



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 847**

51 Int. Cl.:
C07K 7/08 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04725578 .1**
86 Fecha de presentación : **02.04.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1613645**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Procedimiento analítico y kit para el mismo.**

30 Prioridad: **02.04.2003 SE 0300958**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **Phadia AB.**
Box 6460
751 37 Uppsala, SE

72 Inventor/es: **Mahler, Michael**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento analítico y kit para el mismo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un péptido que comprende una arginina dimetilada simétrica, y constituye un determinante inmunológico de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con lupus sistémico eritematoso (SLE), y en el que la mutilación es un requisito previo para reaccionar con dichos anticuerpos. La invención también se refiere al uso de dicho péptido para la diagnosis de SLE y la diferenciación de SLE y enfermedad de tejido conectivo mixto (MCTD).

Antecedentes de la invención

Las enfermedades reumáticas sistémicas se caracterizan por la aparición de anticuerpos circulantes a dianas intracelulares definidas (revisado en von Mühlen y Tan, 1995). Entre los más tempranos de esos anticuerpos a identificar estaban el anti-Sm, que están estrechamente asociados a lupus sistémico eritematoso (SLE) (Tan y Kunkel 1966). De este modo, los anticuerpos anti-Sm se han incluido como uno de los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para esa enfermedad (Tan *et al.*, 1982). Aparte de los anticuerpos que dirigen el complejo de Sm anticuerpos anti-ADN, anti-PCNA, anti-U1-RNP, anti-nucleosoma, anti-histona, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anti-ribosómico RNP y anti-fosfolípido se encuentran frecuentemente en pacientes que padecen de SLE (von Mühlen y Tan 1995).

De media la reactividad de anti-Sm se encuentra en el 5 -30 % de los pacientes con SLE, aunque la frecuencia específica variará dependiendo del sistema de detección y la etnicidad de la población de SLE (Abuaf *et al.*, 1990; Jaekel *et al.*, 2001). El antígeno de Sm es parte del complejo esplecosomal que cataliza el ayuste de pre-ARNm nuclear (Seraphin, 1995; Lerner *et al.*, 1980). El propio complejo comprende al menos nueve polipéptidos diferentes con pesos moleculares que varían entre 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) y G (9 kDa)] (Hoch, 1994). Todas esas proteínas de núcleo pueden servir como dianas de la respuesta inmune de anti-Sm, lo más frecuentemente los polipéptidos B y D, que se consideran, por lo tanto, los antígenos principales (Hoch, 1994; Brahms *et al.*, 1997; Ou *et al.*, 1997). Sin embargo, los RNP específicos de SmBB' y U1 que son frecuentemente la Diana de los autoanticuerpos en los pacientes con MCTD comparten epítopes de reactividad cruzada, por consiguiente SmD se considera como el antígeno de Sm más específico (van Venrooij *et al.*, 1991; Hoch *et al.*, 1999). Dentro de la familia de SmD el patron de SmD1/D3 es al menos cuatro veces más común que el reconocimiento de SmD1/D2/D3 con una inmunorreactividad pronunciada a SmD 1 (Hoch *et al.*, 1999). En los estudios de mapeo de epítopes, se han mapeo varios epítopes lineales y conformacionales sobre las proteínas SmB- y D (Rokeach *et al.*, 1992; Hirakata *et al.*, 1993). Sobre SmD1 y BB' la reactividad principal se encontró predominantemente en las extensiones C-terminal (Rokeach *et al.*, 1992; Hirakata *et al.*, 1993; Rokeach y Hoch, 1992). El epítipo PPPGMRPP (SEQ ID NO: 2) que aparece tres veces dentro de las extensiones C-terminal de SmBB' se mostró que reaccionan de manera cruzada con otras estructuras ricas en prolina de antígenos esplecosomales tales como los antígenos específicos de U 1 de las proteínas retrovirales tales como p24 gag de VIH-1 (De Keyser *et al.*, 1992). Los estudios de seguimiento y experimentos de inmunización revelaron que este motivo es de manera consistente el epítipo de SmBB' más temprano que se puede detectar que actúa como punto de partida de los episodios de dispersión de epítopes dentro de la molécula de BB' y para los polipéptidos de SmD (Arbuckle, 1999; Greidinger y Hoffman, 2001). Un estudio reciente identificó cinco epítopes lineales sobre SmD2 y cuatro sobre SmD3 distribuidos en las moléculas enteras (McClain *et al.*, 2002). Todos estos epítopes comparten propiedades básicas y están expuestos sobre la superficie de la proteína que les hace antigénicos (McClain *et al.*, 2002). Uno de los epítopes de las células B descritos sobre SmD3 (epítipo 4; aa 104-126) mostró una homología estrecha a una región antigénica de la proteína SmD1 que finalmente conduce a reactividad cruzada (McClain *et al.*, 2002). Para propósitos de diagnosis un péptido sintético que corresponde a la extensión C-terminal de SmD 1 se usó para desarrollar un ELISA, sistema con sensibilidades y especificidades de diagnóstico y que varían entre 36-70% e entre 91,7% y 97,2%, respectivamente (Riemekasten *et al.*, 1998; Jaekel *et al.*, 2001). Recientemente, se ha mostrado, que los polipéptidos D1, D3 y BB' contienen dimetilarginina simétrica (sdR) que constituye un autoepítipo principal dentro del extremo C de SmD1 (Brahms *et al.*, 2000; Brahms *et al.*, 2001). En uno de estos estudios un péptido sintético de SmD1 (aa 95-119) que contiene sdR demostró un incremento significativo de la reactividad cruzada comparada con el péptido no modificado que refleja un conflicto con los datos previos (Riemekasten *et al.*, 1998; Brahms *et al.*, 2000).

En el documento WO 99/11667 se describe un procedimiento para producir péptidos que contienen argininas metiladas y que constituyen determinantes inmunogénicos de los anticuerpos presentes en suero de los pacientes con SLE o virus de Epstein-Barr (EBV) y en el que la mutilación es un requisito previo para reaccionar con dichos anticuerpos. Sin embargo estos péptidos se describen en general y no se ha descrito ninguna conexión entre la secuencia de péptidos y la capacidad para diagnosticar enfermedad autoinmune.

Sumario de la invención

Los inventores han descubierto ahora el péptido de los inventores reivindicado que comprende una arginina dimetilada simétrica en una posición definida es esencial para la diagnosis de SLE, y se ha encontrado sorprendentemente que este péptido se puede usar en un inmunoensayo de diagnóstico altamente específico y fiable para la selección de

pacientes de SLE y para la diferenciación entre SLE y MCTD. Los multímeros del péptido también se pueden usar para los mismos propósitos.

Se puede usar un kit que comprende el péptido reivindicado para la diagnosis de SLE así como para la diferenciación entre SLE y MCTD. La ventaja de la invención reivindicada es que no recoge las muestras falsas positivas del grupo de muestras de MCTD.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento analítico para la detección de anticuerpos anti-Sm.

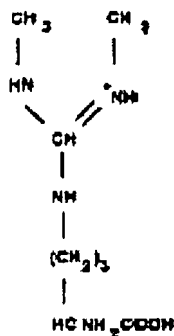
El presente inventor ha encontrado sorprendentemente que la dimetilación simétrica de un cierto resto arginina dentro de la secuencia de SmD3 es crucial para su antigenicidad.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un péptido (S33) que contiene 15-16 aminoácidos, que contiene arginina dimetilada simétrica (sdR), que es capaz de reaccionar con anticuerpos y siendo dicha mutilación crucial para la reacción entre dicho péptido y dichos anticuerpos y en el que dichos anticuerpos están presentes en el suero de los pacientes con lupus sistémico eritematoso (SLE), en el que el péptido S33 comprende la secuencia de aminoácidos

AARG sdR GRGMGRGNIF (SEQ ID NO:1)

En un aspecto adicional la arginina dimetilada simétrica tiene la posición 112 en la secuencia del polipéptido de SmD3.

