(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 535 743**

(51) Int. CI.:

G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2012 E 12704564 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2671078**

(54) Título: **Anticuerpos antiproteína carbamilada y el riesgo de padecer artritis**

(30) Prioridad:

02.02.2011 EP 11153046
22.09.2011 EP 11182399

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2015

(73) Titular/es:

ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N. LUMC (100.0%)
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL

(72) Inventor/es:

TROUW, LEENDERT ADRIANUS;
TOES, REINALDUS EVERADUS MARIA;
HUIZINGA, THOMAS WILLEM JOHANNES;
VAN VEELEN, PETRUS ANTONIUS;
CERAMI, ANTHONY y
SHI, JING

(74) Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

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

Anticuerpos antiproteína carbamilada y el riesgo de padecer artritis

Campo técnico de la invención

La invención se refiere a los campos de la modificación postraduccional y la artritis. La invención en particular se refiere a métodos de clasificación de muestras de individuos con base en la detección de proteínas o péptidos modificados en forma posterior a la traducción o anticuerpos específicos para las proteínas o péptidos modificados después de la traducción en una muestra que contiene un fluido corporal del individuo.

Existen más de 100 formas diferentes de artritis. La forma más común es la osteoartritis (enfermedad degenerativa de las articulaciones). La osteoartritis es más comúnmente el resultado de un trauma o de una infección de la articulación, aunque también existen causas que no son fácilmente identificables. Estas últimas se suelen denominar en conjunto como osteoartritis relacionadas con la edad. Otras formas de artritis son, por ejemplo, la artritis reumatoide, la artritis psoriática y enfermedades autoinmunes relacionadas.

La principal dolencia de las personas que tienen artritis es el dolor articular. El dolor es a menudo una constante y puede estar localizado en la articulación afectada. El dolor de la artritis es a menudo el resultado de los daños que se inducen a la articulación o el resultado de la inflamación que se produce alrededor de la articulación. Otras dolencias son el dolor como consecuencia de las distensiones musculares causadas por los movimientos forzados contra la rigidez, el dolor en las articulaciones y la fatiga.

El diagnóstico de los pacientes con dolor asociado a las articulaciones no es fácil ya que las dolencias son habitualmente vagas y pueden ser atribuidas a una variedad de causas diferentes algunas de las cuales no son por artritis. De hecho, muchos pacientes que primero ven a un médico con dolor en las articulaciones, las dolencias asociadas van en remisión y no desarrollan una forma crónica de artritis, mientras que una minoría significativa progresa para desarrollar artritis reumatoide (AR). Está claro que las personas que entran en remisión espontánea no necesitan recibir tratamiento, mientras que los individuos en los que progresa se beneficiarán considerablemente de un tratamiento temprano. Para discriminar entre los grupos respectivos se han desarrollado una serie de pruebas con las que puede hacerse el diagnóstico de la artritis con más certeza. Tales pruebas actualmente implican el cribado de muestras de tejido y/o de muestras de fluidos corporales para detectar la presencia de indicadores de artritis en los mismos. Tales indicadores son, entre otros, la determinación de indicadores de inflamación "crónica" tales como, por ejemplo, ciertas quimoquinas, citoquinas y otros factores de señalización de células inmunes; la determinación de la "acumulación de" células inmunes activas en las articulaciones, y/o la presencia de ciertos factores en la sangre, el más notable de los cuales es el factor reumatoide. Recientemente, las pruebas dirigidas a la detección de la proteína citrulinada o de péptidos o anticuerpos específicos para tal proteína o péptido citrulinados se han convertido en una herramienta útil para tales pruebas. La disponibilidad de estas pruebas ha mejorado en gran medida el diagnóstico de las personas sospechosas de tener una forma de artritis. Estas pruebas también ayudan al médico a dar un pronóstico más preciso del futuro desarrollo de la enfermedad a las personas que sufren de artritis. Sin embargo, a pesar de estos avances, el diagnóstico de la artritis o de las personas de riesgo de padecerla aún deja mucho que desear.

Por ejemplo, en los Países Bajos la recomendación para diagnosticar AR se basa en una puntuación de probabilidad generada por los criterios de ACR/EULAR 2010. Estos criterios combinan características clínicas tales como la participación del tipo y número de articulaciones, la presencia o ausencia de los factores serológicos del factor reumatoide y anticuerpos anti-CCP, la presencia o ausencia de las proteínas de la fase aguda tales como la CRP y la duración de las dolencias. Los pacientes que son diagnosticados con AR de acuerdo con este protocolo, deben tener más de 6 puntos. El hecho de que sólo la implicación clínica y la duración de las dolencias sean suficientes para un diagnóstico positivo indica que la población con artritis es muy heterogénea y a menudo se hace un diagnóstico equivocado.

En los Países Bajos y en otros países, las pruebas para la tipificación de la artritis o el diagnóstico de un individuo en riesgo de desarrollar artritis actualmente incluyen pruebas para la detección de anticuerpos específicos para la proteína o péptido citrulinados en muestras de fluidos corporales de tales pacientes. Estos ensayos han dado lugar a la percepción de que los pacientes con artritis se pueden clasificar con base en la positividad para anticuerpos dirigidos hacia las proteínas citrulinadas (ACPA). La identificación de las ACPA ha tenido un impacto importante en la comprensión de la AR [1]. Se han observado grandes diferencias al comparar pacientes con AR positivos para ACPA vs. los negativos para ACPA con respecto a los factores de riesgo ambientales y genéticos [2], la progresión [3] la remisión [4] y la respuesta al tratamiento [5]. Durante los últimos años se ha logrado una mejor percepción en cuanto a la ocurrencia y etiopatogenia de la AR positiva para ACPA. Sin embargo, mucha menos información está disponible con respecto a la AR negativa para ACPA. En parte, esto se debe a que es relativamente difícil de identificar o incluso formar un subgrupo de estos individuos ya que actualmente no hay buenos ensayos disponibles. Curiosamente, se ha descrito que el tratamiento con rituximab también puede ser beneficioso en pacientes negativos para RF y ACPA [6, 7].

