 75 a 78%.

As combinações testadas de unidades peptídicas relacionaram-

se à: unidade peptídica 0002-27 com 0107-32; 0002-27 com 0107-35; 0002-27 com 0107-45; 0002-27 com 0113-30; 0002-27 com 0218-36; 0002-29 com 0107-32; 0002-29 com 0107-35; 0002-29 com 0107-45; 0002-29 com 0113-30; 0002-29 com 0218-36; 0002-31 com 0107-32; 0002-31 com 0107-35; 0002-31 com 0107-45; 0002-31 com 0113-30; 0002-31 com 0218-36; 0002-32 com 0107-32; 0002-32 com 0107-35; 0002-32 com 0107-45; 0002-32 com 0113-30; 0002-32 com 0218-36; 0002-36 com 0107-32; 0002-36 com 0107-35; 0002-36 com 0107-45; 0002-36 com 0113-30; 0002-36 com 0218-36; 0002-37 com 0107-32; 0002-37 com 0107-35; 0002-37 com 0107-45; 0002-37 com 0113-30; 0002-37 com 0218-36; 0002-63 com 0107-32; 0002-63 com 0107-35; 0002-63 com 0107-45; 0002-63 com 0113-30 e finalmente 0002-63 com 0218-36.

Com relação aos resultados da Tabela 6 e da Tabela 8, deve-se também ser observado que as diversas unidades peptídicas também detectaram diferentes coortes de soros. A partir disto pode ser deduzido que as combinações acima mencionadas de unidades peptídicas XG e XnonG também são capazes de produzir um ganho adicional na sensibilidade se uma terceira unidade peptídica ou até uma quarta ou mais unidades peptídicas forem adicionadas. Dependendo da combinação selecionada de unidades peptídicas, o teste diagnóstico de acordo com a invenção de fato torna possível atingir uma sensibilidade de 88-92%.

REIVINDICAÇÕES

1. Unidade peptídica, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste de peptídeo 0002-27 HQKRGCitGWSRAA, peptídeo 0002-29 HQRRCitGWSRAA, peptídeo 0002-31 HQRRTCitGGSRAA, peptídeo 0002-32 HQRKWCitGASRAA, peptídeo 0002-36 HQFRFCitGCitSRAA, peptídeo 0002-37 HQKWRCitGRS-CitAA e peptídeo 0002-63 HQFRFCitGWSRAA.

2. Unidade peptídica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende uma unidade peptídica que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste de peptídeo 0107-32 KPYTVCitKFMRRP, peptídeo 0107-35 ARFQMCitHCitRLIR, peptídeo 0107-45 YSFVWCitSHARPR, peptídeo 0113-30 ARFQMRHCitRLIR e peptídeo 0218-36 RNLRLCitRERNHA.

3. Unidade peptídica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que é cíclica.

4. Unidade peptídica, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que forma uma estrutura de anel cujo anel compreende pelo menos 8 aminoácidos.

5. Unidade multi-peptídica, caracterizada pelo fato de que compreende uma unidade peptídica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Método *ex vivo* para detectar auto-anticorpos de pacientes sofrendo de artrite reumatóide, caracterizado pelo fato de que pelo menos um peptídeo reativo compreendendo um resíduo de citrulina é contatado com os auto-anticorpos por um tempo suficientemente longo para permitir que um complexo seja formado entre o dito peptídeo reativo e os ditos auto-anticorpos, após o que o complexo é detectado, em que o dito peptídeo reativo compreende uma unidade peptídica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

7. Método para a seleção de um peptídeo adequado para a diagnose *ex vivo* de artrite reumatóide, caracterizado pelo fato de que uma biblioteca de peptídeos é examinada com os anticorpos obtidos de pacientes

com artrite reumatóide e em que a biblioteca de peptídeos é selecionada a partir de um grupo compreendido de:

Bib (1): H Q E X X Cit X X S R A A

Em que X = qualquer aminoácido exceto cisteína e triptofano

5 Bib (2): H Q X X X Cit G X S R/Cit A A

Em que X = qualquer aminoácido exceto cisteína porém incluindo Citrulina

Bib (3): H Q E X X Cit X X S R/Cit A A

Em que X = qualquer aminoácido exceto cisteína porém incluindo Citrulina

8. Kit de teste diagnóstico *ex vivo* para determinar a presença de
- 10 auto-anticorpos de pacientes sofrendo de artrite reumatoide, caracterizado pelo fato de que, compreende um peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, juntamente com pelo menos um reagente adicional.