En un aspecto adicional el péptido S33 comprende una arginina dimetilada simétrica con la estructura



En un aspecto adicional la invención es un procedimiento para el uso del péptido S33 para la diagnosis *in vitro* de SLE.

En un aspecto adicional la invención es un procedimiento para el uso del péptido S33 para la diferenciación de SLE y enfermedad de tejido conectivo mixto (MCTD).

En un aspecto adicional la invención es un kit para uso del péptido S33 para controlar *in vitro* la actividad de la enfermedad en pacientes de SLE negativos de ADNds, en el que la actividad de la enfermedad se define como una correlación entre el título del anticuerpo y el nuevo péptido mimotopo y la actividad de la enfermedad.

En un aspecto adicional la invención es un procedimiento para seguir el título del anticuerpo mediante ensayo repetido con el fin de controlar el efecto de tratamiento o actividad de enfermedad.

En un aspecto adicional la invención es un péptido multimérico que comprende múltiplos del péptido S33.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Análisis de epítipo de SmDI y SmD3. Extensiones C-terminal de SmD1 (a) y SmD3 (b) se sintetizaron como disposiciones de péptido (15 meros; impresión de aa) y se sondaron con suero de pacientes. El péptido no. 77 inmunorreactivo se ensayó además como variantes de mimototo (c).

Figura 2. Características de realización del nuevo ensayo de S33. Variabilidad Intra- e inter ensayo a.), linealidad (b.), y análisis de ROC Característica Operativa del receptor que incluye Valor Predictivo Positivo (PPV), Valor Predictivo Negativo (NPV) y eficacia a diferentes cortes (c-).

Figura 3. Un paciente varón de SLE se observó de manera clínica y sexológica durante un período de 18 meses.

Descripción detallada de la invención**Ejemplo 1**5 *Muestras de suero*

Se recogió suero (n = 628) de pacientes que sufren lupus sistémico eritematoso (SLE; n = 176), artritis reumatoide (RA, n = 86), síndrome de Sjögren (SS, n = 24); enfermedad de tejido conectivo mixto (MCTD, n = 26), escleroderma (SSc, n = 26) y polimiositis/dermatomiositis (PM/DM, n = 13). Todos los pacientes se clasificaron de acuerdo con el criterio de ACR para cada enfermedad (Tan *et al.*, 1982; Arnett *et al.*, 1988). Para determinar además la especificidad del ensayo, los inventores analizaron un grupo de sueros de pacientes con enfermedades infecciosas (n = 77) que incluyen virus de hepatitis-C (VHC; n = 30), de citomegalovirus (CMV; n = 22) y de Epstein-Barr (EBV; n = 25) así como entre 192 donantes de sangre sanos. Todos los sueros se almacenaron a -80°C hasta uso. Para el mapeo de epítopes se usó un panel de cinco sueros que contenía anticuerpos anti-Sm. Como controles negativos se seleccionaron sueros antiinmunes con diferentes especificidades de anticuerpos de anti-Sm.

Caracterización serológica de sueros de pacientes de SLE seleccionados al azar. Se ensayaron todos los sueros de los pacientes autoinmunes para los autoanticuerpos a histonas, ADNds y el complejo de Sm usando Varelista® s cuantitativo (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Alemania). Los sueros de SLE y las muestras, que demostraron resultados no esperados también se midieron en el Kit cuantitativo de investigación ELISA de división ANA (Pharmacia, Freiburg, Alemania). El último ensayo contiene los autoantígenos U1-68 kDa, U1-A, U1-C, SmBB', SmD, Ro-52, Ro-60 y

La. Todos los ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones de uso.

25 **Ejemplo 2***Mapeo de Epítopes con oligopéptidos inmovilizados*

Las secuencias publicadas de SmD1, P13641, (Rokeach *et al.*, 1988) y SmD3, P43331, (Lehmeier *et al.*, 1994) se usaron para sintetizar péptidos de 15 meros de superposición con un robot de pipeteado de acuerdo con el protocolo descrito por Gausepohl y Behn (2002). Las extensiones C-terminal de ambos polipéptidos se sintetizaron con una impresión de 2 aminoácidos (superposición de 13 aminoácidos). Cada péptido que contiene arginina se sintetizó en forma de tres variantes, con arginina natural, con sdR o con dimetilarginina asimétrica (asDMA) en las posiciones respectivas. Después de esto, se sintetizó un péptido altamente reactivo de SmD3 con ciertas combinaciones de arginina natural y sdR. Después de la finalización de la síntesis de péptidos se bloquearon sitios de unión no específica mediante incubación durante la noche de las membranas en tampón de bloqueo 1:100 en (BB) a temperatura ambiente (TA). Después de una etapa de lavado las membranas se incubaron con muestras de suero a una dilución de 1:100 en BB durante 2 h a TA. Los anticuerpos no inidos se retiraron mediante tres etapas de lavado. Para la detección anticuerpo de IgG cabra - anti- humano conjugado a peroxidasa se diluyó 1:5000 en BB y se incubó durante 75 min (TA). Se retiraron los anticuerpos secundarios superfluos mediante tres etapas de lavado. Finalmente, se visualizaron los anticuerpos unidos usando el sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL). Se usaron condiciones de ensayo en las que los sueros negativos no mostraron reactividad.

Ejemplo 345 *ELISA del péptido S33*

Preparación de placas de ELISA. El péptido S33 liofilizado se usó para preparar una solución madre de 10 µg/µl, que se almacenó en alícuotas a -20°C hasta el uso. La unión del péptido a placas de ELISA se llevó a cabo usando 2,5 µg/ml del péptido en tampón de revestimiento en un volumen final de 120 µl por pocillo. El procedimiento de revestimiento se llevó a cabo a 15°C durante 20 h. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con solución de bloqueo. Después de desechar las fases sólidas de la solución de bloqueo se secaron a 37°C durante 2 h y se sellaron.

El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo general del sistema Varelista® (Pharmacia Diagnostics, Friburgo). Los donantes de sangre demostraron un intervalo de reactividad de 0,4-11,5 U/ml que dan como resultado un valor medio de 2,2 U/ml y un valor de D S de 1,2 U/ml. El corte se estableció técnicamente a 13 U/ml después de análisis de RO. Los valores de PPV y NPV se calcularon a diferentes valores de corte.

Precisión y reproducibilidad. Las mediciones de imprecisión (variabilidad inter- e intra- ensayos) se realizaron con 4 y 6 réplicas, respectivamente. Para determinar la precisión dipéptido anti-S33 se ensayaron sueros anti-Sm adecuados de ELISA, una muestra de valor bajo (L); una muestra de valor medio (M) y una muestra de valor alto (H) en cinco ensayos independientes el día uno (Inter-ensayo), o en un solo ensayo (intra-ensayo). Para la precisión dentro del ensayo se midieron L, M y H en seis réplicas sobre una fase sólida. Los datos de precisión se calcularon usando análisis de ANOVA.

Linealidad. La linealidad se analizó mediante diluciones de ensayo (1:1; 2:3; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32) del punto estándar más alto (S6) y de la muestra de alto valor a partir del análisis de precisión (H). Para cada punto de dilución, se calculó una relación de la reactividad medida al valor esperado, y se restó 1 de este cociente.

