

(11) Número de Publicação: **PT 1613645 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 7/08 (2007.10) **G01N 33/564** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.04.02	(73) Titular(es): PHADIA AB	
(30) Prioridade(s): 2003.04.02 SE 0300958	BOX 6460 751 37 UPPSALA	SE
(43) Data de publicação do pedido: 2006.01.11	(72) Inventor(es): MICHAEL MAHLER	DE
(45) Data e BPI da concessão: 2007.11.07 033/2008	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO ANALÍTICO E KIT PARA O MESMO**

(57) Resumo:

RESUMO

"Método analítico e *kit* para o mesmo"

A presente invenção refere-se a um péptido que compreende uma arginina simetricamente dimetilada e constitui um determinante imunológico de anticorpos presentes no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistémico (SLE) e em que a metilação é um requisito prévio para reagir com estes anticorpos. A invenção também se refere à utilização do referido péptido para o diagnóstico de SLE e diferenciação entre SLE e MCTD.

DESCRIÇÃO

"Método analítico e kit para o mesmo"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a um péptido que compreende uma arginina simetricamente dimetilada e constitui um determinante imunológico de anticorpos presentes no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistémico (SLE) e em que a metilação é um requisito prévio para reagir com os referidos anticorpos. A invenção também se refere à utilização do referido péptido para o diagnóstico de SLE e diferenciação entre SLE e doença mista do tecido conjuntivo (MCTD).

Antecedentes da invenção

As doenças reumáticas sistémicas caracterizam-se pela ocorrência de auto-anticorpos circulantes contra alvos intracelulares definidos (revisto em von Mühlen e Tan, 1995). Entre os primeiros auto-anticorpos a ser identificados estão os anti-Sm, que têm uma associação estreita com o lúpus eritematoso sistémico (SLE) (Tan e Kunkel 1966). Deste modo, os anticorpos anti-Sm foram incluídos como um dos critérios de classificação para esta doença pela American College of Rheumatology (Tan et al., 1982). Além dos auto-anticorpos direccionados para o complexo Sm, muito frequentemente encontram-se anticorpos anti-ADN, anti-PCNA, anti-U1-RNP, anti-nucleossoma, anti-histona, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anti-RNP ribossómico e antifosfolípido em pacientes que sofrem de SLE (von Mühlen e Tan 1995).

Em média, é encontrada reactividade anti-Sm em 5-30% dos pacientes com SLE, embora a frequência específica varie com base no sistema de detecção e etnicidade da população com SLE (Abuaf et al., 1990; Jaekel et al., 2001). O antigénio de Sm faz parte do complexo de corte e rearranjo (*spliceossoma*) que catalisa o corte e rearranjo ("*splicing*") do pré-ARNm nuclear (Seraphin, 1995; Lerner et al., 1980). O próprio complexo compreende pelo menos nove polipéptidos diferentes com pesos moleculares na gama de 9-29,5 kDa [B (B1, 28 kDa), B' (B2, 29 kDa), N (B3, 29,5 kDa), D1 (16 kDa), D2 (16,5 kDa), D3

(18 kDa), E (12 kDa), F (11 kDa) e G (9 kDa)] (Hoch, 1994). Todas essas proteínas nucleares podem servir como alvos da resposta imunitária anti-Sm, muito frequentemente os polipéptidos B e D, que são assim considerados os antígenos principais (Hoch, 1994; Brahms *et al.*, 1997; Ou *et al.*, 1997). No entanto, os RNP específicos de SmBB' e U1 que são muito frequentemente o alvo dos auto-anticorpos em pacientes com MCTD partilham epítomos de reactividade cruzada pelo que o SmD é considerado o antígeno de Sm mais específico (van Venrooij *et al.*, 1991; Hoch *et al.*, 1999). De entre a família de SmD, o padrão de SmD1/D3 é pelo menos quatro vezes mais comum do que o reconhecimento de SmD1/D2/D3 com uma imunorreactividade para SmD1 pronunciada (Hoch *et al.*, 1999). Em estudos de mapeamento de epítomos, vários epítomos lineares e conformacionais foram mapeados nas proteínas SmB e D (Rokeach *et al.*, 1992; Hirakata *et al.*, 1993). Em SmD1 e BB' a reactividade principal foi encontrada predominantemente nas extensões C-terminais (Rokeach *et al.*, 1992; Hirakata *et al.*, 1993; Rokeach e Hoch, 1992). Verificou-se que o epítopo PPPGMRPP (SEQ ID NO:2) que ocorre três vezes nas extensões C-terminais de SmBB' tem reactividade cruzada com outras estruturas ricas em prolina de auto-antígenos do *spliceossoma*, tais como antígenos específicos de U1 e de proteínas retrovirais, tais como p24 gag de HIV-1 (De Keyser *et al.*, 1992). Estudos de monitorização e experiências de imunização revelaram que este motivo é consistentemente o epítopo de SmBB' detectado mais precocemente que actua como ponto de partida de fenómenos de disseminação de epítomos na molécula BB' e para os polipéptidos SmD (Arbuckle, 1999; Greidinger e Hoffman, 2001). Um estudo recente identificou cinco epítomos lineares em SmD2 e quatro em SmD3 distribuídos nas moléculas inteiras (McClain *et al.*, 2002). Todos estes epítomos partilham propriedades básicas e estão expostos na superfície da proteína, o que os torna antígenicos (McClain *et al.*, 2002). Um dos epítomos de células B em SmD3 descritos (epítopo 4; aa 104-126) apresentava uma homologia estreita com uma região antigénica da proteína SmD1, conduzindo por fim a uma reactividade cruzada (McClain *et al.*, 2002). Para fins de diagnóstico, utilizou-se um péptido sintético que corresponde à extensão C-terminal de SmD1 para desenvolver um sistema ELISA com sensibilidades e especificidades de diagnóstico na gama de 36-70% e de 91,7% e 97,2%, respectivamente (Riemekasten *et al.*,

1998; Jaekel *et al.*, 2001). Recentemente, verificou-se que os polipéptidos D1, D3 e BB' contêm dimetilarginina simétrica (sdR) que constitui um auto-epítopo principal no terminal C de SmD1 (Brahms *et al.*, 2000; Brahms *et al.*, 2001). Num destes estudos, um péptido sintético de SmD1 (aa 95-119) que continha sdR demonstrou uma imunorreactividade significativamente aumentada em comparação com o péptido não modificado, o que reflecte uma contradição com dados anteriores (Riemekasten *et al.*, 1998; Brahms *et al.*, 2000).

Em W099/11667 descreve-se um método para produzir péptidos que contêm argininas metiladas e que constituem determinantes imunogénicos de anticorpos presentes em soros de pacientes com SLE ou vírus de Epstein-Barr (EBV) e em que a metilação é um requisito prévio para reagir com estes anticorpos. No entanto, estes péptidos estão descritos em geral e não foi referida nenhuma relação entre a sequência de péptido e a capacidade para diagnosticar a doença auto-imune.

Sumário da invenção

Verificámos agora que o péptido que reivindicamos compreendendo uma arginina simetricamente dimetilada numa posição definida é essencial para o diagnóstico de SLE e verificou-se, surpreendentemente, que este péptido pode ser utilizado num imunoensaio de diagnóstico, altamente específico e fiável para a selecção de pacientes com SLE e para a diferenciação entre SLE e MCTD. Também se podem utilizar múltiplos do péptido para os mesmos fins. Pode-se utilizar um *kit* que compreende o péptido reivindicado para o diagnóstico de SLE, bem como para a diferenciação entre SLE e MCTD. A vantagem da invenção reivindicada é que não detecta amostras falso positivas do grupo de amostras de MCTD.

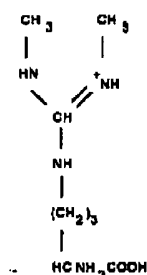
Constitui um objecto da presente invenção proporcionar um método analítico para a detecção de anticorpos anti-Sm.