La modificación postraduccional de los residuos de arginina en residuos de citrulina por las enzimas PAD es el paso esencial para generar antígenos para ACPA [1]. En circunstancias fisiológicas este citrulinación es importante en tejidos como el pelo y la piel para generar capas de tejido que no están bien conectadas [8]. También en el núcleo, la citrulinación desempeña un papel en la regulación epigenética [9] y la condensación de la cromatina, que es importante tanto en la traducción [8], como en la defensa del huésped contra patógenos [10]. En condiciones patológicas en las que la muerte celular puede abrumar la capacidad de fagocitosis, la muerte de células necróticas puede liberar PAD en el espacio extracelular, donde las mayores concentraciones de calcio ahora permiten también que otras moléculas huésped sean citrulinadas [8]. Dado que muchas de estas moléculas serán presentadas al sistema inmunológico como no propias, pueden inducir una respuesta de anticuerpos en algunos individuos. La citrulina se parece mucho (Fig. 1) a otro aminoácido modificado en forma postraduccional llamado homocitrulina [11]. La homocitrulina es sólo un átomo de carbono más largo, pero similar en estructura [11]. La homocitrulina se genera a partir de un residuo de lisina tras un ataque de cianato, que existe en el cuerpo en equilibrio con urea. En condiciones fisiológicas la concentración de urea puede ser demasiado baja para permitir una extensa carbamilación (el proceso de cambio de lisina por homocitrulina). En condiciones de insuficiencia renal, se incrementa la concentración de urea y se puede detectar fácilmente la carbamilación. Sin embargo, la mayoría de la carbamilación se lleva a cabo durante la inflamación cuando se libera mieloperoxidasa (MPO) a partir de los neutrófilos [12]. Esta enzima desplaza fuertemente el equilibrio de urea hacia cianato, permitiendo ahora que se produzca más carbamilación [13]. Se ha demostrado recientemente que las proteínas que contienen homocitrulina están presentes en la articulación con AR y que esto puede afectar la activación de las células T y la formación de autoanticuerpos en modelos animales [11, 14]. Aunque muy similar, la carbamilación se diferencia de la citrulinación ya que, además de su diferencia estructural, se modifica la lisina y no la arginina. Por lo tanto, la homocitrulina se localizará, por definición, en otras posiciones en las proteínas que la citrulina. En la presente invención, se encontró que estaban presentes autoanticuerpos contra las proteínas carbamiladas en la artritis y se determinó que la medición de estos anticuerpos es útil en el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de la artritis temprana y la AR.

La invención proporciona ahora un método para clasificar a un individuo que sufre de o que está en riesgo de padecer una forma de artritis, comprendiendo dicho método la determinación de si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende un anticuerpo antiproteína carbamilada (anti-CarP), preferiblemente un anticuerpo antifibrinógeno carbamilado (anti-Ca-Fib), en donde dicha muestra es negativa para anticuerpo antiproteína citrulinada (ACPA) y en donde la detección de dicho anticuerpo anti-CarP clasifica la muestra como una muestra de un individuo que está en alto riesgo de padecer actualmente de, o de estar en riesgo de desarrollar artritis.

Un individuo que sufre de artritis puede ser clasificado con base en los anticuerpos anti-CarP como de bajo o alto riesgo de desarrollar una forma de artritis más severa. Los individuos con artritis que son positivos para anti-CarP tienden a desarrollar una forma más severa de artritis que los individuos negativos para anti-CarP con artritis, por lo menos en un periodo de tiempo determinado. Los individuos positivos para anti-CarP también tienden a progresar hacia formas más severas con mayor rapidez en comparación con los individuos negativos para anti-CarP. El método se utiliza por lo tanto preferiblemente para asignar a un individuo que sufre de una forma de artritis a un grupo con un menor o un mayor riesgo que el riesgo promedio de progresar a una forma más severa o crónica de artritis. En una realización preferida, el individuo sufre de artritis indiferenciada en la presentación. En un aspecto preferido de esta realización, dicha forma más severa o crónica es AR. En otro aspecto preferido de esta realización, dicha forma más severa o crónica es artritis juvenil, preferiblemente artritis idiopática juvenil. En una realización preferida, dicho grupo con un riesgo medio más bajo es un grupo que tiene una incidencia superior al promedio de remisión espontánea de las dolencias por artritis.

La población en riesgo puede ser de individuos sanos, pacientes que sufren de artritis o artralgia no diferenciada, individuos positivos para autoanticuerpos con dolencias en las articulaciones, individuos positivos para autoanticuerpos, miembros de la familia de pacientes con artritis. Artritis idiopática juvenil es el término utilizado para un subconjunto de artritis observado en la infancia, que puede ser transitoria y autolimitante o crónica. Los niños con artritis idiopática juvenil se consideran una población en riesgo, ya que algunos de estos pacientes pueden desarrollar una forma crónica de la artritis.

La presente invención muestra que la detección de anticuerpos anti-CarP es útil en individuos que se presentan con artritis indiferenciada, artralgia, y otras dolencias de las articulaciones, y/o con artritis juvenil. La presencia o ausencia de anticuerpos anti-CarP es predictiva del desarrollo de la AR o artritis persistente en el futuro. Esta capacidad de predicción se observa tanto en individuos negativos para ACPA como positivos para ACPA.

El método se utiliza por lo tanto preferiblemente para predecir si el individuo está en riesgo de desarrollar AR o artritis persistente más tarde en la vida.

Por ejemplo se puede usar fibrinógeno carbamilado humano como un objetivo para anticuerpos anti-CarP. El fibrinógeno carbamilado es reconocido tanto por anticuerpos IgG como IgA anti-CarP. El fibrinógeno intacto, o cualquiera de los péptidos derivados de fibrinógeno carbamilado se pueden utilizar como objetivos en ensayos para detectar anticuerpos anti-CarP. La proteína intacta o cualquiera de los péptidos derivados de fibrinógeno se pueden utilizar directamente en el ensayo o pueden inmovilizarse a través de un grupo de biotina unido que se enlazará a las superficies recubiertas con estreptavidina o se puede utilizar de cualquier otra forma para detectar anticuerpos anti-CarP. En una realización preferida,

se proporciona un método de acuerdo con la invención, en donde el anticuerpo anti-CarP es capaz de enlazar específicamente fibrinógeno carbamilado. En toda la descripción, la abreviatura anticuerpo anti-Ca-Fib se utiliza para indicar dicho anticuerpo capaz de enlazar específicamente fibrinógeno carbamilado.

La progresión de la enfermedad en la artritis, por ejemplo dolencias con dolor progresivo o daño articular progresivo, no es una constante. La progresión puede ser más rápida o más lenta durante un cierto período de tiempo. Cuando en esta invención se hace mención de un riesgo de progresión inferior o superior, este se compara típicamente con el riesgo promedio de progresión en el grupo de individuos que se estudia.