Ejemplo 4

Estudio de correlación

- 5 Se ensayaron sueros de SLE seleccionados al azar (n = 50) y diversos controles (n = 100) usando ensayos de anticuerpo anti-Sm de diferentes proveedores (Sm ensayo Ade Sm - Ensayo D de Sm) y se compararon los resultados con los hallazgos del ensayo de ELISA de anti-S33.

Ejemplo 5

10

Estudio de seguimiento de un paciente de SLE

- Un paciente varón de SLE se observó clínicamente y serológicamente durante un período de tiempo de 18 meses (6 muestras de suero; véase la figura 3). El paciente se ensayó para evaluar los anticuerpos para el complejo RNP/Sm, para el antígeno Sm, para el complejo UI-RNP, para las histonas, para el ADNds, y para el péptido S33 usando los kits de ensayo respectivos de Pharmacia Diagnostics.

Resultados

- 20 *Mapeo fino de epítopes de las extensiones C-terminal de SmD1 y D3.* Para evaluar el efecto de la dimetilación de arginina sobre la antigenicidad de SmD1 y SmD3 y para mapear los epítopes relevantes sobre ambos polipéptidos se ensayó un panel de sueros anti-Sm con disposiciones de péptido (15 meros, 2 impresiones) que cubren la región C-terminal de SmD1 (P13641) y SmD3 (P43331).

- 25 Los resultados muestran que la dimetilación de los restos de arginina afecta a la unión de los anticuerpos anti-Sm a los polipéptidos C-terminal SmD1- y D3, de manera significativa (véase la figura 1). Todos los sueros anti-SmD (n° 36, n° 37, n° 31, n° 84, n° Sm) demostraron un aumento de unión a péptidos SmD1 que contenían la forma simétrica de la dimetilarginina (sdR). Especialmente los péptidos que constan de glicina y repeticiones de DMA, exclusivamente mostraron una fuerte reactividad con los anticuerpos (péptido no. 9, 10). No obstante, los polipéptidos SmD1 que contienen DMA representan un sustrato por el contrario no específico para los anticuerpos anti-Sm ya que ellos también eran diana de los anticuerpos anti-centrómero (ACA; n° suero CEN (centrómero)). De manera interesante, aquellos ACA se unieron también a péptidos que contenían la forma asimétrica de DMA.

- 35 Los experimentos de unión con péptidos derivados de SmD3 mostraron resultados similares. Solamente los péptidos SmD3 que contenían sdR reaccionaron con los anticuerpos anti-Sm confirmando la importancia de la mutilación simétrica de restos de arginina (véase la figura 1b). Al contrario que SmD1, ningún suero de control (por ejemplo, CEN) demostró unión de anticuerpo a péptidos derivados de SmD3 reflejando una alta especificidad. Un péptido particular (n° 77, ¹⁰⁸AA sdRGsdRG sdRGMGsdRGNIF¹²²) SEQ ID NO: estaba fuertemente reconocido por por tres de los cinco antisueros anti-Sm. Usando un análisis mutacional en el que los restos de arginina de ¹⁰⁸AARGRGRGMGRGNIF¹²² (SEQ ID NO: 4) se reemplazaron sucesivamente por sdR los inventores eran capaces de mostrar que un péptido mimotopo con un solo resto de arginina dimetilada en la posición 112 mostró inmunorreactividad con los cinco sueros anti-Sm (n° 36, n° 37, n° 31, n° 84, n° Sm) pero no con los controles (por ejemplo, CEN; véase la figura 1c.). De este modo, introduciendo solamente un sdR y a una posición definida (aminoácido 112) de SmD3, fue posible incrementar la sensibilidad de este péptido (¹⁰⁸AARG sdRGRGMGRGNIF¹²²; S33), SEQ ID NO: 1 sin pérdida de especificidad.
- 45 Este péptido candidato se sintetizó posteriormente como antígeno soluble y se usó como sustrato en ELISA.

- 50 *Caracterización Immunoserológica del grupo de pacientes de SLE.* Para evaluar si el la cohorte de pacientes de SLE de los inventores representa un panel de suero de SLE representativo aproximadamente 100 muestras de SLE se seleccionaron al azar y se ensayaron para U1-68kD, U1- A, U1-C, SmBB', SmD, Ro-52/SS-A, Ro-60/SS-A, La/SS-B, histona ADNds y reactividad de β 2-glicoproteína (ensayo de investigación Split ANA-Profil, Pharmacia Diagnostics, Friburgo, Alemania). La prevalencia de los diferentes autoanticuerpos se encontró en una buena conformidad a los estudios previos (Jaekel *et al.*, 2001). De este modo, con relación a sus perfiles de autoanticuerpos, la cohorte de SLE parece ser una población representativa de SLE. Los resultados de las mediciones del panel de SLE se resumen en la tabla 1.

55

TABLA 1

60 *Prevalencia (%) de especificidades de autoanticuerpos relevantes en pacientes que sufren de SLE (n = 101)*

Autoanticuerpos para

65

U1-68	U1-A	U1-C	SmBB'	SmD	Ro-52	Ro-60	La	Histona	ADNds	β 2-Glicoproteína
15,8	24,8	25,7	21,8	15,8	21,8	47,5	21,8	37,6	51	17

ELISA de péptido Anti-S33

Un péptido de 15 aminoácidos soluble que muestra la mayor sensibilidad y especificidad en el ensayo SPOT (¹⁰⁸AARG sdRGRGMGRGNIF¹²²) SEQ ID NO: 1 se sintetizó por razones técnicas con una Cys adicional en el extremo C. Este péptido se usó posteriormente para desarrollar un sistema ELISA basándose en el protocolo general de los ensayos Varelisa® (Farmacia, Friburgo, Alemania).

Característica de comportamiento de ensayo. Para evaluar las características de comportamiento de ensayo se analizaron precisión, reproducibilidad y linealidad. Se encontró la variabilidad intra- e inter ensayo (CV%) de tres muestras que variaba entre 1,82 y 6,52% y entre 2,27 y 7,42%, respectivamente. Las series de dilución de dos muestras demostraron una variación lineal sobre cinco diluciones posteriores (desviación > 20%). Para la definición de corte se realizó un análisis de las características operativas del receptor (ROC) con SLE y suero control. Las características del de comportamiento del ensayo del Nuevo ensayo anti-S33 que incluye variabilidad intra e inter ensayo (a.), la linealidad(b.), análisis de ROC, PPV, NPV y eficacia (c.) se resumen en la figura 2 (a.-c.).