O presente inventor verificou, surpreendentemente, que a dimetilação simétrica de um determinado resíduo de arginina na sequência de SmD3 é crucial para a sua antigenicidade. Deste modo, num aspecto, a presente invenção proporciona um péptido (S33) que contém 15-16 aminoácidos compreendendo arginina

simetricamente dimetilada (sdR) que é capaz de reagir com anticorpos e em que a referida dimetilação é crucial para a reacção entre o referido péptido e os referidos anticorpos e em que os referidos anticorpos estão presentes no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistémico (SLE), em que o péptido S33 compreende a sequência de aminoácidos AARGsdRGRGMGRGNIF (SEQ ID NO:1).

Noutro aspecto, a arginina dimetilada simétrica tem a posição 112 na sequência polipeptídica de SmD3.

Noutro aspecto, o péptido S33 compreende uma arginina dimetilada simétrica com a estrutura



Noutro aspecto, a invenção é um método para utilização do péptido S33 para o diagnóstico *in vitro* de SLE.

Noutro aspecto, a invenção é um método para utilização do péptido S33 para a diferenciação entre SLE e doença mista do tecido conjuntivo (MCTD).

Noutro aspecto, a invenção é um kit para utilização do péptido S33 para monitorização *in vitro* da actividade de doença em pacientes com SLE com ADNcd negativo, em que a actividade da doença é definida como uma correlação entre o título de anticorpo e o novo péptido mimotopo e a actividade da doença.

Noutro aspecto, a invenção é um método para monitorizar o título de anticorpo por teste repetido de modo a monitorizar o efeito do tratamento, ou a actividade da doença.

Noutro aspecto, a invenção é um péptido multimérico que compreende múltiplos do péptido S33.

Breve descrição das Figuras

Figura 1. Análise de epítomos de SmD1 e SmD3. Sintetizaram-se extensões C-terminais de SmD1 (a) e SmD3 (b) como séries de péptidos (15-mero; desfasamento de aa) e analisaram-se com soros de pacientes. O péptido imunorreactivo n.º 77 foi também testado como variantes de mimotopos (c).

Figura 2. Características de desempenho do ensaio, do novo ensaio anti-S33. Variabilidade intra-ensaio e inter-ensaios a), linearidade b) e análise da característica operacional do receptor, ROC, incluindo valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV) e eficiência a diferentes limites de exclusão (c).

Figura 3. Um paciente masculino com SLE foi clínica e serologicamente observado durante um período de tempo de 18 meses.

Descrição detalhada da invenção

Exemplo 1

Amostras de soro

Recolheram-se soros (n=628) de pacientes que sofrem de lúpus eritematoso sistémico (SLE; n=176), artrite reumatóide (RA, n=86), síndrome de Sjögren (SS, n=24); doença mista do tecido conjuntivo (MCTD, n=26), esclerodermia (SSc, n=26) e polimiosite/dermatomiosite (PM/DM, n=13). Todos os pacientes foram classificados de acordo com os critérios da ACR para cada doença (Tan *et al.*, 1982; Arnett *et al.*, 1988). Para determinar melhor a especificidade do ensaio, analisámos um grupo de soros de pacientes com doenças infecciosas (n=77), incluindo hepatite C (HCV; n=30), citomegalovírus (CMV; n=22) e vírus Epstein-Barr (EBV; n=25), bem como de 192 dadores de sangue saudáveis. Todos os soros foram armazenados a -80°C até utilização. Para mapeamento de epítomos utilizou-se um painel de cinco soros contendo anticorpos anti-Sm. Como controlos negativos, seleccionaram-se soros auto-imunes com outras especificidades de anticorpos diferentes de anti-Sm.

Caracterização serológica de soros de pacientes com SLE seleccionados ao acaso. Todos os soros de pacientes auto-imunes foram testados quanto a auto-anticorpos contra histonas, ADNcd e complexo Sm utilizando Vareliisa® quantitativo (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Alemanha). Os soros e amostra de SLE que demonstraram resultados inesperados também foram medidos no kit de pesquisa ANA-Split ELISA semi-quantitativo (Pharmacia, Freiburg, Alemanha). O último ensaio contém os auto-antígenos U1-68kDa, U1-A, U1-C, SmBB', SmD, Ro-52, Ro-60 e La. Todos os ELISA foram realizados de acordo com as instruções de utilização.

Exemplo 2

Mapeamento de epítomos com oligopéptidos imobilizados

As sequências publicadas de SmD1, P13641 (Rokeach *et al.*, 1988) e SmD3, P43331, (Lehmeier *et al.*, 1994) foram utilizadas para sintetizar péptidos 15-mero com sobreposição, com um robot de pipetagem de acordo com o protocolo descrito por Gausepohl e Behn (2002). As extensões C-terminais de ambos os polipéptidos foram sintetizadas com um desfasamento de 2 aminoácidos (sobreposição de 13 aminoácidos). Cada péptido que contém arginina foi sintetizado como três variantes, com arginina natural, com sdR ou com dimetilarginina assimétrica (asDMA) nas posições respectivas. Mais tarde, sintetizou-se um péptido de SmD3 altamente reactivo com algumas combinações de arginina natural e sdR. No final da síntese de péptidos os sítios de ligação não específicos foram bloqueados por incubação das membranas durante a noite em tampão bloqueador (BB), à temperatura ambiente (RT). Após um passo de lavagem, as membranas foram incubadas com amostras de soro a uma diluição de 1:100 em BB, durante 2h à RT. Os anticorpos não ligados foram removidos por três passos de lavagem. Para detecção diluiu-se anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase a 1:5000 em BB e incubou-se durante 75 min (RT). Os anticorpos secundários supérfluos foram removidos por três passos de lavagem. Por fim, os anticorpos ligados foram visualizados utilizando o sistema de detecção por quimioluminescência aumentada (ECL). Utilizaram-se condições de ensaio nas quais os soros negativos não apresentavam reactividade.

Exemplo 3**ELISA de péptido SS3**

Preparação de placas ELISA. O péptido S33 liofilizado foi utilizado para preparar uma solução mãe de 10 µg/ml que foi armazenada em alíquotas a -20°C, até utilização. A ligação do péptido a placas ELISA foi realizada utilizando 2,5 µg/ml do péptido em tampão de revestimento num volume final de 120 µl por poço. O procedimento de revestimento foi realizado a 15°C durante 20 h. Os sítios de ligação não específica foram bloqueados com solução bloqueadora. Depois de desprezar a solução de bloqueio, as fases sólidas foram secas a 37°C durante 2h e seladas. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo geral do sistema Varelista® (Pharmacia Diagnostics, Freiburg). Os doadores de sangue demonstraram uma gama de reactividade de 0,4-11,5 U/ml o que resulta num valor médio de 2,2 U/ml e um DP de 1,2 U/ml. O limite de exclusão foi tecnicamente ajustado para 13 U/ml após análise ROC. Os PPV e NPV foram calculados a diferentes valores de limite de exclusão.

Precisão e reprodutibilidade. Fizeram-se medições da imprecisão (variabilidade inter-ensaios e intra-ensaio) com 4 e 6 réplicas, respectivamente. Para determinar a precisão do ELISA de anti-péptido S33 testaram-se soros anti-Sm adequados, uma amostra de valor baixo (L); uma amostra de valor médio (M) e uma amostra de valor elevado (H) em cinco corridas independentes, num dia (inter-ensaios), ou numa única corrida (intra-ensaio). Para a precisão na mesma corrida, mediu-se L, M e H em seis réplicas numa fase sólida. Os dados de precisão foram calculados utilizando análise ANOVA.

Linearidade. A linearidade foi analisada testando diluições (1:1; 2:3; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32) do ponto padrão mais elevado (S6) e da amostra de valor elevado da análise de precisão (H). Para cada ponto de diluição, calculou-se uma razão entre a reactividade medida e o valor esperado e subtraiu-se 1 deste quociente.

Exemplo 4**Estudo de correlação**

Testaram-se soros de SLE seleccionados ao acaso (n=50) e vários controlos (n=100) utilizando os testes de anticorpo anti-Sm disponíveis comercialmente, de diferentes fornecedores (Sm teste A - Sm teste D) e os resultados foram comparados com o observado no teste ELISA de anti-S33.

Exemplo 5**Estudo de monitorização de um paciente com SLE**

Um paciente masculino com SLE foi clínica e serologicamente observado ao longo de um período de tempo de 18 meses (6 amostras de soro; veja-se a Figura 3). O paciente foi testado quanto a anticorpos contra o complexo RNP/Sm, o antígeno Sm, o complexo U1-RNP isolado, histonas, ADNcd e péptido S33, utilizando os respectivos kits de teste da Pharmacia Diagnostics.