La progresión de las enfermedades es a nivel de grupo establecido cada año, de modo que los datos de seguimiento se pueden analizar usando análisis de medidas repetidas. Sin embargo, a nivel de individuos, un valor positivo para anti-CarP, preferentemente anti-Ca-Fib, es predictivo de desarrollo futuro. Actualmente, varios métodos, incluyendo MRI, ultra sonido y otras técnicas se encuentran disponibles para medir la progresión de la enfermedad en el corto plazo.

Para evaluar si una muestra comprende anticuerpos anti-CarP, preferentemente anti-Ca-Fib, se realiza una prueba para detectar la presencia de los anticuerpos. Tales pruebas pueden incluir, pero no se limitan a, ELISA y/o transferencias tipo Western, usando una/o varias proteínas y/o péptidos carbamilados. Comúnmente, aunque no necesariamente, el resultado obtenido para la muestra se compara con una referencia. La referencia es típicamente el resultado de una prueba similar, y preferiblemente la misma prueba, realizada en uno, o una cantidad de individuos sanos (es decir, que no sabe que sufren de artritis y no se sabe que están en riesgo inmediato de desarrollar artritis). El resultado de la muestra se puede comparar directamente con el resultado de la referencia, o se puede utilizar la referencia para determinar un umbral, por debajo del cual cualquier muestra se debe juzgar como negativa para anticuerpos anti-CarP, preferentemente anti-Ca-Fib, o positivo cuando está por encima del umbral.

La invención describe además un método para pronosticar el desarrollo de la artritis a un individuo que padece dicha artritis, comprendiendo dicho método la determinación de si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende un anticuerpo anti-proteína carbamilada (anti-CarP), y estimar la severidad futura de dicha artritis con base en la detección de dicho anticuerpo anti-CarP en dicha muestra. En una realización preferida, dicho anticuerpo anti-CarP es capaz de enlazar específicamente fibrinógeno carbamilado (anticuerpo anti-Ca-Fib). Esta estimación está normalmente acompañada por un intervalo de tiempo dentro del cual se hace evidente o no la forma o progresión más severa (véase en este documento más arriba).

Una de las ventajas de las clasificaciones como se indica en este documento más arriba es que los grupos de individuos tienen un perfil genético más homogéneo dentro de cada grupo que con otros métodos. Otra ventaja es que los grupos de individuos son más homogéneos en su respuesta al tratamiento (profiláctico). Puesto que se ha demostrado que el tratamiento agresivo temprano es beneficioso [18, 19], la invención describe métodos para el tratamiento de la artritis de un individuo que padece o está en riesgo de padecer la artritis, dicho método comprendiendo un diagnóstico de artritis de dicho individuo en donde dicho diagnóstico comprende un método para la determinación de un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib, en una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo. Preferiblemente, se determinó que dicha muestra contiene un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib. Un tratamiento más riguroso de dicho individuo positivo para anti-CarP o anti-Ca-Fib es beneficioso para el paciente. El tratamiento es típicamente un tratamiento terapéutico suministrado a un paciente que fue diagnosticado con artritis antes de recibir dicho tratamiento. La invención proporciona además un método de tratamiento de un individuo que sufre de artritis con un medicamento y/o tratamiento para la artritis, dicho método caracterizado porque dicho individuo fue diagnosticado con un método de la invención antes de dicho tratamiento. Preferentemente, se diagnosticó que dicho individuo sufría de dicha artritis con un método para la clasificación de los individuos que sufren de artritis de la invención, antes de recibir dicho medicamento y/o tratamiento para la artritis. La invención describe además un método para el tratamiento profiláctico de un individuo en riesgo de desarrollar artritis con un medicamento y/o tratamiento para la artritis, dicho método caracterizado por el hecho de que dicho individuo fue diagnosticado por estar en riesgo de desarrollar dicha artritis con un método para la clasificación de los individuos de la invención, antes de recibir dicho medicamento y/o tratamiento para la artritis. El tratamiento, en este caso, profiláctico, puede también ser suministrado a los individuos que se clasifican en riesgo de desarrollar la enfermedad en un futuro próximo, por lo general dentro de un año de la clasificación. Tales tratamientos profilácticos son capaces de al menos postergar el inicio de la enfermedad y/o reducir la severidad de la enfermedad.

Los métodos para clasificar a los pacientes con artritis o a los individuos en riesgo de desarrollar artritis normalmente implican un gran número de pruebas. Estas pruebas también se pueden combinar con un método de la invención para llegar a una evaluación más precisa de la clasificación. Para este fin, la invención proporciona además, medios y métodos para clasificar adicionalmente a los individuos que sufren de artritis o que se sospecha/están en riesgo de tener artritis. En una realización preferida, se combina un método de la invención con una prueba para anticuerpos anti-proteína citrulinada (ACPA).

La prueba de ACPA se ha utilizado durante bastante tiempo (revisada entre otros en: Venrooij et al. (2002): Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis: The Netherlands Journal of

Medicine Vol 60: páginas 383-388.; y Klareskog L, Ronnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol 2008; 26: 651-75.

Se pueden utilizar muchas proteínas o péptidos citrulinados diferentes en pruebas para detectar anticuerpos anti-proteína citrulinada (ACPA). Se ha utilizado filagrina citrulinada para detectar los así llamados anticuerpos antifilagrina (AFA). En los primeros intentos de encontrar sustratos adecuados para los autoanticuerpos de AR, se desarrollaron una serie de péptidos lineales que contienen un residuo de citrulina. Estos péptidos citrulinados fueron reconocidos específicamente por los autoanticuerpos de AR y, más importante, sus contrapartes que contienen arginina no lo fueron. Sin embargo, la mayoría de los péptidos reaccionaron con sólo 30 a 45% de los sueros de AR, aunque más del 75% de los sueros de AR reaccionaron con al menos uno de un total de nueve péptidos ensayados (Schellekens et al. (1998). J. Clin. Invest. Vol 101: páginas 271-281). Aunque se pueden utilizar péptidos lineales, se ha encontrado que los péptidos cíclicos vuelven las pruebas más sensibles. Las pruebas que incluyen proteína/péptido citrulinado cíclico se denominan típicamente como ensayos de CCP. La prueba CCPL ya era sensible, pero se ha encontrado que una nueva selección de proteínas/péptidos citrulinados cíclicos con propiedades mejoradas de reconocimiento inmunológico ha aumentado la sensibilidad del ensayo de CCP al menos en un 80%. Este último ensayo típicamente se denomina como el ensayo de CCP2. Por lo tanto, en una realización de este aspecto de la invención, el método para la detección de ACPA comprende la detección de la proteína / péptido citrulinado anticíclico en dicha muestra. Preferiblemente, dicho método para detectar ACPA es un ensayo de CCP2 como se describe en: The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis.Pruijn GJ, Wiik A, van Venrooij WJ. Arthritis Res Ther. 2010; 12(1): 203. Epub 2010 Feb 15. Revisado y "A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 y CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis." van Gaalen FA, Visser H, Huizinga TW. Ann Rheum Dis. 2005 Oct. 64(10): 1510-2.