Para la evaluación de la relevancia de diagnóstico del nuevo ensayo se usó un corte técnico de 13 U/ml para combinar la alta especificidad con sensibilidad moderada. Se analizaron sueros de 176 pacientes de SLE, de 181 pacientes autoinmunes diagnosticados de manera diferente de SLE, de 77 pacientes con enfermedades infecciosas y de 192 donantes normales humanos en el nuevo sistema ELISA.. 28 pacientes SLE (15,9%) se ensayaron positivos para anticuerpos anti-S33 que muestran un incremento significativo de reactividad de hasta 952 U/ml con un valor medio de 43 U/ml (D S = 160,2 U/ml). Los pacientes de trastornos relacionados demostraron una reducción significativa de la reactividad en el nuevo sistema ELISA (media 3,36 U/ml). Solamente un paciente del grupo RA se ensayó positivo (24,6 U/ml). Ninguno de los controles restantes que incluyen pacientes que padecen SSc (n = 26), PM/DM (n= 13), MCTD (n = 126) o enfermedades infecciosas (n = 77) mostró reactividad de para el péptido S33. Las muestras de suero de los pacientes con enfermedades infecciosas mostraron una reducción de la reactividad (media 0,67 U/ml; valor máximo 3,3 U/ml); incluso cuando se compara con los donantes sanos (media 2,21 U/ml; valor máximo 11,5 U/ml). El valor máximo de los sueros de enfermedades infecciosas se encontró en el grupo EBV. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2

Resultados de ELISA usando S33 con SLE y diversos sueros control

Nº (%) de sueros positivos anti-S33		Valor medio (U/ml)	Valor máximo (U/ml)
SLE (n = 176)	28 (15,9)	43,0	1190,0
Enfermedades			
Reumáticas (181)	1 (0,6)	2,2	24,6
RA (86)	1 (1,2)	1,6	24,6
pss (24)	0	1,9	3,9
MCTD (26)	0	3,1	12,8
SSc (26)	0	2,4	4,3
PM/DM (13)	0	2,8	9,6
Enfermedades			
infecciosas (77)	0	0,67	3,3
VHC (30)	0	0,42	1,1
CMV (22)	0	0,8	3,2
EBV (25)	0	0,78	3,3
Individuos			
sanos (192)	0	2,21	11,5

En resumen, 15 muestras del grupo SLE (n = 176) y solamente un suero de los controles (n = 449, 0,2%) se ensayó positivo dando como resultado una especificidad de diagnóstico de 99,8% y una sensibilidad de 15,9%. PPV y NPV, así como la eficacia de diagnóstico se calculó a 96,6%, 75,3% y 76,3%, respectivamente (véase la figura 2 c.). Estos datos indican que los anticuerpos anti-S33 parecen estar exclusivamente presentes en pacientes SLE.

Aparte de la reactividad del péptido de anti-s33 la muestra ra falsa positive contiene altas titulaciones de los anticuerpos para los ul-rnps- 68 kda (relación 4,5), ul-c (relación 9,4) e histonas (133,8 u/ml) (véase la tabla 3). Las titulaciones de anti-smbb y anti-smd como se determina por ELISA eran elevadas cuando se comparan con los controles, pero todavía por debajo de los niveles de corte (véase la tabla 3).

Tabla 3. Perfil de anutoanticuerpos del paciente RA falso positivo en el Nuevo ensayo del péptido S33

Nº ID del Suero	Grupo de control	U1-68kD*	U1-A*	U1-C*	SmBB*	SmD*	Ro-52*	Ro-60*	La*	histona1 [U/ml]	ADNds 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
Ensayo semicuantitativo [†] (ANA-Split); corte >1,4											
1 corte (30 U/ml)											
2 corte (55 U/ml)											

Correlación con otros anticuerpos autoanticuerpos. Con relación a la posible existencia entre los anticuerpos anti-S33 y otras especies de autoanticuerpos, se realizó una evaluación estática usando el panel SLE de aproximadamente 100 sueros seleccionados al azar. Las correlaciones significativas eran a U1-68 kDa ($p = 0,0335$), U1-A ($p < 0,0001$), U1-C ($p < 0,0001$) SmBB' ($p < 0,0001$), SmD ($p < 0,0001$), ADNds ($p < 0,0001$) e histona ($p < 0,0001$), pero no a Ro-52 ($p = 0,2192$), Ro-60 ($p = 0,2212$) y La ($p = 0,8785$) (véase la tabla 4).

TABLA 4

Asociación entre la positividad de anti-S33 y otras especies de Aab en SLE

Aab	U1-68 kD	U1-A	U1-C	SmB B	'Sm D	Ro-	Ro-	La	histona	ADNds	β 2-
a				B'		52	60				Glicoproteína
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	0,033	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	0,21	0,22	0,87	<0,0	<0,0	0,3792
dp	5	001*	001*	001*	001*	92	12	85	001*	011*	

Correlación de Pearson; * Estadísticamente significativo

Mirando la reactividad hacia el complejo de Sm, cinco muestras de pacientes de SLE seleccionados al azar ($n = 101$) reaccionaron con el antígeno de SmD purificado, pero no con el péptido S33. Los 11 sueros positivos de SmD (68,8%) también se ensayaron positivos en el nuevo ELISA del péptido anti-S33. De manera interesante, entre las muestras positivas de anti-S33, 4 pacientes (n° 89, n° 92, n° 20627, n° 9811) se encontraron, todas negativas anti-SmD mostrando reactividades de péptido anti-S33 de 15,4, 21,3, 41,3 y 13,9 unidades, respectivamente.

Para evaluar las correlaciones con los ensayos de anticuerpos anti-Sm comercialmente disponibles de 50 proveedores diferentes seleccionados al azar se ensayaron sueros de SLE del grupo de pacientes de SLE y 100 controles usando los ensayos de anticuerpos anti-Sm de diferentes proveedores. 6 de 50 sueros de SLE (12%) y ninguno de los controles (0%) eran positivos en el ensayo de anticuerpos anti-S33 dando como resultado una sensibilidad de 12% y una especificidad de 100%. Al contrario que el ensayo de anti-Sm de diferentes proveedores el ensayo A, B y C de Sm accedía solamente a 5 muestras de SLE (10%) y entre 6 (ensayo A, C de Sm) y 12 (ensayo D de Sm) pacientes del grupo de control. La mayoría de los resultados falso positivos se encontraron dentro del grupo de pacientes de MCTD (véase la tabla 5).

TABLA 5

Reactividad de suero control, principalmente MCTD en los ensayos de diferenets proveedores

Suero			Inmunoensayos				
Nº.	ID	Diagnosis	Vareliisa (R) @S33	Ensayo A Sm	Ensayo B Sm	Ensayo C Sm	Ensayo D Sm
			U/ml 13 #	RE 20 #	Unidades 40 #	Relación 1#	Relación 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; SL E	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 corte sugeridos							

Estudio de seguimiento de un paciente de SLE. Un paciente macho de SLE se observó clínicamente durante un período de 18 meses (6 muestras de suero; véase la figura 3). Al comienzo del estudio de seguimiento el paciente mostró una fuerte respuesta inmune hacia el complejo RNP/Sm (relación de 18), al antígeno Sm (relación de 6), al nuevo antígeno de Sm (337,5 U/ml) y una respuesta moderada a al complejo U1-RNP aislado (relación de 2) así como a las histonas (59,5 U/ml). No se pudo encontrar ninguna reactividad a ADNds (19,1 U/ml; corte 55 U/ml). En ese momento el registro médico reseñó una fase inactiva de enfermedad. Más tarde el título del anticuerpo hacia el nuevo antígeno de Sm se incrementó significativamente alcanzando su máximo en la tercera muestra de suero retirada en agosto de 1999. Por el contrario una disminución del título de anti-RNP/Sm se pudo observar entre el segundo y cuarto muestreo de sangre seguido de otro fuerte incremento en la quinta muestra. En ese momento el título contra el nuevo antígeno Sm (S33) era menor que antes y el estado de la enfermedad se reseñó como inactivo de acuerdo con el registro médico. No se pudieron encontrar alteraciones significativas en el título de anti-ADNds y anti-histona titer durante el tiempo de observación del paciente.