Resultados

Mapeamento fino de epítomos de extensões C-terminais de SmD1 e D3. Para avaliar o efeito da dimetilação de arginina na antigenicidade de SmD1 e SmD3 e para mapear epítomos relevantes em ambos os polipéptidos, testou-se um painel de soros anti-Sm com séries de péptidos (15 meros, desfasamento de 2) que abrangem a região C-terminal de SmD1 (P13641) e SmD3 (P43331).

Os resultados mostram que a dimetilação de resíduos de arginina afecta de forma significativa a ligação de anticorpos anti-Sm ao terminal C de polipéptidos SmD1 e D3 (veja-se a Figura 1). Todos os soros anti-SmD (#36, #37, #31, #84, #Sm) demonstraram uma ligação aumentada a péptidos SmD1 que contêm a forma simétrica de dimetilarginina (sdR). Em especial, os péptidos que consistem de glicina e repetições de DMA apresentavam exclusivamente uma reactividade forte com os anticorpos (péptido no. 9, 10). Apesar de tudo, os polipéptidos SmD1 que contêm DMA representam um substrato bastante inespecífico para anticorpos anti-Sm, uma vez que eles também foram alvo de anticorpos anti-centrómero (ACA;

#soro CEN (centrómero)). De notar que esses ACA também se ligaram a péptidos que contêm a forma assimétrica de DMA.

As experiências de ligação com péptidos derivados de SmD3 apresentaram resultados semelhantes. Apenas os péptidos SmD3 que contêm sdR reagiram com anticorpos anti-Sm confirmando a importância da metilação simétrica de resíduos de arginina (veja-se Figura 1b). Ao contrário do smD1, nenhum soro controlo (e.g. CEN) demonstrou ligação do anticorpo a péptidos derivados de SmD3, o que reflecte uma especificidade elevada. Um péptido particular (N.º 77, ¹⁰⁸AAsdRGsdRGsdRGMGsdRGNIF¹²²) SEQ ID NO:3 foi fortemente reconhecido por três de entre cinco soros anti-Sm. Utilizando uma análise mutacional em que os resíduos de arginina de ¹⁰⁸AARGRGRGMGRGNIF¹²² (SEQ ID NO:4) foram sucessivamente substituídos com sdR fomos capazes de mostrar que um péptido mimotopo com um único resíduo de arginina na posição 112 apresentava imunorreactividade com todos os cinco soros anti-Sm (#36, #37, #31, #84, #Sm), mas não com os controlos (e.g. CEN; veja-se Figura 1c). Deste modo, introduzindo apenas um sdR e numa posição definida (aminoácido 112) de SmD3, foi possível aumentar a sensibilidade deste péptido (¹⁰⁸AARGsdRGRGMGRGNIF¹²²; S33), SEQ ID NO: 1 sem perda de especificidade. Este péptido candidato foi subsequentemente sintetizado como antigénio solúvel e utilizado como substrato em ELISA.

Caracterização imunossérológica do grupo de pacientes com SLE. Para avaliar se a nossa coorte de pacientes com SLE representa um painel de soros de SLE representativo, seleccionaram-se aleatoriamente, aproximadamente 100 amostras de SLE e testaram-se quanto a reactividade para U1-68kD, U1-A, U1-C, SmBB', SmD, Ro-52/SS-A, Ro-60/SS-A, La/SS-B, histona ADNcd e β 2-glicoproteína (Split ANA-Profil research assay, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Alemanha). A prevalência encontrada para os diferentes auto-anticorpos tinha uma boa concordância com estudos anteriores (Jaekel et al., 2001). Deste modo, em relação aos seus perfis de auto-anticorpos, a coorte de SLE parece ser uma população de SLE representativa. Os resultados das medições do painel de SLE estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Prevalência (%) de especificidades de auto-anticorpos clinicamente relevantes em pacientes que sofrem de SLE (n=101)

Auto-anticorpos para											
U1-68	U1-A	U1-C	SmBB'	SmD	Ro-52	Ro-60	La	Histona	ADNcd	Glicoproteína	β2
15,8	24,8	25,7	21,8	15,8	21,8	47,5	21,8	37,6	51		17

ELISA de anti-péptido S33

Por motivos técnicos, sintetizou-se um péptido solúvel de 15 aminoácidos que apresenta a sensibilidade e especificidade mais elevada no teste SPOT (¹⁰⁸AARGsdRGRGMGRGNIF¹²²) SEQ ID NO:1 com uma Cys adicional no terminal C. Este péptido foi subsequentemente utilizado para desenvolver um sistema ELISA baseado no protocolo geral dos testes Varelisa® (Pharmacia, Freiburg, Alemanha)

Características de desempenho do ensaio. Para avaliar as características de desempenho do ensaio analisou-se a precisão, reprodutibilidade e linearidade. Encontrou-se uma variabilidade intra-ensaio e inter-ensaios (CV%) de três amostras na gama de 1,82 a 6,25% e de 2,27 a 7,42%, respectivamente. As séries de diluições de duas amostras demonstraram uma gama linear em cinco diluições subsequentes (desvio >20%). Para a definição de limite de exclusão, fez-se uma análise das características de operação do receptor (ROC) com soros de SLE e controlo. As características de desempenho do ensaio do novo teste anti-S33, incluindo variabilidade intra-ensaio e inter-ensaios (a), linearidade (b), análise ROC, PPV, NPV e eficiência (c) estão resumidas na Figura 2 (a-c).

Para avaliação da relevância de diagnóstico do novo teste, utilizou-se um limite de exclusão técnico de 13U/ml para combinar especificidade elevada com sensibilidade moderada. Os soros de 176 pacientes com SLE de 181 pacientes auto-imunes diagnosticados sem ser com SLE, de 77 pacientes com doenças infecciosas e de 192 dadores normais humanos foram analisados no novo sistema ELISA. 28 pacientes com SLE (15,9%) testaram positivo para anticorpos anti-S33, apresentando uma reactividade significativamente aumentada de até 952 U/ml com um valor médio de 43 U/ml (DP = 160,2 U/ml). Os pacientes com

distúrbios relacionados demonstraram uma reactividade reduzida significativa no novo sistema ELISA (média 3,36 U/ml). Apenas um paciente do grupo de RA testou positivo (24,6 U/ml). Nenhum dos controlos restantes, incluindo pacientes que sofrem de SSc (n=26), PM/DM (n=13), MCTD (n=126) ou doenças infecciosas (n=77) apresentou reactividade contra o péptido S33. As amostras de soro de pacientes com doenças infecciosas demonstraram uma reactividade reduzida (média 0,67 U/ml; valor máximo 3,3 U/ml), mesmo quando comparadas com dadores saudáveis (média 2,21 U/ml; valor máximo 11,5 U/ml). O valor máximo destes soros de doenças infecciosas foi encontrado no grupo EBV. Os resultados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados de ELISA utilizando S33 com soros de SLE e vários soros controlo

	N.º (%) de soros anti-S33 positivos	Valor Médio (U/ml)	Valor Máximo (U/ml)
<i>SLE (n=176)</i>	28 (15,9)	43,0	1190,0
<i>Doenças reumáticas (181)</i>	1 (0,6)	2,2	24,6
<i>RA (86)</i>	1 (1,2)	1,6	24,6
<i>pSS (24)</i>	0	1,9	3,9
<i>MCTD (26)</i>	0	3,1	12,8
<i>SSc (26)</i>	0	2,4	4,3
<i>PM/DM (13)</i>	0	2,8	9,6
<i>Doenças infecciosas (77)</i>	0	0,67	3,3
<i>HCV (30)</i>	0	0,42	1,1
<i>CMV (22)</i>	0	0,8	3,2
<i>EBV (25)</i>	0	0,78	3,3
<i>Indivíduos saudáveis (192)</i>	0	2,21	11,5

Em resumo, 15 amostras do grupo de SLE (n=176) e apenas um soro dos controlos (n=449, 0,2%) tiveram resultados positivos, resultando numa especificidade de diagnóstico de 99,8% e uma sensibilidade de 15,9%. PPV e NPV, bem como a eficiência de diagnóstico foram calculados a 96,6%, 75,3% e 76,3%, respectivamente (veja-se Figura 2c). Estes dados indicam que os anticorpos anti-S33 parecem estar exclusivamente presentes em soros de pacientes com SLE.