Como es el caso para ACPA, también para un anticuerpo anti-CarP, en principio, se pueden usar muchas proteínas o péptidos carbamilados diferentes en pruebas para detectar anticuerpos antiproteína carbamilada. En una realización preferida, dicha proteína o péptido carbamilado es un péptido cíclico. Una buena fuente de proteínas carbamiladas es el suero carbamilado de ternera fetal. Las proteínas de suero de otras especies, sin embargo, también son adecuadas. Después de la optimización también se pueden utilizar proteínas humanas. Por razones de fondo inevitables no se puede utilizar suero humano en forma carbamilada sin un gran agotamiento de Ig. En una realización preferida, dicha proteína carbamilada es fibrinógeno, preferiblemente fibrinógeno humano.

Un péptido para su uso en un método de la invención, ya sea para la detección de ACPA en general o de anticuerpos anti-CarP o de anticuerpos anti-Ca-Fib, es típicamente un péptido de entre 6-50 aminoácidos. Preferiblemente, dicho péptido es un péptido de entre 12 y 30 aminoácidos, más preferiblemente de entre 18 y 22 aminoácidos, lo más preferible de alrededor de 21 aminoácidos. Los intervalos mencionados incluyen el número mencionado es decir, un intervalo de entre 12 y 30 amino ácidos incluye péptidos de 12 y 30 aminoácidos, respectivamente. El péptido puede o no ser un péptido cíclico dependiendo de la sensibilidad y/o especificidad del péptido lineal comparable. Se pueden generar péptidos circulares en cualquier composición molecular como para generar la naturaleza cíclica. Cualquier método puede ser utilizado para acoplar péptidos y/o proteínas en una forma carbamilada, citrulinada o nativa con placas y/o perlas ya sea por recubrimiento directo o usando un método de recubrimiento de biotina-estreptavidina o cualquier otro método disponible.

En una realización preferida, dicho péptido para su uso en un método de la invención es un péptido derivado de fibrinógeno humano. Dicho péptido comprende preferiblemente un aminoácido contiguo de entre 12 y 30 aminoácidos, más preferiblemente de entre 18 y 22 aminoácidos, lo más preferible de alrededor de 21 aminoácidos presentes en la secuencia de aminoácidos de un cualquiera de fibrinógeno alfa (Figura 14), fibrinógeno beta (Figura 15) o fibrinógeno beta (Figura 16). En una realización más preferida, el péptido es uno cualquiera de los péptidos descritos en la Tabla I, la Tabla II, o en la Tabla III.

La invención describe además, como se indicó aquí anteriormente, un método para clasificar a un individuo que sufre de o que está en riesgo de padecer una forma de artritis comprendiendo dicho método la determinación de si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib, y determinar si dicha muestra comprende anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPA) y clasificar dicho individuo con base en la detección de dicho anticuerpo anti-CarP y/o dicho ACPA.

El anticuerpo anti-CarP, el anticuerpo anti-Ca-Fib, y ACPA pueden ser de cualquier isotipo de inmunoglobulina. El arte típicamente se centra en una o más de las subclases de IgG. En la presente invención, se ha encontrado que el nivel de un anticuerpo anti-CarP, de un anticuerpo anti-Ca-Fib y/o ACPA tanto del subtipo A de Ig (IgA) como del subtipo G de Ig (IgG) en una muestra que comprende el fluido corporal de dicho individuo es predictivo para las medidas de resultado clínicas tales como la destrucción de las articulaciones. También se ha encontrado que mientras que una muestra puede ser negativa para IgG anti-CarP o IgG anti-Ca-Fib, puede ser positiva para IgA anti-CarP o anti-Ca-Fib y viceversa. Por lo tanto, en una realización preferida de un método de la invención, dicho método comprende determinar si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende un anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib del subtipo IgA de Ig o un anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib del subtipo IgG de Ig, o ambos, y en donde la detección de dicho anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib de IgA y/o IgG indica que dicho individuo está sufriendo de o está en riesgo de padecer de artritis. En

una realización preferida, dicho método comprende además determinar si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende ACPA. Como se mencionó aquí anteriormente, un método de la invención es particularmente útil en subdividir el grupo heterogéneo de individuos negativos para ACPA. Usando un método de la invención, este grupo negativo para ACPA se puede dividir en un grupo que es un anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib positivo y que se pueden clasificar como uno que sufre o que tiene riesgo de padecer de artritis, y un grupo de un grupo negativo para anti-CarP y/o anti-Ca-Fib que se clasifica como uno que no sufre de artritis o que no está en riesgo de padecer de artritis. Esta determinación también se puede hacer con base en un individuo. Por lo tanto, un método de la invención preferiblemente comprende además determinar si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPA) y en donde el nivel de dicho ACPA en dicha muestra está por debajo del límite de detección y/o del límite de positividad.

Una muestra de un individuo analizada por la presencia de un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente de isotipo IgA o de isotipo IgG, o ambos, y ACPA puede clasificarse con base en el resultado como una

a) muestra positiva para anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib, negativa para ACPA;
b) muestra positiva para anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib, positiva para ACPA;
c) muestra negativa para anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib, positiva para ACPA y una
d) muestra negativa para anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib, negativa para ACPA.

Los resultados a), b) y c) clasifican la muestra, como una muestra de un individuo que está en alto riesgo de padecer actualmente de o de estar en riesgo de desarrollar artritis. El resultado d) clasifica la muestra como una muestra de un individuo que tiene un bajo riesgo de padecer actualmente o de desarrollar artritis. En el caso de que dicho individuo presente una artritis indiferenciada que clasifica dicha muestra en el grupo d) indica que dicho individuo tiene una alta probabilidad de remisión espontánea. No se espera que tal individuo se beneficie a largo plazo de un tratamiento contra la artritis. La invención proporciona además un método para la tipificación de una muestra que comprende un fluido corporal de un individuo que sufre de artritis indiferenciada, comprendiendo dicho método la determinación de si dicha muestra comprende un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib, y clasificar dicha muestra como derivada de un individuo que tiene una probabilidad más alta que el promedio de remisión espontánea de dicha artritis cuando se determinó que dicha muestra era negativa para dicho anticuerpo anti-CarP, preferiblemente para dicho anticuerpo anti-Ca-Fib, y clasificando dicha muestra como derivada de un individuo que tiene una probabilidad más alta que el promedio de tener o de progresar hasta AR cuando se determinó que dicha muestra era positiva para dicho anticuerpo anti-CarP, preferiblemente dicho anticuerpo anti-Ca-Fib. Se llega típicamente a dicha probabilidad más alta que el promedio por comparación de dicha probabilidad con la probabilidad promedio alcanzada por una cantidad de individuos no seleccionados que presentan la artritis indiferenciada.