En los ejemplos presentados la respuesta inmune de anti-Sm se había analizado hacia los antígenos de Sm D1 y D3, que se considera que son los polipéptidos específicos de SLE (van Venrooji *et al.*, 1991; Hoch *et al.*, 1999). Usando péptidos inmovilizados se ha mostrado que la dimetilación simétrica de restos de arginina juega un papel importante en la formación de los epítopes de las células B o ambos antígenos. Esta observación se encontró en Buena conformidad con el resultado de Brahms *et al.* (2000) y de este modo contradictorias con los hallazgos de Riemekasten y colegas (1998). De manera interesante y además de las investigaciones previas, se encontró que con los péptidos como se ha descrito previamente la especificidad de los péptidos de Smd3 era mayor que los derivados de Smd1.

McClain y colegas (2002) describían cuatro regiones antigénicas Smd3 de los que la región 4 antigénica cubre el área 104-126. En esta invención los péptidos sintetizados sobre apoyos se sometieron a análisis pero sin usar la forma modificada de arginina. En la presente invención la reactividad dentro de esta región solamente encontrada en el caso de arginina natural se reemplazó por sdR. Estos resultados contradictorias se podrían explicar mediante el uso de sueros diferentes, metodología y / o variando la longitud del péptido. Tres de cinco sueros reconocían específicamente el péptido ¹⁰⁸AA sdRG sdRGdRGMG sdRGNIF¹²² (SEQ ID NO:3) de este ejemplo. De manera interesante, la dimetilación de una arginina solamente y en una posición definida (aa 112) podría incrementar a demás la sensibilidad de ese péptido mimotopo particular sin pérdida de especificidad. Basándose en estos datos se usó un péptido candidato (¹⁰⁸AARG sdRGRGMGRGNIF¹²²) SEQ ID NO: 1 para desarrollar un sistema ELISA. El Nuevo ensayo anti-Sm (anti-S33) demostró una sensibilidad de 14,9% y una especificidad de 99,7% para lupus dando como resultado un valor alto positivo (PPV; 93,7%) y predictivo negativo (NPV; 80,2%) y de este modo una alta eficacia de diagnóstico (80,7%). Por lo tanto este ensayo ofrece nuevas oportunidades para la diagnosis de lupus sistémico eritematoso, especialmente para la diferenciación de SLE y MCTD como se revela por el estudio de correlación.

Mirando las propiedades bioquímicas de los epítopes de Sm se revela que el pI se puede considerar como predictor de la antigenicidad sobre el complejo de Sm. Sobre U1-RNP-A, SmB' y D1, el valor medio de pI de las regiones antigénicas era 10,4 (no antigénico 6,0) y sobre Smd2 y D3 más de pIs 9,0 (McClain *et al.*, 2002). Estos hallazgos de la invención se ajustan bien al alto valor de pI del péptido S33 (> 12,88). Se ha de investigar adicionalmente si el carácter básico simplemente incrementa la probabilidad de exposición de estas regiones y de este modo la accesibilidad a los anticuerpos.

EBV, EBNA y anticuerpos anti-SmD. Los estudios de mapeo de Smd1 han identificado un motivo de epítipo (aa 95-119) que reacciona de manera cruzada con una secuencia homóloga 35-58 del antígeno 1 nuclear del virus Epstein-Barr 1 (EBNA-1) (Sabbatini *et al.*, 1993; Sabbatini *et al.*, 1993; Marchini *et al.*, 1994). Un estudio más reciente ha mostrado que este epítipo reacciona de manera cruzada con una región homóloga de Smd3 que contiene repeticiones de glicina arginina (RGRGRGMGR) SEC ID No: 5 (McClain *et al.*, 2002). Además ha llegado a ser evidente que GPRR (aa 114-119 sobre Smd1) representa un motivo de autoepítipo de reacción cruzada común, que está presente no solamente sobre EBNA-1, sino también sobre una variedad de autoantígenos que incluyen CENP-A, B, C, 5mBB', Smd1 y Ro-52, para mencionar solamente unos pocos (Mahler *et al.*, 2001). De este modo los pacientes que sufren mononucleosis infecciosa o trastornos relacionados con SLE deberían ensayarse como falsos positivos en los ELISA que usan las extensiones C-terminal de Smd1 o Smd3. Además, varios estudios han sugerido una influencia de EBV en el desarrollo de afecciones de tipo Lupus (James *et al.*, 1997). Por lo tanto se considera que el uso de sueros EBV positivos como controles es un hallazgo importante hacia un inmunoensayo de anti-SmD altamente específico y fiable. Entre los 25 controles de enfermedad de EBV presentados, no se encontró ninguna muestra falso positivo que confirmara la alta especificidad sugerida del ensayo anti-S33-abs. Desafortunadamente, Riemekasten y colegas (1998) no incluyeron este grupo de pacientes en la evaluación de su ensayo.

Correlaciones con otras especies de anticuerpos. La reactividad de superposición entre ADN y antígenos Sm se ha reseñado en varias publicaciones (Bloom *et al.*, 1993; Reichlin *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995). Mientras en estos estudios se usó SmD de longitud completa, en la presente invención, también existía una correlación de reactividad de anti-dsDNA y anti-S33 ($p < 0,0001$). Aparte del ADN, la presente invención también muestra una correlación positiva de anti-S33 y U1-68 ($p < 0,0001$), U1-A ($p < 0,0001$), U1-C ($p < 0,0001$), SmBB' ($p < 0,0001$), Sm ($p < 0,0001$) y Smd ($p < 0,0001$), pero no con las histonas ($p = 0,0259$), La ($p = 0,8747$), Ro-52 ($p = 0,4034$) y Ro-60 ($p = 0,0143$). No está claro si las asociaciones observadas son provocadas por reactividad cruzada o por diferentes especies de anticuerpos que se producen a menudo de manera simultánea. Además se han de dirigir estudios para verter más luz en esta cuestión.

Riemekasten contra Brahms. El conflicto obvio entre los resultados de Riemekasten *et al.* y Brahms *et al.* Se debe explicar por la existencia de epítopes diferentes en las extensiones C-terminal de SmD1. El péptido aa 83-119 (Riemekasten *et al.*, 1998) puede formar un epítipo conformacional, mientras que los péptidos más cortos usados en el segundo estudio contienen sitios de unión lineales, dependientes de sdR (Brahms *et al.*, 2000). Además, la reactividad reducida contra SmD1 de longitud completa (Riemekasten *et al.*, 1998), comparada con el péptido SmD1₈₃₋₁₁₉, sugiere que este epítipo de péptido representa una estructura crítica. Esta observación plantea la cuestión, dichos epítipes se “ven” *in vivo* y juegan el papel central en la patogénesis de SLE. En un estudio reciente se hace evidente, que la inyección de SmD1₈₃₋₁₁₉ fusionado a una proteína vehículo es capaz de acelerar el proceso patogénico de ratones propensos a Lupus (Riemekasten *et al.*, 2001).

Síndrome “Rufus”. Artritis reumatoide (RA) y lupus sistémico eritematoso (SLE) son trastornos relacionados con una etiología autoinmune. Ambas enfermedades están acompañadas por la aparición de anticuerpos auto reactivos a estructuras definidas. Se han reseñado varios estudios síndromes superpuestos entre RA y Lupus, que se llamaron por lo tanto algunas veces el Síndrome de “Rufus” (Miyachi y Tan, 1979; Panush *et al.*, 1988; Brand *et al.*, 1992). En los ejemplos presentados se encontró un paciente dentro del grupo RA que demostró reactividad anti-S33 (24,6 U/ml). Si este resultado refleja un ensayo falso positivo o si los anticuerpos para el péptido S33 representan un precursor de afecciones de tipo lupus no permanece claro y también se tiene que investigar.