Fig. 1a

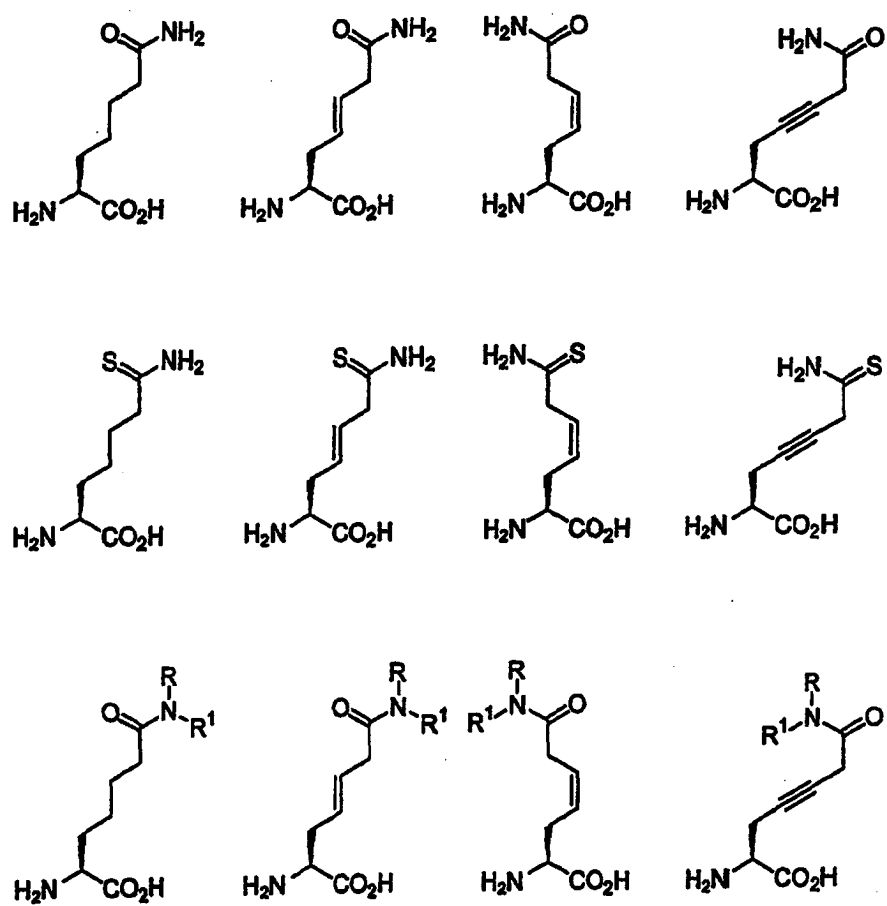
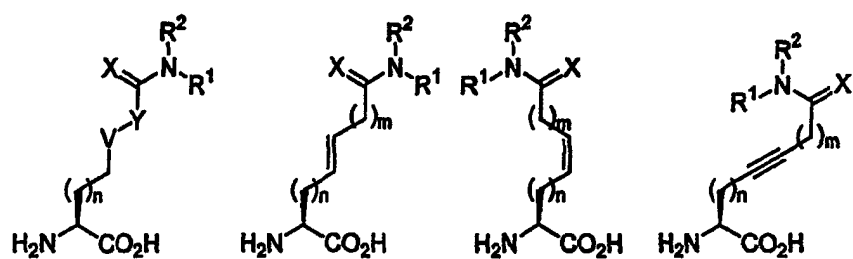
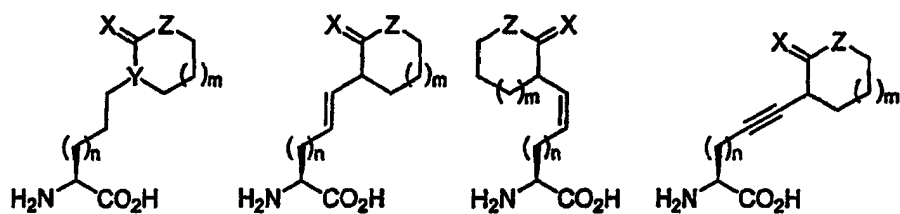


Fig. 1b



$m = 0, 1, 2$; $n = 0, 1, 2$; $\text{V} = \text{CH}_2, \text{S}$; $\text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{NR}$; $\text{Y} = \text{CH}_2, \text{NH}$; $\text{R}, \text{R}^1, \text{R}^2 = \text{H}, \text{arila}, (\text{ciclo}) \text{alquila}$



$m = 0, 1, 2$; $n = 0, 1, 2$; $\text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{NR}$; $\text{Y} = \text{CH}, \text{N}$; $\text{Z} = \text{NR}^1, \text{O}, \text{CH}_2$; $\text{R}, \text{R}^1 = \text{H}, (\text{ciclo}) \text{alquila}, \text{arila}$
 aryl
 arila