En otro aspecto, la invención describe un método para estimar la severidad de la artritis para un individuo que sufre de una forma de artritis que tiene un mayor riesgo de desarrollar una forma más severa de dicha la artritis, comprendiendo dicho método la determinación de si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo seleccionado comprende anticuerpos de proteína que contienen antihomocitrulina (un anticuerpo anti-CarP), preferiblemente anticuerpos de fibrinógeno que contienen antihomocitrulina (un anticuerpo anti-Ca-Fib), y la estimación de la severidad de dicha artritis con base en la detección de dichos anticuerpos anti-CarP, preferiblemente dicho anticuerpo anti-Ca-Fib en dicha muestra.

En aún otro aspecto, la invención describe un método para proporcionar un pronóstico para el desarrollo de la artritis a un individuo que padece dicha artritis, comprendiendo dicho método la determinación de si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib, y estimar la severidad futura de dicha artritis con base en la detección de dicho anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib, en dicha muestra. Dicho método se combina preferiblemente con un método para determinar ACPA en dicha muestra y el resultado combinado de dicha prueba de anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib y dicha prueba ACPA se utiliza para estimar la severidad futura de dicha artritis para dicho individuo.

La muestra que va a ser analizada por la presencia de un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib, y/o ACPA puede ser en principio cualquier tipo de muestra, siempre que contenga fluido corporal del individuo. Típicamente, sin embargo, la muestra es una muestra de fluido corporal. En una realización preferida, dicha muestra que comprende fluido corporal es una muestra de suero o una muestra de líquido sinovial.

La artritis es, como se mencionó anteriormente en este documento, una enfermedad compleja y se han identificado actualmente muchas formas diferentes de artritis. La artritis que padece el individuo o que está en riesgo de padecer es preferiblemente una artritis seleccionada de artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis psoriásica, osteoartritis, polimialgia reumática, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, gota, seudogota, artritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, fibromialgia, enfermedad de Lyme, artritis indiferenciada, artritis no reumatoide o espondiloartropatía. Más preferiblemente, la artritis que está padeciendo el individuo o que está en riesgo de padecer es una artritis seleccionada entre artritis reumatoide, artritis psoriásica, osteoartritis, polimialgia reumática, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, gota, seudogota, artritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, fibromialgia, enfermedad de Lyme, artritis indiferenciada, artritis no reumatoide o espondiloartropatía. Preferiblemente, dicha artritis se selecciona entre artritis

reumatoide, artritis juvenil, más preferiblemente artritis juvenil idiopática, o artritis indiferenciada. Más preferiblemente, dicha artritis se selecciona de artritis reumatoide o artritis indiferenciada.

La invención describe además un método para clasificar la artritis de un individuo que padece una forma de artritis, comprendiendo dicho método la determinación de si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende un anticuerpo antiproteína carbamilada (anti-CarP), preferiblemente un anticuerpo anti-fibrinógeno carbamilado (anti-Ca-Fib). La artritis puede ser clasificada con base en la presencia o ausencia detectada de dicho anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib. Una muestra en la que se detecta dicho anticuerpo anti-CarP, preferiblemente dicho anticuerpo anti-Ca-Fib, es más probable que se derive de un individuo con artritis reumatoide. Por lo tanto, este método se puede usar solo, o en combinación con otro ensayo para AR para evaluar la probabilidad de que dicho individuo padezca de AR. En una realización preferida, dicho ensayo comprende además un ensayo para la presencia de ACPA, preferiblemente un ensayo de CCP2 y/o un ensayo para el factor reumatoide.

La presente invención muestra que los anticuerpos anti-CarP pueden ser detectados en individuos asintomáticos sanos, antes del desarrollo de AR. Por lo tanto, también en la población sana, la detección de anticuerpos anti-CarP es útil para la identificación temprana de los pacientes con riesgo de desarrollar AR o artritis persistente en el futuro. Además, la detección de anticuerpos anti-CarP es útil para identificar a las personas que se beneficiarían de un tratamiento temprano, preferiblemente antes de que cumplan con la clasificación actual para la AR.

En un aspecto adicional, la invención describe un método para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar o de padecer una forma de artritis, y en donde dicho individuo no sabía que padecía, o preferiblemente no padecía de artritis en el momento que se recogió la muestra corporal que comprende fluido corporal, comprendiendo dicho método la determinación de si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende un anticuerpo anti-proteína carbamilada (anti-CarP). En una realización preferida, se proporciona un método de acuerdo con la invención en donde dicho anticuerpo anti-CarP es un anticuerpo anti-fibrinógeno carbamilado (anti-Ca-Fib). Una muestra en la que se detecta dicho anticuerpo anti-CarP, preferiblemente dicho anticuerpo anti-Ca-Fib, es probable que se derive de un individuo que está en riesgo de padecer o de desarrollar artritis, en particular AR en un futuro próximo, en particular en un lapso de 5 años a partir de la fecha de toma de muestras, particularmente en un lapso de tres años, y más particularmente en u lapso de 1,5 años a partir de la fecha de la toma de muestras. Este método se puede usar solo, o en combinación con otro ensayo para AR para evaluar dicho riesgo. En una realización preferida, dicho ensayo adicional comprende un ensayo para determinar la presencia de ACPA, preferiblemente un ensayo de CCP2 y/o un ensayo para el factor reumatoide.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para la detección de anticuerpos anti-CarP, preferiblemente anticuerpos anti-Ca-Fib, en un fluido corporal de un individuo comprendiendo dicho kit un péptido fibrinógeno carbamilado como se describe en la Tabla I, la Tabla II, o la Tabla III. Una proteína o péptido puede ser una proteína o péptido carbamilado como se indica anteriormente en este documento. Un kit puede comprender al menos un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos contiguos de entre 12 y 30 aminoácidos, más preferiblemente de entre 18 y 22 aminoácidos, lo más preferible de alrededor de 21 aminoácidos presente en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de fibrinógeno alfa (Figura 14), fibrinógeno beta (Figura 15) o fibrinógeno beta (Figura 16).