Referencias

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 y immunoblotting: variability of incidence related to assays y 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*. Nov. de 1999; 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*. Marzo de 1988; 31 (3): 315-24.

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

Bloom DD, Davignon JL, Cohen PL, Eisenberg RA, Clarke SH. Overlap of the anti-Sm y anti-DNA responses of MRL/Mp-1pr/1pr mice. *J Immunol*. 15 de feb. de 1993; 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, y G Sm snRNP proteins as an E-F-G complex but not in their denatured states *Arthritis Rheum*. Abril de 1997; 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 y D3 contain symmetrical dimetilargininas, which form a major Bcell 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' y the Sm like protein LSm4, y their interaction with the SMN protein. *RNA*. Nov de 2001; 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* marzo de 1992; 62 (3): 285-90.

Gausepohl H, Behn C. Automated Synthesis of Solid-Phase Bound Peptides. In “Peptide Arrays on Membrane supports, Synthesis y Applications” (J. Koch y M. Mahler, Eds), p. 55-68, *Springer Verlag*, Heidelberg, Nueva York, 2002.

Greidinger EL, Hoffman RW. The appearance of U1 RNP antibody specificities in sequential autoimmune human antisera follows a characteristic order that implicates the U1-70 kd y B'/B proteins as predominant U1 RNP immunogens. *Arthritis Rheum*. Feb. de 2001; 44 (2): 368-75.

Hirakata M, Craft J, Hardin JA. Autoantigenic epitopes of the B y D polypeptides of the U1 snRNP. Analysis of domains recognized by the Y12 monoclonal anti-Sm antibody y by patient sera. *J Immunol*. 1993 Abr 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.* Agosto de 1999; 92 (2): 203-8.

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

Jaekel HP, Klopsch T, Benkenstein B, Grobe N, Baldauf A, Schoessler W, Werle E. Reactivities to the Sm Autoantigenic Complex y the Synthetic SmD1-aa83-119 Peptide in Systemic *Lupus Erythematosus* y other Autoimmune Diseases. *J Autoimmun.* Dic. de 2001; 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.* 15 de dic. de 1997; 100 (12): 3019-26.

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

Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, Wolin SL, Steitz JA. Are snRNPs involved in splicing? *Nature.* 10 de enero de 1980; 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 y 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 y in autoimmune diseases. *J Autoimmun.* Abril de 1994; 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.* 15 de feb. de 2002; 168 (4): 2054-62.

Panush RS, Edwards NL, Longley S, Webster E. "Rhumus" syndrome. *Arch Intern Med.* Julio de 1988; 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 y D SnRNP polypeptides. *J Clin Invest.* Enero de 1994; 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.* 15 de agosto de 1998; 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.* Octubre de 2001; 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.* jul. de 1988; 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.* Dic. de 1992; 65 (3): 315-24.

Roeach LA, Hoch SO. B-cell epitopes of Sm autoantigens. *Mol Biol Rep.* jun. de 1992; 16 (3): 165-74. Review. Sabbatini A, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus bind a shared sequence of SmD y Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA I. *Eur J Immunol* mayo de 1993; 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.* Oct. de 1993; 20 (10): 1679-83.

Seraphin B. Sm y Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 y U5 snRNPs. *EMBO J.* 1 de mayo de 1995; 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.* Marzo de 1966; 96 (3): 464-71.

ES 2 295 847 T3

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.* Noviembre de 1982; 25 (11): 1271-7.

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

10 **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.* Junio de 1997; 83 (3): 310-7.

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

20 Criterios preliminares para la clasificación de esclerosis sistémica (escleroderma).

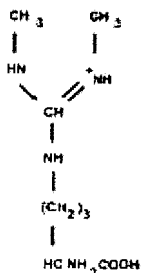
25 Subcomité para los criterios de escleroderma del Comité de Criterios de Diagnóstico y terapéuticos de la Asociación de Reumatismo Americana. *Arthritis Rheum.* Mayo de 1980; 23 (5): 581-90.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido, que comprende la secuencia de aminoácidos AARGsdRGRGMGRGNIF (SEQ ID NO: 1), que es capaz de reaccionar con los anticuerpos que están presentes en el suero de los pacientes con lupus sistémico eritematoso (SLE), en el que sdR es una arginina dimetilada simétrica.

2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 donde la arginina dimetilada de manera simétrica tiene la posición 112 en la secuencia de polipéptidos de SmD3.

3. The péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la estructura de la arginina dimetilada de manera simétrica es



4. Uso de un péptido, que comprende la secuencia de aminoácidos AARGsdRGRGMGRGNIF (SEQ ID NO: 1), que es capaz de reaccionar con los anticuerpos que están presentes en el suero de los pacientes con lupus sistémico eritematoso (SLE) para la fabricación de una composición para la diagnosis de pacientes de SLE.

5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la diagnosis es diagnosis diferencial para distinguir entre pacientes de SLE y pacientes con enfermedad de tejido conectivo mixto (MCTD).

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la diagnosis es una diagnosis *in vitro* de SLE.

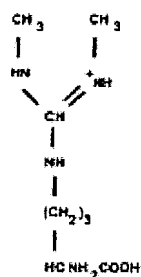
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha composición se usa para controlar *in vitro* la actividad de la enfermedad de pacientes de SLE negativos de ADNds

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, wh en el que dicha composición se usa para la diferenciación entre SLE y MCTD.

9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 donde la arginina dimetilada de manera simétrica tiene la posición 112 en la secuencia de polipéptidos de SmD3.

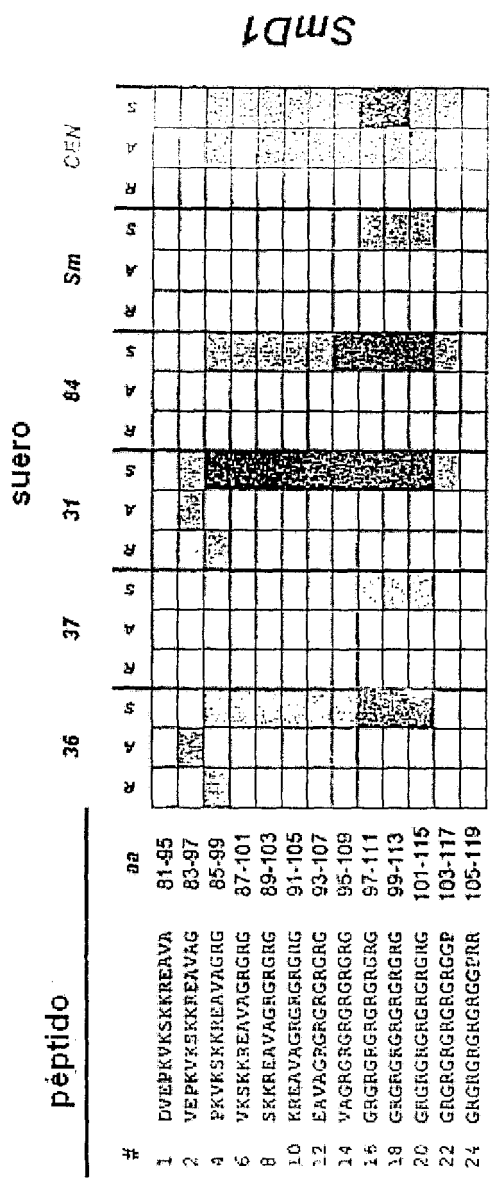
10. Uso de un péptido multimérico que comprende el péptido de la reivindicación 1.