Além da reactividade anti-péptido S33, as amostras de ra falso positivas contêm títulos elevados de anticorpos contra ul-mps- 68kda (razão 4,5), ul-c (razão 9,4) e histonas (133,8 u/ml) (veja-se tabela 3). Os títulos de anti-smbb' e

anti-smd, tal como determinados por ELISA estavam elevados quando comparados com os controlos, mas eram ainda inferiores aos valores de limite de exclusão (veja-se a tabela 3).

Tabela 3. Perfil de auto-anticorpos do paciente de RA falso positivo no novo ensaio de péptido S33

N.º ID do Soro	Grupo de controlo	U1-68kD*	U1-A*	U1-C*	SmBB'*	SmD*	Ro-52*	Ro-60*	La*	histona ¹ [U/ml]	ADNcd ² [U/ml]
R15	Ra	4,5	0,6	9,2	0,8	0,8	0,2	0,7	0,5	133,8	15,6

* Ensaio semiquantitativo (ANA-Split); limite de exclusão >1,4

¹ limite de exclusão (30U/ml)

² limite de exclusão (55U/ml)

Correlação com outros auto-anticorpos. Em relação a possíveis correlações existentes entre anticorpos anti-S33 e outras espécies de auto-anticorpos, foi realizada uma avaliação estatística utilizando o painel de SLE de aproximadamente 100 soros seleccionados aleatoriamente. As correlações significativas eram com U1-68kDa ($p=0,0335$), U1-A ($p < 0,0001$), U1-C ($p < 0,0001$), SmBB' ($p < 0,0001$), SmD ($p < 0,0001$), ADNcd ($p < 0,0001$) e histona ($p < 0,0001$), mas não com Ro-52 ($p=0,2192$), Ro-60 ($p=0,2212$) e La ($p=0,8785$) (veja-se tabela 4).

Tabela 4. Associação entre positividade anti-S33 e outras espécies Aab em SLE

Aab para	U1-68kD	U1-A	U1-C	SmB B'	Sm D	Ro-52	Ro-60	La	Histo-na	dsD NA	Glicoproteína $\beta 2$
S33 +	8/16	12/25	11/26	11/22	11/16	5/22	12/48	4/22	10/38	13/51	4/16
	50%	48%	42,3%	50%	68,8%	22,7%	25%	18,2%	26,3%	25,5%	25%
2-taile dp	0,033	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	0,21	0,22	0,87	<0,0	<0,0	0,3792
	5*	001*	001*	001*	001*	92	12	85	001*	001*	

Correlação de Pearson; * Estatisticamente significativo

Analisando a reactividade para o complexo-Sm, cinco amostras dos pacientes com SLE seleccionados aleatoriamente (n=101) reagiram com o antigénio de SmD purificado, mas não com o péptido S33. Os restantes 11 soros positivos para SmD (68,8%) também deram resultados positivos no novo ELISA de anti-péptido S33. De notar que de entre as amostras positivas para anti-S33, se encontraram 4 pacientes (#89, #92, #20627, #9811) todos negativos para anti-SmD e apresentando

reactividade anti-péptido S33 de 15,4, 21,3, 41,3 e 13,9 unidades, respectivamente.

Para avaliar as correlações com testes de anticorpos anti-Sm disponíveis comercialmente de diferentes fornecedores, testaram-se 50 soros de SLE seleccionados ao acaso do grupo de pacientes com SLE e 100 controlos, utilizando os testes de anticorpo anti-Sm de diferentes fornecedores. 6 de entre 50 soros SLE (12%) e nenhum dos controlos (0%) era positivo no teste de anticorpo anti-S33, resultando numa sensibilidade de 12% e uma especificidade de 100%. Pelo contrário, o ensaio anti-Sm de diferentes fornecedores, o teste de Sm A, B e C determinaram apenas 5 amostras de SLE (10%) e entre 6 (teste Sm A, C) e 12 (teste Sm D) pacientes do grupo de controlo. A maioria dos resultados falso positivo foi encontrada no grupo de pacientes com MCTD (veja-se Tabela 5).

Tabela 5. Reactividade de soros controlo, essencialmente MCTD nos testes de diferentes fornecedores

Soro				Imunoensaaios			
N.º	ID	Diagnóstico	Vareliisa (R) ®S33 U/ml 13 [#]	Teste A de Sm RE 20 [#]	Teste B de Sm Unidades 40 [#]	Teste C de Sm Razão 1 [#]	Teste D de Sm Razão 1 [#]
105	25516	MCTD	3,0	87,9	118,8	1,1	4,8
107	25518	MCTD	1,0	14,4	37,5	0,3	1,4
108	25519	MCTD	0,0	6,7	52,0	0,9	2,7
110	25521	MCTD	0,5	87,4	111,7	1,5	4,2
112	25523	MCTD	0,0	21,6	34,1	0,6	0,3
121	25532	MCTD	2,6	7,4	26,9	0,3	3,5
123	25534	MCTD	1,1	10,5	41,7	0,6	2,3
126	25537	MCTD	3,2	7,2	41,4	0,3	0,3
128	25539	MCTD	0,7	4,2	67,1	0,5	3,7
129	25540	MCTD	4,1	118,5	132,4	2,4	3,1
132	25543	MCTD	2,4	12,8	42,7	0,3	2,3
133	25544	MCTD; SLE	9,9	136,0	153,7	7,9	5,4
137	25448	SSc	2,2	72,2	105,3	1,2	2,8
145	25456	MCTD	1,1	8,4	30,9	0,3	1,5

valores de limite de exclusão sugeridos

Estudo de monitorização de um paciente com SLE. Um paciente masculino com SLE foi clínica e serologicamente observado durante um período de tempo de 18 meses (6 amostras

de soro; veja-se Figura 3). No início do estudo de monitorização, o paciente apresentava uma resposta imunitária forte contra o complexo RNP/Sm (razão de 18), o antigénio Sm (razão de 16), o novo antigénio Sm (337,5 U/ml) e uma resposta moderada ao complexo U1-RNP isolado (razão de 2), bem como a histonas (59,5 U/ml). Não foi encontrada nenhuma reactividade para ADNcd (19,1 U/ml; limite de exclusão 55 U/ml). Nesse ponto de tempo, o registo médico registou uma fase inactiva da doença. Mais tarde, o título de anticorpo contra o novo antigénio Sm aumentou significativamente, atingindo o seu pico na terceira amostra de soro recolhida em Agosto de 1999. Pelo contrário, observou-se um menor título anti-RNP/Sm entre a segunda e a quarta amostragem de sangue, seguido de outro forte aumento na quinta amostra. Nesse ponto de tempo, o título contra o novo antigénio Sm (S33) era menor do que antes e o estado da doença foi descrito como inactivo, de acordo com o registo médico. Não se observaram nenhuma alteração significativa nos títulos anti-ADNcd e anti-histona durante o tempo de observação do paciente.

Nos exemplos apresentados a resposta imunitária anti-Sm foi analisada contra os antigénios de Sm D1 e D3 que são considerados os polipéptidos específicos de SLE (van Venrooji *et al.*, 1991; Hoch *et al.*, 1999). Utilizando péptidos imobilizados, verificou-se que a dimetilação simétrica dos resíduos de arginina desempenha um papel importante na formação dos epítomos de células B principais em ambos os auto-antigénios. Verificou-se que esta observação tinha uma boa concordância com o resultado de Brahms *et al.* (2000) e portanto contraditória com as observações de Riemekasten e colaboradores (1998). De notar que além das investigações anteriores, se verificou que com péptidos como os anteriormente descritos, a especificidade dos péptidos SmD3 era mais elevada do que com os derivados de SmD1.