Como también se mencionó anteriormente en este documento, en una realización preferida, dicho kit comprende además un anticuerpo anti-IgG humano y/o un anticuerpo anti-IgA humano. Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-Ig humano comprende una etiqueta que puede ser detectada. Los ejemplos no limitantes de tales etiquetas son una marcación directa con HRP o AP. Alternativamente, dicho kit comprende preferiblemente además otro anticuerpo, en donde dicho anticuerpo es específico para el anticuerpo anti-Ig humana utilizado. En esta realización, dicho otro anticuerpo comprende una etiqueta que puede ser detectada tal como biotina o DIG. Este anidamiento puede, por supuesto, continuar con la etiqueta estando presente sobre el último y/o uno o más anticuerpos (anteriores). En una realización preferida, dicho anticuerpo anti-Ig humano comprende un anticuerpo anti-IgA humano. En una realización más preferida, dicho kit comprende un anticuerpo anti-IgA humano y un anticuerpo anti-IgG humano. El anticuerpo anti-Ig humano como el indicado anteriormente en este documento es típicamente un anticuerpo completo, sin embargo, un fragmento que contiene el sitio de enlazamiento al antígeno está también dentro del uso del término anticuerpo. Del mismo modo, existen actualmente una gran variedad de proteínas o péptidos de enlazamiento diferentes disponibles que se pueden adaptar para unirse específicamente a Ig humana. Tales proteínas o péptidos que se enlazan específicamente con Ig humana son equivalentes de un anticuerpo anti-Ig humano tal como se define en el presente documento. Del mismo modo, los uno o más anticuerpos adicionales en un entorno de anidación pueden ser reemplazados con proteínas y/o péptidos de enlazamiento que se enlazan específicamente al anticuerpo anterior y/o proteína / péptido de enlazamiento en el árbol de anidación.

En una realización particularmente preferida, dicho kit comprende además una proteína o péptido citrulinado. En una realización preferida dicha proteína o péptido es una proteína o péptido citrulinado como se indicó anteriormente en este documento. Como también se mencionó anteriormente en este documento, dicha proteína o péptido citrulinado es preferiblemente una proteína o un péptido cíclico. Preferiblemente, dicho kit comprende un péptido cíclico citrulinado de un ensayo de CCP1 o CCP2. Preferiblemente, dicho kit comprende todos los péptidos cíclicos de un ensayo de CCP, preferiblemente un ensayo de CCP2.

Un método de la invención, como se mencionó anteriormente en la presente invención, preferiblemente se combina con otro ensayo clasificador de artritis. Por lo tanto, en una realización preferida de un método de la invención, dicho método comprende determinar además un factor adicional como un clasificador de artritis para dicho individuo. Preferiblemente, dicho factor adicional comprende la determinación de ACPA, un factor reumatoide, una proteína C reactiva, y/o la velocidad de sedimentación de eritrocitos.

La carbamilación se define aquí como el proceso de proporcionar una proteína o un péptido con una modificación que genera un residuo de homocitrulina. Cuando en este documento se hace referencia a una proteína o péptido carbamilado o colección de los mismos, se hace referencia a dicha proteína o péptido que tiene una modificación de homocitrulina, o una colección de proteínas o péptidos que tienen modificaciones de homocitrulina.

La invención describe además un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib, y ACPA para su uso en la determinación de si un individuo padece o está en riesgo de padecer una forma de artritis. La invención describe además un anticuerpo anti-CarP, preferiblemente un anticuerpo anti-Ca-Fib, y ACPA para su uso en la clasificación de la artritis. Dicha determinación y/o clasificación es una determinación o clasificación como se indica en este documento más arriba.

La invención proporciona además un método para determinar si un individuo que sufre de una forma de artritis tiene un mayor riesgo de desarrollar una forma más severa de dicha artritis, comprendiendo dicho método la selección de un individuo que sufre de artritis, pero que no tiene la forma más severa de la artritis y determinar si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo seleccionado comprende un anticuerpo anti-proteína carbamilada (un anticuerpo anti-CarP), en donde la detección de dicho anticuerpo anti-CarP indica que dicho individuo tiene un mayor riesgo de desarrollar una forma más severa de dicha la artritis. En una realización preferida, se proporciona un método de acuerdo con la invención, en donde dicho anticuerpo anti-CarP es un anticuerpo anti-fibrinógeno carbamilado (un anticuerpo anti-Ca-Fib).

Cuando en este documento se hace referencia a la detección, determinación u otra evaluación de un anticuerpo anti-CarP, un anticuerpo anti-Ca-Fib o un ACPA, dicha referencia incluye que se detecta, determinar o evalúa de otra forma más de un anticuerpo anti-CarP, anticuerpo anti-Ca-Fib y/o más de un ACPA. Un anticuerpo anti-CarP o anti-Ca-Fib puede reconocer una modificación de homocitrulina en sí o, más típicamente, reconocer dicha modificación en el contexto de uno o más de los aminoácidos de la proteína o péptido en la proximidad inmediata de la modificación de homocitrulina. Un método o kit de la invención es más precisa cuando se detectan, determinan o bien se evalúan anticuerpos anti-CarP y/o anticuerpos anti-Ca-Fib de más de una especificidad. Un método de la invención comprende por lo tanto preferiblemente la determinación de dos o más, y preferiblemente tres o más, más preferiblemente 5 o más, más preferiblemente al menos 7 anticuerpos anti-CarP y/o anti-Ca-Fib en dicha muestra. Del mismo modo, un kit de la invención comprende preferiblemente dos o más, y preferiblemente tres o más, más preferiblemente 5 o más, más preferiblemente al menos 7 proteínas y/o péptidos carbamilados, preferiblemente fibrinógeno y/o péptidos derivados de fibrinógeno.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1
Desarrollo de un ensayo novedoso y específico para la detección de anticuerpos anti-CarP.

(A) Curvas de respuesta a la dosis del estándar positivo para el anticuerpo anti-CarP en FCS carbamilado y FCS nativo en ELISA. (B) Estudios de inhibición donde el enlazamiento del anticuerpo anti-CarP con placas de ELISA recubiertas con Ca-FCS fue inhibida mediante incubaciones previas con inhibidores de fase fluida como se indica. Sólo Ca-FCS inhibió el enlazamiento de anticuerpos anti-CarP. (C) Tinción de Coomassie que muestra la igualdad de carga de Ca-FCS y FCS, y transferencia tipo Western que muestra una tinción positiva de sendas cargadas con Ca-FCS y sendas no cargadas con FCS por medio de una muestra de suero de una muestra positiva para anti-CarP y no por medio de una muestra negativa.