11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que la estructura de la arginina dimetilada de manera simétrica es



12. Un procedimiento para controlar una actividad de la enfermedad que comprende ensayar repetidamente para seguir el título de los anticuerpos capaces de reaccionar con el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 con el fin de controlar el efecto de tratamiento o la actividad de la enfermedad.

Fig. 1a



R = arginina
S = dimetilarginina simétrica
A = dimetilarginina asimétrica

Fig. 1b

péptido		suero											
#	Secuencia	aa	36	37	31	84	S	C	SMD3				
75	QVAREGEGMERGN	106-120											
76	VPAREGEGMERGN	107-121											
77	PAAREGEGMERGN	108-122											
78	AREGEGMERGN	109-123											
79	RGEGEGMERGN	110-124											
80	GEGERGEMERGN	111-125											
81	RGEMERGN	112-126											

R = arginina

S = dimetilarginina simétrica

A = dimetilarginina asimétrica

Fig.

1. c.)

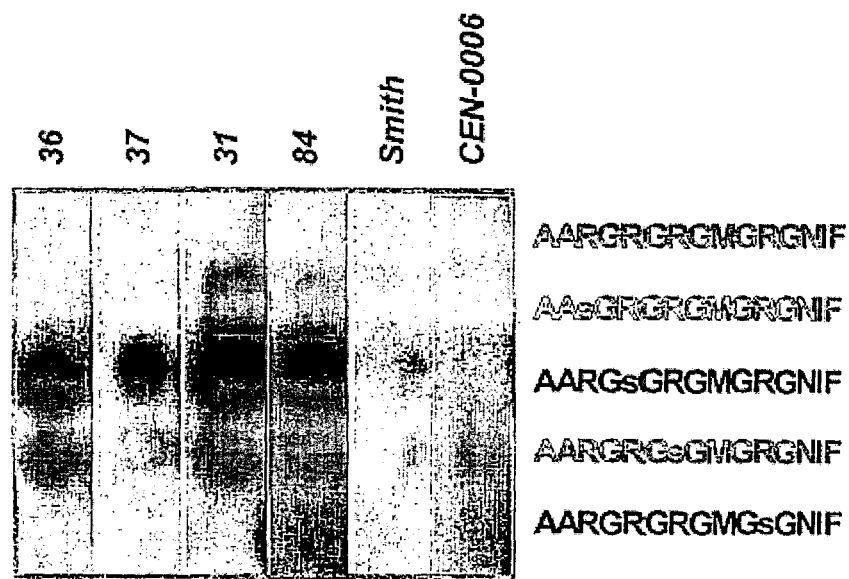


Fig. 2a

concentracion de anticuerpos											
baja media alta											
Intra ensayo											
media [U/ml]		7,1		36,3		83,8					
CV (%)		1,82		3,79		6,52					
2-taile	0,033	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	0,21	0,22	0,87	<0,0	<0,0	0,3792
dp	5	001*	001*	001*	001*	92	12	85	001*	011*	
media [U/ml]		7,48		36,54		91					
CV (%)		3,97		7,42		2,27					

Fig. 2b

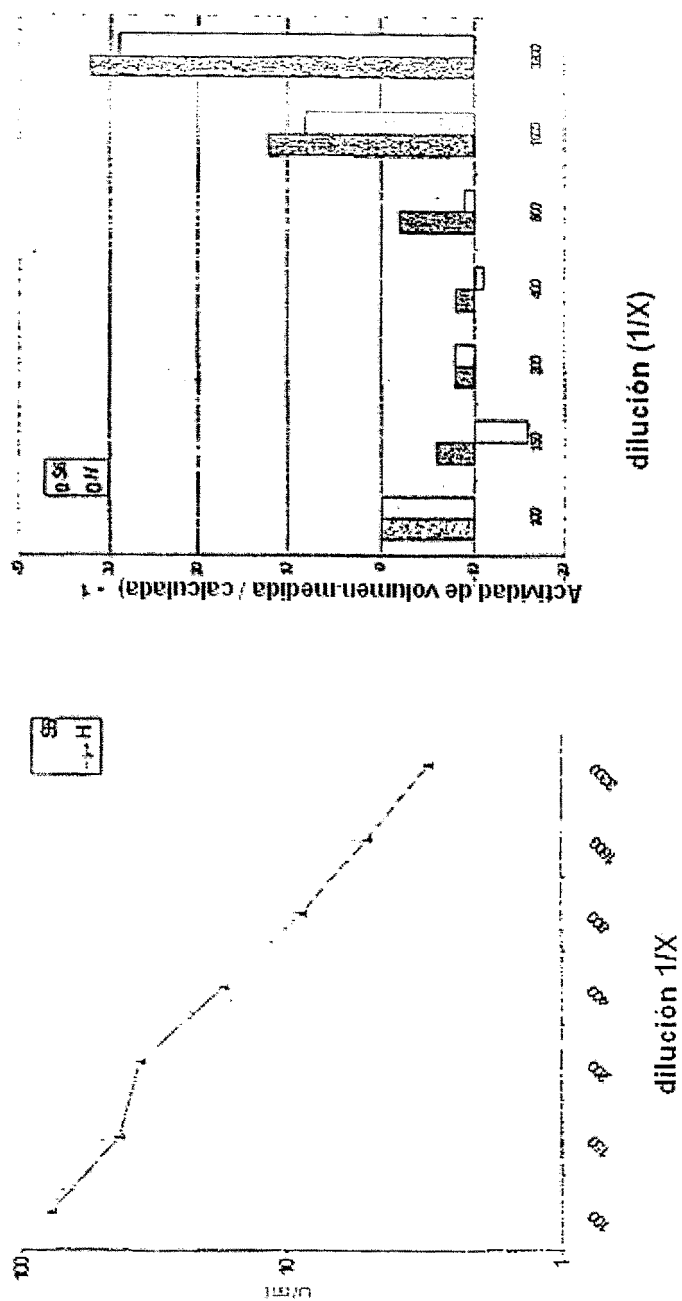
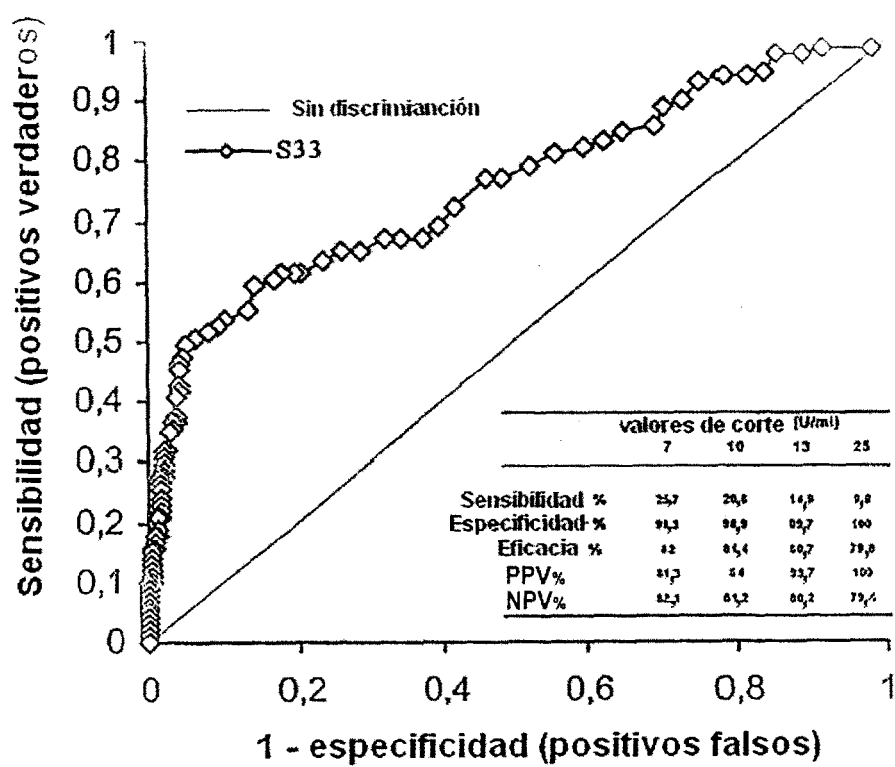
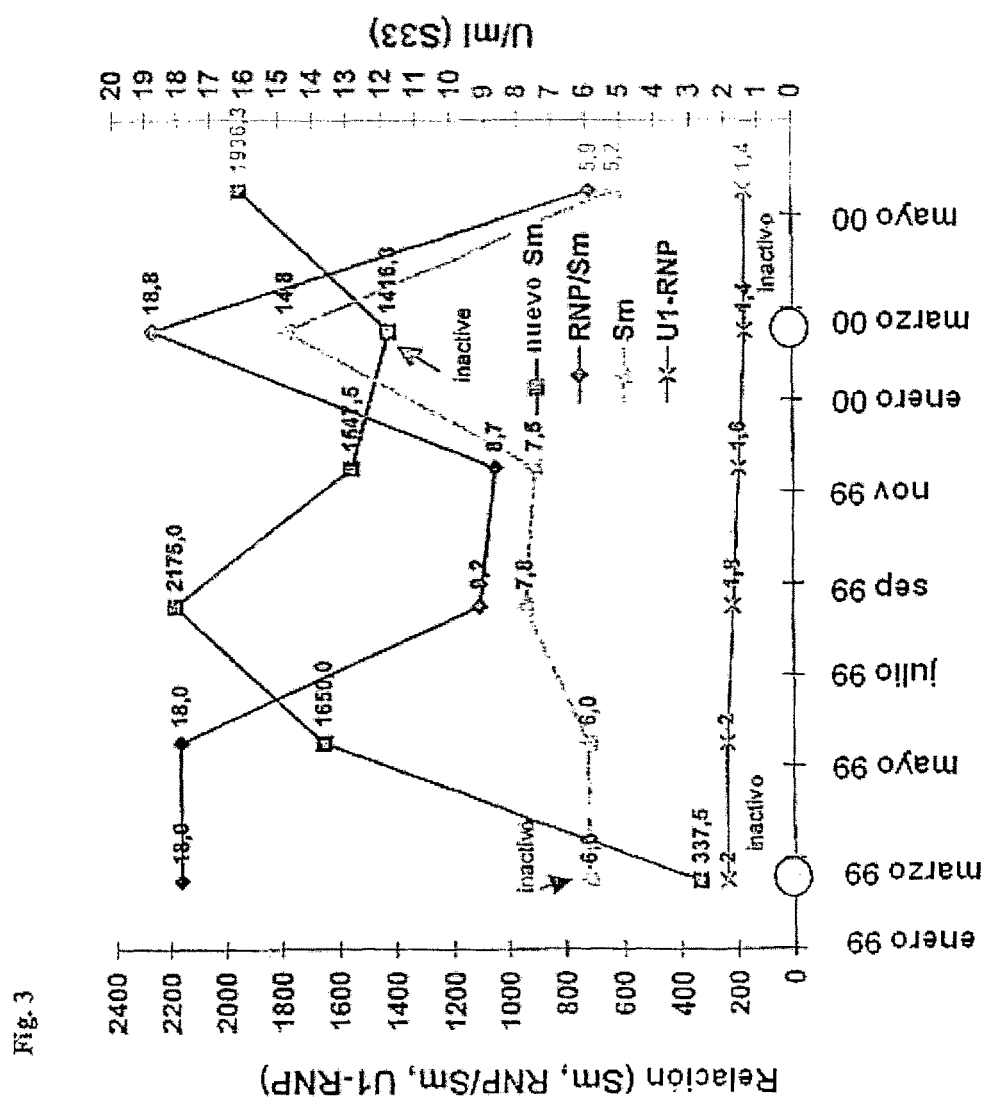