McClain e colaboradores (2002) descreveram quatro regiões antigénicas de SmD3, das quais a região antigénica 4 cobre a área de 104-126. Na presente invenção, os péptidos sintetizados em pinos foram submetidos a análise, mas sem utilização da forma modificada de arginina. Na presente invenção, a reactividade dentro desta região foi apenas encontrada no caso da arginina natural ser substituída por

sdR. Estes resultados contraditórios poderão ser explicados por utilização de diferentes soros, metodologia e/ou pelos vários comprimentos do péptido. Três de entre cinco soros reconheceram especificamente o péptido ¹⁰⁸AAsdRGsdRGsdRGMGsdRGNIF¹²² (SEQ ID NO:3) deste exemplo. De notar que a dimetilação de apenas uma arginina numa posição definida (aa 112) podia aumentar ainda mais a sensibilidade deste péptido mimotopo particular, sem perda de especificidade. Com base nestes dados utilizou-se um péptido candidato (¹⁰⁸AARGsdRGRGMGRGNIF¹²²) SEQ ID NO:1 para desenvolver um sistema de ELISA. O novo ensaio anti-Sm (anti-S33) demonstrou uma sensibilidade de 14,9% e uma especificidade de 99,7% para lúpus, resultando num valor preditivo positivo (PPV; 93,7%) e valor preditivo negativo (NPV; 80,2%) elevados e, deste modo, uma eficiência de diagnóstico elevada (80,7%). Assim, este teste oferece novas oportunidades para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistémico, especialmente para diferenciação entre SLE e MCTD, como revelado pelo estudo de correlação.

Analisando as propriedades bioquímicas dos epítomos de Sm identificados verifica-se que o pI pode ser tomado como uma previsão da antigenicidade do complexo-Sm. Em U1-RNP-A, SmB' e D1, o pI médio de regiões antigénicas era 10,4 (não antigénico 6,0) e em SmD2 e D3 mais do que pI 9,0 (McClain *et al.*, 2002). Estas verificações da invenção ajustam-se bem ao pI elevado do péptido S33 (> 12,88). O facto do carácter básico simplesmente aumentar a probabilidade de exposição da superfície destas regiões e assim a acessibilidade aos anticorpos, terá que ser ainda investigado.

Anticorpos EBV, EBNA e anti-SmD. Estudos de mapeamento de epítomo em SmD1 identificaram um motivo de epítomo (aa 95-119) que tem reacção cruzada com uma sequência homóloga 35-58 do antigénio nuclear 1 do vírus Epstein-Barr (EBNA-1) (Sabbatini *et al.*, 1993; Sabbatini *et al.*, 1993; Marchini *et al.*, 1994). Um estudo mais recente mostrou que este epítomo também tem reacção cruzada com uma região homóloga de SmD3 que contém repetições de glicina e arginina (RGRGRGMGR) SEQ ID NO:5 (McClain *et al.*, 2002). Além disso, tornou-se evidente que GPRR (aa 114-119 em SmD1) representa um motivo comum de auto-epítomo com reacção cruzada, que está presente não só em

EBNA-1, mas também numa variedade de auto-antígenos, incluindo CENP-A, B, C, SmBB', SmD1 e Ro-52, para designar apenas alguns (Mahler *et al.*, 2001). Assim, os pacientes que sofrem de mononucleose infecciosa ou distúrbios relacionados com SLE podem ser testados como falsos positivos em ELISA que utilizam extensões C-terminais de SmD1 ou SmD3. Além disso, vários estudos sugeriram uma influência do EBV no desenvolvimento de condições do tipo Lúpus (James *et al.*, 1997). Deste modo, considera-se que a utilização de soros positivos para EBV como controlos é uma constatação importante no sentido de obter um imunoensaio anti-SmD altamente específico e fiável. De entre os 25 controlos de doença de EBV apresentados não foi encontrada nenhuma amostra falso positiva, o que confirma a especificidade elevada sugerida para o ensaio anti-S33-ab. Infelizmente, Riemekasten e colaboradores (1998) não incluíram este grupo de pacientes na avaliação do seu teste.

Correlações com outras espécies de auto-anticorpos. A reactividade sobreposta entre ADN e antígenos de Sm foi descrita em várias publicações (Bloom *et al.*, 1993; Reichlin *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995). Apesar de nestes estudos se ter utilizado SmD de comprimento total, na presente invenção havia também uma correlação entre a reactividade anti-ADNcd e anti-S33 ($p < 0,0001$). Além do ADN, a presente invenção também apresenta uma correlação positiva entre anti-S33 e U1-68 ($p < 0,0001$), U1-A ($p < 0,0001$), U1-C ($p < 0,0001$), SmBB' ($p < 0,0001$), Sm ($p < 0,0001$) e SmD ($p < 0,0001$), mas não com histonas ($p = 0,0259$), La ($p = 0,8747$), Ro-52 ($p = 0,4034$) e Ro-60 ($p = 0,0143$). O facto de as associações observadas serem causadas ou não por reactividade cruzada, ou por diferentes espécies de auto-anticorpos que muitas vezes ocorrem em simultâneo permanece pouco claro. Outros estudos terão que ser realizados para esclarecer este assunto.

Riemekasten versus Brahms. O conflito óbvio entre os resultados de Riemekasten *et al.* e Brahms *et al.* poderá ser explicado pela existência de diferentes epítomos nas extensões C-terminais de SmD1. O péptido aa 83-119 (Riemekasten *et al.*, 1998) pode formar um epítomo conformacional, enquanto que péptidos mais curtos utilizados no segundo estudo contêm sítios de ligação dependentes de sdR lineares (Brahms *et al.*,

2000). Além disso, a reactividade reduzida contra o SmD1 de comprimento total (Riemekasten *et al.*, 1998) em comparação com o péptido SmD1₈₃₋₁₁₉ sugere que este epítopo de péptido representa uma estrutura críptica. Esta observação levanta a questão de quais os epítomos que são "vistos" *in vivo* e quais os que desempenham um papel central na patogénese do SLE. Num estudo recente tornou-se evidente que a injeção de SmD1₈₃₋₁₁₉ fundido com uma proteína transportadora é capaz de acelerar o processo patogénico de ratinhos propensos a Lúpus (Riemekasten *et al.*, 2001).

Síndrome de "Rhupus". A artrite reumatóide (RA) e o lúpus eritematoso sistémico (SLE) são distúrbios relacionados com uma etiologia auto-imune. Ambas as doenças são acompanhadas pela ocorrência de anticorpos auto-reactivos contra estruturas definidas. Vários estudos descreveram síndromes sobrepostas entre RA e Lúpus que foram, por isso, por vezes designadas por síndrome de "Rhupus" (Miyachi e Tan, 1979; Panush *et al.*, 1988; Brand *et al.*, 1992). Nos exemplos apresentados, verificou-se que um paciente no grupo RA apresentava reactividade anti-S33 (24,6 U/ml). O facto destes resultados reflectirem um teste falso positivo ou se pelo contrário os auto-anticorpos contra o péptido S33 representam um precursor de condições do tipo lúpus permanece pouco claro e terá que ser investigado.

Referências

Abuaf N, Johanet C, Chretien P, Absalon BI, Homberg JC, Buri JF. Detection of autoantibodies to Sm antigen in systemic lupus erythematosus by immunodiffusion, ELISA and immunoblotting: variability of incidence related to assays and ethnic origin of patients. *Eur J Clin Invest.* 1990 Aug;20(4):354-9.

Arbuckle MR, Reichlin M, Harley JB, James JA. Shared early autoantibody recognition events in the development of anti-Sm B/B' in human lupus. *Scand J Immunol.* 1999 Nov;50(5):447-55.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for

the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):315-24.

Arnett FC, Hamilton RG, Roebber MG, Harley JB, Reichlin M. Increased frequencies of Sm and nRNP autoantibodies in American blacks compared to whites with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1988 Dec; 15(12):1773-6

Bloom DD, Davignon JL, Cohen PL, Eisenberg RA, Clarke SH. Overlap of the anti-Sm and anti-DNA responses of MRL/Mp-1pr/1pr mice. *J Immunol.* 1993 Feb 15; 150(4.):1579-90.

Brahms H, Raker VA, van Venrooij WJ, Luhrmann R. A major, novel systemic lupus erythematosus autoantibody class recognizes the E, F, and G Sm snRNP proteins as an E-F-G complex but not in their denatured states *Arthritis Rheum.* 1997 Apr;40(4):672-82.

Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyser, F., Meheus, L., Lührmann, R., The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *J. Biol. Chem.* 275, 17122-17129, 2000.

Brahms H, Meheus L, de Brabandere V, Fischer U, Luhrmann R. Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA.* 2001 Nov;7(11):1531-42.

De Keyser F, Hoch SO, Takei M, Dang H, De Keyser H, Rokeach LA, Talal N. Cross-reactivity of the B/B' subunit of the Sm ribonucleoprotein autoantigen with proline-rich polypeptides. *Clin Immunol Immunopathol* 1992 Mar;62(3):285-90

Gausepohl, H., Behn, C. Automated Synthesis of Solid-Phase Bound Peptides. In "Peptide Arrays on Membrane supports, Synthesis and Applications" (J. Koch and M. Mahler, Eds), pp.55-68, Springer Verlag, Heidelberg, New York, 2002.

Greidinger EL, Hoffman RW. The appearance of U 1 RNP antibody specificities in sequential autoimmune human antisera follows a characteristic order that implicates the U1-70 kd

and B'/B proteins as predominant U1 RNP immunogens. *Arthritis Rheum.* 2001 Feb;44(2):368-75.

Hirakata M, Craft J, Hardin JA. Autoantigenic epitopes of the B and D polypeptides of the U1 snRNP. Analysis of domains recognized by the Y12 monoclonal anti-Sm antibody and by patient sera. *J Immunol.* 1993 Apr 15;150(8 Pt 1):3592-601.

Hoch SO, Eisenberg RA, Sharp GC. Diverse antibody recognition patterns of the multiple Sm-D antigen polypeptides. *Clin Immunol.* 1999 Aug;92(2):203-8.

Hoch, S.O., The Sm antigens. In "Manual of biological Markers of disease" (R. N. Maini and W.J. van Venrooji, Eds.), pp. B2.4/1-29, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1994.

Jaekel HP, Klopsch T, Benkenstein B, Grobe N, Baldauf A, Schoessler W, Werle E. Reactivities to the Sm Autoantigenic Complex and the Synthetic SmD1-aa83-119 Peptide in Systemic Lupus Erythematosus and other Autoimmune Diseases. *J Autoimmun.* 2001 Dec; 17(4):347-54.

James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehman TJ, Harley JB. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1997 Dec 15;100(12):3019-26.

Lehmeier T, Raker V, Hermann H, Luhrmann R. CDNA cloning of the Sm proteins D2 and D3 from human small nuclear ribonucleoproteins: Evidence for a direct D1-D2 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994 Dec; 91:12317-12321

Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, Wolin SL, Steitz JA. Are snRNPs involved in splicing? *Nature.* 1980 Jan 10; 283(5743):220-4.

Mahler M, Mierau R, Schlumberger W, Bluthner M. A population of autoantibodies against a centromere-associated protein A major epitope motif cross-reacts with related cryptic epitopes on other nuclear autoantigens and on the Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Mol Med* 79, 722-31

Marchini B, Dolcher MP, Sabbatini A, Klein G, Migliorini P. Immune response to different sequences of the EBNA I molecule in Epstein-Barr virus-related disorders and in autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 1994 Apr;7(2): 179-91.

McClain MT, Ramsland PA, Kaufman KM, James JA. Anti-sm autoantibodies in systemic lupus target highly basic surface structures of complexed spliceosomal autoantigens. *J Immunol.* 2002 Feb 15;168(4):2054-62.

Panush RS, Edwards NL, Longley S, Webster E. 'Rheupus' syndrome. *Arch Intern Med.* 1988 Jul; 148(7): 1633-6.

Reichlin M, Martin A, Taylor-Albert E, Tsuzaka K, Zhang W, Reichlin MW, Koren E, Ebling FM, Tsao B, Hahn BH. Lupus autoantibodies to native DNA cross-react with the A and D SnRNP polypeptides. *J Clin Invest.* 1994 Jan;93(1):443-9.

Riemekasten G, Marell J, Trebeljahr G, Klein R, Hausdorf G, Haupl T, Schneider-Mergener J, Burmester GR, Hiepe F. A novel epitope on the C-terminus of SmD is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1998 Aug 15; 102(4):754-63.

Riemekasten G, Kawald A, Weiss C, Meine A, Marell J, Klein R, Hoher B, Meisel C, Hausdorf G, Manz R, Kamradt T, Burmester GR, Hiepe F. Strong acceleration of murine lupus by injection of the SmD1(83-119) peptide. *Arthritis Rheum.* 2001 Oct;44(10):2435-45.

Roeach LA, Haselby JA, Hoch SO. Molecular cloning of a cDNA encoding the human Sm-D autoantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1988 Jul; 85(13): 4832-6

Roeach LA, Jannatipour M, Haselby JA, Hoch SO. Mapping of the immunoreactive domains of a small nuclear ribonucleoprotein-associated Sm-D autoantigen. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992 Dec;65(3):315-24.

Roeach LA, Hoch SO. B-cell epitopes of Sm autoantigens. *Mol Biol Rep.* 1992 Jun; 16(3): 165-74. Review.

Sabbatini A, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus bind a shared

sequence of SmD and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA I. Eur J Immunol 1993 May;23(5):1146-52

Sabbatini A, Dolcher MP, Marchini B, Bombardieri S, Migliorini P. Mapping of epitopes on the SmD molecule: the use of multiple antigen peptides to measure autoantibodies in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1993 Oct;20(10):1679-83.

Seraphin B. Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. EMBO J. 1995 May 1;14(9):2089-98.

Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol. 1966 Mar;96(3):464-71.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1982 Nov;25(11):1271-7.

von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum. 1995 Apr;24(5):323-58. Review.

Ou Y, Sun D, Sharp GC, Hoch SO. Screening of SLE sera using purified recombinant Sm-D 1 protein from a baculovirus expression system. Clin Immunol Immunopathol. 1997 Jun;83(3):310-7.

Zhang W, Reichlin M. IgM anti-A and DsRNP proteins and IgM anti-dsDNA are closely associated in SLE sera. Clin Immunol Immunopathol. 1995 Jan;74(1):70-6.

Critérios para a classificação de esclerose sistêmica (esclerodermia). Subcomité para critérios de esclerodermia do American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum. 1980 May; 23(5):581-90.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Pharmacia Diagnostics AB

<120> Método analítico e seu *kit*

<130> P06663EP00

<140> PCT/SE2004/000526

<141> 2004-04-02

<160> 26

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) $\overline{\text{---}}$. . (5)

<223> METILAÇÃO, simétrica

<400> 1

Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe
1				5				10						15

<210> 2

<211> B

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Pro	Pro	Pro	Gly	Met	Arg	Pro	Pro
1				5			

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<220>
 <221> MOD_RE5
 <222> (3)⁻(3)
 <223> METILAÇÃO, simétrica

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (5)⁻..(5)
 <223> METILAÇÃO, simétrica

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)⁻..(7)
 <223> METILAÇÃO, simétrica

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)⁻..(11)
 <223> METILAÇÃO, simétrica

<400> 3

Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe
1				5					10					15

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido sintetizado

<400> 4

Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe
1				5					10					15

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg
1				5				

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 6

Asp	Val	Glu	Pro	Lys	Val	Lys	Ser	Lys	Lys	Arg	Glu	Ala	Val	Ala
1				5					10					15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 7

Val	Glu	Pro	Lys	Val	Lys	Ser	Lys	Lys	Arg	Glu	Ala	Val	Ala	Gly
1				5					10					15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 8

Pro	Lys	Val	Lys	Ser	Lys	Lys	Arg	Glu	Ala	Val	Ala	Gly	Arg	Gly
1				5					10					15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 9

Val	Lys	Ser	Lys	Lys	Arg	Glu	Ala	Val	Ala	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly
1				5						10				15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 10

Ser Lys Lys Arg Glu Ala Val Ala Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 11

Lys Arg Glu Ala Val Ala Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 12

Glu Ala Val Ala Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 13

Val Ala Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 14

Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 15

Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Gly Pro
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 16

Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Arg
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 17

Gln Val Ala Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 18

Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile
1				5					10					15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 19

Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe
1				5					10					15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 20

Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe	Gln
1				5					10					15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 21

Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe	Gln	Lys
1				5					10					15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 22

Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe	Gln	Lys	Arg
1				5					10					15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 23

Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe	Gln	Lys	Arg	Arg
1				5					10					15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> METILAÇÃO, SIMÉTRICA

<400> 24

Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe
1				5					10					15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> METILAÇÃO, SIMÉTRICA

<400> 25

Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe
1				5					10					15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> METILAÇÃO, SIMÉTRICA

<400> 26

Ala	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Phe
1				5					10					15

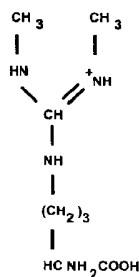
Lisboa, 2008-02-01

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido compreendendo a sequência de aminoácidos AARGsdRGRGMGRGNIF (SEQ ID NO: 1) que é capaz de reagir com anticorpos que estão presentes em soros de pacientes com lúpus eritematoso sistémico (SLE) em que sdR é uma arginina simetricamente dimetilada.