Figura 2
Anticuerpos IgG e IgA anti-CarP están presentes en sueros de AR.

Se realizó un ELISA para la detección de IgG e IgA anti-CarP en conjuntos de sueros de controles sanos y pacientes con AR. Se estableció un límite utilizando la media más 2 veces la desviación estándar de los controles sanos. Se muestra el título expresado en unidades arbitrarias por ml después del cálculo basado en la curva estándar. Debajo del gráfico se indican tanto el número de muestras analizadas como el porcentaje de positividad.

Figura 3
Los anticuerpos anti-CarP y ACPA son dos sistemas separados de autoanticuerpos en un gráfico circular que muestran los porcentajes de pacientes con AR pos y negativos para anticuerpos ACPA y/o anti-CarP.

Figura 4

Los anticuerpos IgA anti-CarP están asociados con la conversión de artritis indiferenciada (AI) en AR.

Se midieron los sueros de los pacientes que presentaron AI al inicio del estudio para detectar anticuerpos IgG e IgA anti-CarP y se analizó su conversión hacia la AR a 1 año del seguimiento. Los datos mostrados se dividen también con base en la positividad de ACPA. Los anticuerpos IgA anti-CarP se asocian fuertemente con el desarrollo de la AR a partir de una población con AI.

Figura 5
Los anticuerpos IgA anti-CarP están asociados con una progresión radiológica más severa en AR.

Se analizaron el grado y el ritmo de destrucción de las articulaciones en los pacientes con AR divididos con base en la positividad para los anticuerpos ACPA y anti-CarP. La positividad para los anticuerpos IgA anti-CarP se asocia con un daño radiológico más severo tanto en los pacientes con AR positivos para ACPA y negativos para ACPA.

Figura 6
Ilustración de citrulinación y carbamilación.

La citrulinación y la carbamilación ocurren en diferentes aminoácidos a través de diferentes mecanismos, pero producen productos finales similares.

Figura 7
Los anticuerpos contra las proteínas carbamiladas están presentes en los sueros de pacientes con AR. Se representa la reactividad de IgG (A, B) e IgA (D, E) a partir de sueros de controles sanos (NHS) o pacientes con AR (AR) con los pozos recubiertos con FCS no modificado (FCS) o FCS carbamilado (Ca-FCS). Datos expresados como absorbancia a 415 nm. Las unidades de absorbancia de FCS (C, F) se restaron de las unidades de absorbancia de Ca-FCS, que representa la respuesta específica de la proteína anti-carbamilada.

Figura 8
Se representan anticuerpos anti-CarP y ACPA son dos sistemas separados de autoanticuerpos. (A) Reactividad de IgG de 76 sueros de pacientes con AR, hacia varias formas de un péptido Fib. (B, C) Se representa que el enlazamiento del anticuerpo Ca-FCS o Ci-FCS fue inhibido utilizando incubaciones previas con inhibidores de fase fluida. (D) FCS, Ca-FCS y Ci-FCS fueron separados a través de geles de SDS-PAGE y transferidos. La presencia de anticuerpos reactivos con proteínas en las transferencias se analizó mediante incubación de estas transferencias, ya sea con sueros negativos para positivos para Anti-CarP o con sueros positivos para ACPA negativos para Anti-CarP.

Figura 9
Anticuerpos anti-CarP se enlazan con Ca-Fib a través de dominios variables.

(A) Se analizó la reactividad de IgG contra Fib, Ci-Fib y Ca-Fib de 54 controles sanos y 214 pacientes con AR mediante ELISA. (B) Se confirmó la especificidad de la reactividad anti-Ca-Fib mediante estudios de inhibición. Se expone una muestra, donde los datos se expresan con relación a la inhibición con PBS. (C) La naturaleza molecular de IgG y F(ab')2 purificados se confirmó mediante gel de SDS PAGE teñido con Coomassie. (D) Se generaron fragmentos de F(ab')2 a partir de IgG purificada de 2 pacientes positivos para anti-CarP y 2 controles negativos. Sólo F(ab')2 de los pacientes reaccionó con Ci-Fib y Ca-Fib. (E) Los experimentos de inhibición confirman que F(ab')2 tampoco son necesariamente de reacción cruzada entre Ci-Fib y Ca-Fib.

Figura 10
Los anticuerpos IgG e IgA anti-CarP están presentes en sueros de AR.

(A,B) Curvas de respuesta a la dosis del estándar positivo para anticuerpo anti-CarP (IgG e IgA) en Ca-FCS y FCS en ELISA. (C, D) Se realizó un ELISA para la detección de IgG e IgA anti-CarP en sueros de controles sanos (NHS) y de pacientes con AR. Se estableció un límite utilizando la media más 2 veces la desviación estándar de los controles sanos como se describe en los métodos. La reactividad se representa como unidades arbitrarias por mL. El número de muestras analizadas y el % de positividad se indican debajo del gráfico. (E, F) Gráficos circulares que muestran el % de los pacientes con AR positivos y negativos para los anticuerpos anti-CCP2 y/o anti-CarP. (G, H) Gráficos circulares que muestran el% de los pacientes positivos para IgG o IgA anti-CarP negativos para anti-CCP2.

Figura 11
Los anticuerpos IgG anti-CarP se asocian con una progresión radiológica más severa en AR negativa para ACPA.

El grado y el ritmo de destrucción de las articulaciones se analizaron en todos los pacientes con AR incluidos o analizados por separado para los subgrupos negativos para ACPA o positivos para ACPA (Fig. 13). La severidad de la destrucción de las articulaciones se representa como la media de la puntuación de Sharp / van der Heijde (SHS) en el eje Y y los años de

seguimiento en el eje X. Debajo del eje X se enlista el número de pacientes para cada instante de tiempo. Se muestra la progresión radiológica para los pacientes con AR negativos para anti-CCP2. El valor P se deriva del modelo de análisis como se describe en la sección de métodos.

Figura 12
Los anticuerpos IgG anti-CarP están asociados con la conversión desde antes de la enfermedad hasta AR.

(A) Se midieron los sueros de los pacientes que se presentaron con artritis indiferenciada (AI) al inicio del estudio para determinar los anticuerpos IgG anti-CarP y se analizó su conversión hacia la AR al año de seguimiento. Los datos mostrados se dividen también con base en la positividad de ACPA. Los anticuerpos anti-CarP se asocian fuertemente con el desarrollo de AR a partir de una población con AI. (B) También en sueros de pacientes que se presentaron con artralgia al inicio del estudio, los anticuerpos anti-CarP son predictivos para el desarrollo de AR. (C) Los sueros de personas sanas que no desarrollan la AR o que no desarrollan RA más tarde en la vida se comparan para la positividad por anti-CarP. La presencia de anti-CarP se asocia con el desarrollo futuro de AR.