Fig. 2c





ES 2 295 847 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Pharmacia Diagnostics AB
 5 <120> Procedimiento analítico y su kit
 <130> P06663EP00
 <140> PCT/SE2004/000526
 <141> 02-04-2004
 10 <160> 26
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Péptido sintetizado
 <220>
 <221> MOD__RES
 <222> (5) . . (5)
 25 <223> METILACIÓN, simétrica
 <400> 1
 30 Ala Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe
 1 5 10 15
 <210> 2
 35 <211> B
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 2
 Pro Pro Pro Gly Met Arg Pro Pro
 1 5
 45 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 <220>
 55 <221> MOD__RE5
 <222> (3) 7-(3)_
 <223> METILACIÓN, simétrica
 60 <220>
 <221> MOD__RES
 <222> (5)...(5)
 65 <223> METILACIÓN, simétrica
 <220>
 <221> MOD__RES

ES 2 295 847 T3

<222> (7).._(7)
 <223> METILACIÓN, simétrica
 <220>
 5 <221> MOD RES
 <222> (11).._(11)
 <223> METILACIÓN, simétrica
 10 <400> 3
 Ala Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe
 1 5 10 15
 15 <210> 4
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 25 <400> 4
 Ala Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe
 1 5 10 15
 30 <210> 5
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5
 40 Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg
 1 5
 45 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 <400> 6
 55 Asp Val Glu Pro Lys Val Lys Ser Lys Lys Arg Glu Ala Val Ala
 1 5 10 15
 60 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Péptido sintetizado

ES 2 295 847 T3

<400> 7

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

5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

15

<400> 8

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

20

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

30

<400> 9

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

35

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

45

<400> 10

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

50

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

55

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

60

<400> 11

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

65

ES 2 295 847 T3

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 10 <400> 12
 Glu Ala Val Ala Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
 1 5 10 15
 15 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 25 <400> 13
 Val Ala Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
 1 5 10 15
 30 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 40 <400> 14
 Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
 1 5 10 15
 45 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 55 <400> 15
 Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 60 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 65 <213> Artificial
 <220>

ES 2 295 847 T3

<223> Péptido sintetizado

<400> 16

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

<210> 17

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 17

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

<210> 18

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 18

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

<210> 19

40 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 19

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

<210> 20

55 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

60 <220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 20

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

ES 2 295 847 T3

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 10 <400> 21
 Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe Gln Lys
 1 5 10 15
 15 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 25 <400> 22
 Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe Gln Lys Arg
 1 5 10 15
 30 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 40 <400> 23
 Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe Gln Lys Arg Arg
 1 5 10 15
 45 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 55 <220>
 <221> MOD__RES
 <222> (3)..(3)
 <223> METILACIÓN, SIMÉTRICA
 60 <400> 24
 Ala Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe
 1 5 10 15
 65

ES 2 295 847 T3

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 <220>
 10 <221> MOD__RES
 <222> (7)..(7)
 <223> METILACIÓN, SIMÉTRICA
 15
 <400> 25
 Ala Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe
 1 5 10 15
 20
 <210> 26
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 30 <220>
 <221> MOD__RES
 <222> (11)..(11)
 35 <223> METILACIÓN, SIMÉTRICA
 <400> 26
 Ala Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Met Gly Arg Gly Asn Ile Phe
 1 5 10 15
 40
 45
 50
 55
 60
 65