2. Péptido de acordo com a reivindicação 1 em que a arginina simetricamente dimetilada tem a posição 112 na sequência polipeptídica de SmD3.

3. Péptido de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que a estrutura da arginina simetricamente dimetilada é



4. Utilização de um péptido, compreendendo a sequência de aminoácidos AARGsdRGRGMGRGNIF (SEQ ID NO: 1), que é capaz de reagir com anticorpos que estão presentes em soros de pacientes com lúpus eritematoso sistémico (SLE) para o fabrico de uma composição para o diagnóstico de pacientes com SLE.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que o diagnóstico é um diagnóstico diferencial para distinguir entre pacientes com SLE e pacientes com doença mista do tecido conjuntivo (MCTD).

6. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que o diagnóstico é um diagnóstico de SLE *in vitro*.

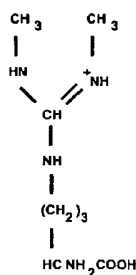
7. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que a composição é utilizada para a monitorização *in vitro* da actividade de doença de pacientes com SLE com ADNcd negativo.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que a referida composição é utilizada para diferenciar entre SLE e MCTD.

9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8, em que a arginina simetricamente dimetilada tem a posição 112 na sequência polipeptídica de SmD3.

10. Utilização de um péptido multimérico que compreende o péptido de acordo com a reivindicação 1.

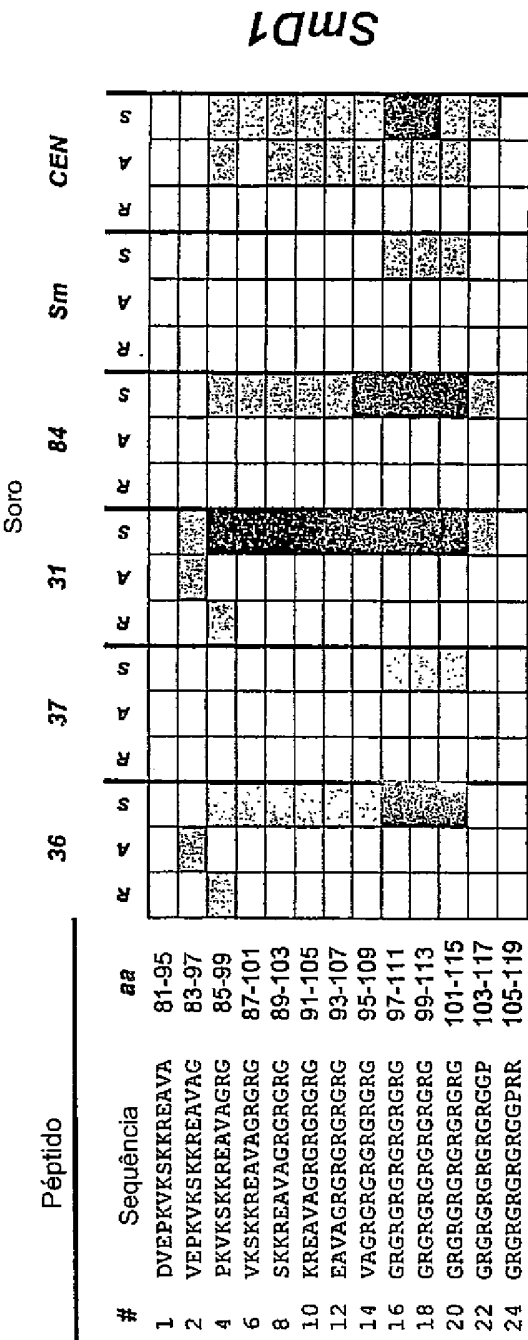
11. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 10, em que a estrutura da arginina simetricamente dimetilada é



12. Método para monitorizar uma actividade de doença compreendendo o teste repetido para monitorizar o título de anticorpos capazes de reagir com o péptido de acordo com as reivindicações 1-3, de modo a monitorizar o efeito do tratamento ou a actividade da doença.

Lisboa, 2008-02-01

Fig. 1a

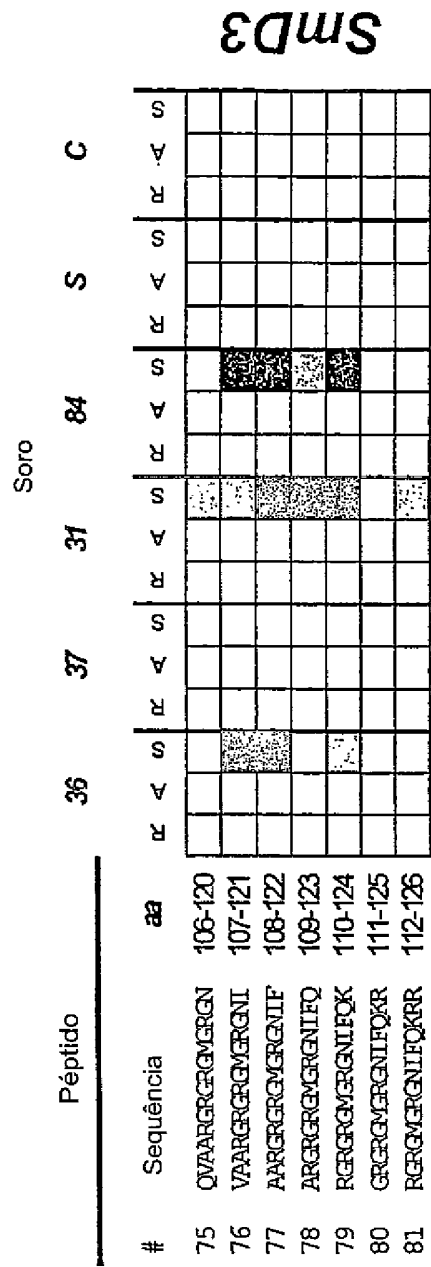


R = arginina

S = dimetilarginina simétrica

A = dimetilarginina assimétrica

Fig. 1b



R = arginina

S = dimetilarginina simétrica

A = dimetilarginina assimétrica

Fig.

1. c.)

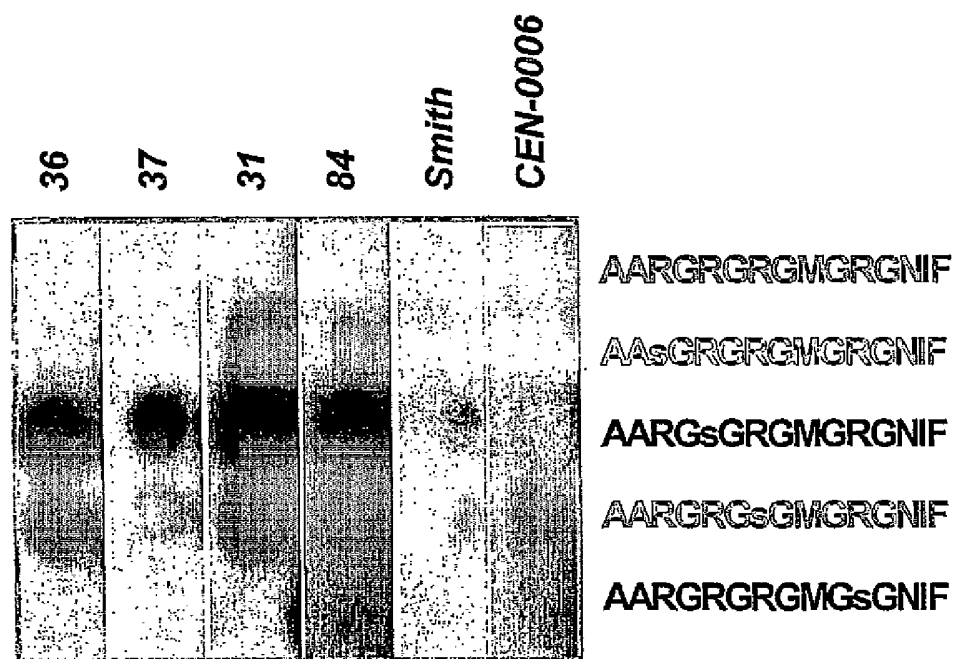


Fig. 2a

	Concentração de anticorpo		
	Baixa	Média	Elevada
Intra-ensaio			
Média [U/ml]	7.1	36.3	83.8
CV(%)	1.82	3.79	6.52
Intra-ensaio			
Média [U/ml]	7.48	36.54	91
CV(%)	3.97	7.42	2.27

Fig. 2b

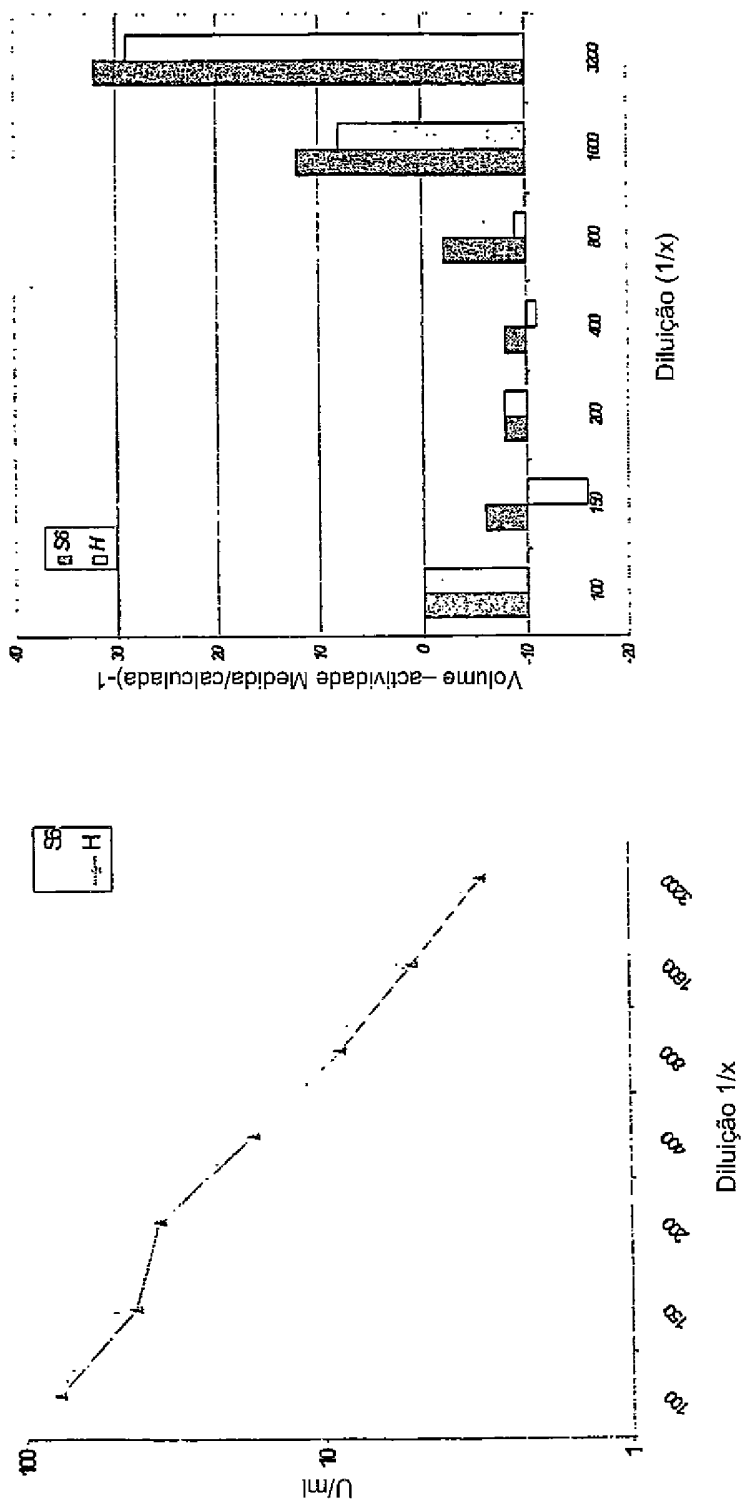


Fig. 2c

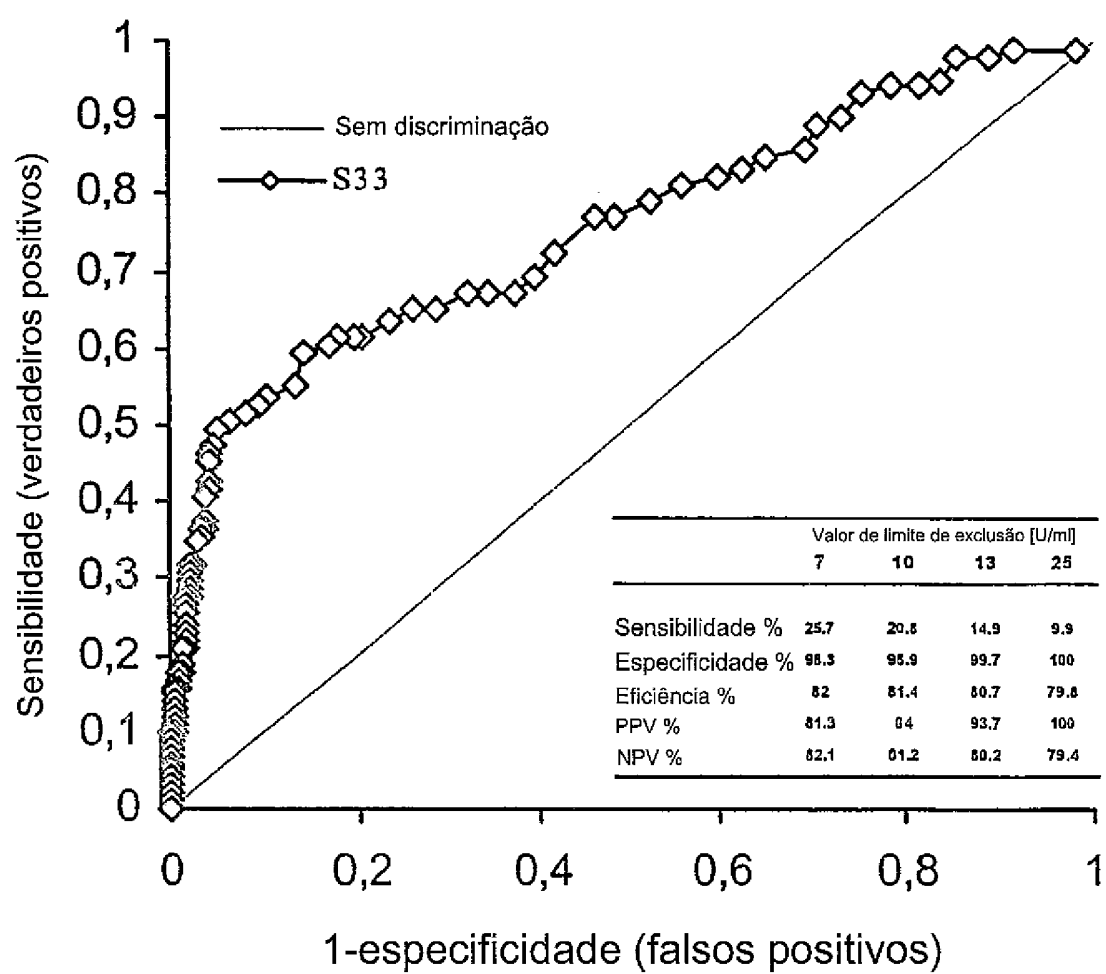


Fig. 3