Figura 13
Los anticuerpos IgA anti-CarP están asociados con la progresión radiológica más severa en AR.

El grado y el ritmo de destrucción de las articulaciones se analizaron en los pacientes con AR separados en función de la positividad para los anticuerpos ACPA y anti-CarP. La positividad para anticuerpos IgG anti-CarP se asocia con un daño radiológico más severo en los pacientes con AR negativos para ACPA.

Figura 14
Secuencia de Aminoácidos de fibrinógeno alfa

Figura 15
Secuencia de Aminoácidos de fibrinógeno beta

Figura 16
Secuencia de Aminoácidos de fibrinógeno gamma

Figura 17
Los anticuerpos anti-CarP están presentes en sueros de pacientes que padecen artritis juvenil.

Se realizó un ELISA para la detección de IgG anti-CarP en sueros de niños sanos (Ctr) y en sueros de pacientes que padecen de artritis juvenil. Se estableció un límite utilizando la media más 2 veces la desviación estándar de los controles sanos como se describe en los métodos. La reactividad se representa como unidades arbitrarias por mL. El número de muestras analizadas y el % de positividad se indican debajo del gráfico.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Generación de antígenos

Como fuente de antígenos se utilizó suero de ternera fetal (FCS) (Bodinco, lote No, 212-192909). Este era carbamilado, citrulinado o empleado como una fuente sin modificar.

Se generó FCS carbamilado (Ca-FCS) mediante la dilución de FCS en bidestilada hasta 4 mg/ml. Se añadió cianato de potasio (Sigma, cat. No., 215074) hasta 80 mg/ml. Después de la incubación a 37°C durante 12 horas, se dializó extensamente la muestra contra agua bidestilada.

Como control también se generó FCS citrulinado (Ci-FCS); para este propósito se incubaron 50 µl FCS (24 mg / ml) con 24 µl de Tris-HCl 0,5 M pH7,6 + 15 µl de $CaCl_2$ 0,125 M + 31 µl de PAD4 (Sigma P1584) durante 24 horas a 37°C.

Detección de anticuerpos anti-CarP por ELISA

Se usaron 50 µl de FCS no modificado y Ca-FCS a razón de 10 µg/ml (diluido en pH 9,6, regulador de carbonato-bicarbonato 0,1 M) para recubrir inmunoplacas Nunc (Thermo Scientific, cat. No. 430341), durante la noche a 4°C. Tras el lavado 4 veces en solución salina regulada de fosfato (PBS) que contenía 0,05% de Tween (Sigma, cat. No. 27, 434-8) (PT), se bloquearon las placas mediante la incubación de 100 µl de PBS / 1% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, cat.

No. A2153) durante 1 hora a 37°C. Tras el lavado adicional se incubaron los sueros en 50 µl en una relación 1/50 (en PBS / 0,05% de Tween / 1% de regulador BSA (PTB)) tanto para pozos recubiertos con FCS y Ca-FCS y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se incubaron diluciones en serie de un suero estándar (diluido en PTB) en pozos recubiertos con Ca-FCS. Tras el lavado, se detectó la IgG o IgA humana enlazada mediante la incubación de los pozos con 50 µl de anticuerpo anti IgG humano de conejo diluidos 1/5000 (en PTB) (Dako, cat. No. A0423) o anticuerpo anti-IgA humano de conejo diluido 1/1000 (en PTB) (Dako, cat. No. A0262) incubando a 37°C durante 1 hora. Después del lavado, se incubaron los pozos a 37°C durante 1 hora con 50 µl de anticuerpo marcado con HRP anti-IgG de conejo de cabra diluido 1/2000 (en PTB) (Dako, cat. No. P0448). Después de los últimos lavados, se visualizó la actividad de la enzima HRP mediante incubación de 50 µl de la sal de diamonio de 2,2'-Azino-bis-(ácido 3-etilbenzo-tiazol-6-sulfónico) (ABTS) y H_2O_2, midiendo la absorbancia a 415 nm en un lector estándar de ELISA.

Detección de anticuerpos anti-CarP por transferencias tipo Western

Se cargaron tanto FCS como Ca-FCS en geles de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS) regulares al 10% y se transfirieron a membranas Hybond-C Extra (Amersham, Diegem, Bélgica). Se incubaron luego las transferencias en regulador de bloqueo (3% de leche ELK / PBS / 0,05% de Tween) 1 h a TA, después de lavado con PBS / 0,05% de Tween. Se incubaron posteriormente las transferencias con 5 ml de suero diluido 1:500 en regulador de bloqueo durante 1 hora a TA. Después de tres lavados con PBS / 0,05% de Tween, se incubaron las transferencias con 3 ml de anti-IgG humana de conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (DAKO, Heverlee, Bélgica) diluidas 1:50000 en regulador de bloqueo durante 1 h a TA. A continuación, se lavaron las transferencias y se visualizaron los anticuerpos enlazados usando quimioluminiscencia mejorada (ECL; Amersham). Se verificó una carga igual de proteína utilizando azul brillante de Coomassie (Bio-Rad, Veenendaal, Países Bajos).

Sueros y fluidos sinoviales

Los sueros analizados eran de pacientes que participan en el grupo clínico de artritis temprana de Leiden (EAC). El EAC de Leiden es un grupo de inicio de pacientes con artritis de reciente comienzo (duración de los síntomas < 2 años) que se inició en el Departamento de Reumatología del Centro Médico de la Universidad de Leiden en 1993 [15]. Todos los pacientes con AR cumplen con los criterios del Colegio Americano de Reumatología (anteriormente la Asociación Americana de Reumatismo) revisados en 1987 para la clasificación de la AR [16] dentro de 1 año de seguimiento (grupo de EAC). Se analizaron un total de 1.007 pacientes de los cuales 582 fueron diagnosticados con AR y 425 con AI como de los cuales 151 desarrollaron AR en el seguimiento. Estas muestras de pacientes se compararon con 280 muestras de control sanas también derivadas de la zona de Leiden. También se analizó un grupo adicional emparejado de suero / fluido sinovial de pacientes con AR. Los protocolos fueron aprobados por el comité de ética local pertinente y todos los participantes dieron su consentimiento informado.

ELISA para la detección de ACPA

Se midió la IgG total anti-CCP2, como una medida de ACPA, en sueros recogidos al inicio del estudio mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Immunoscan RA Mark 2; Eurodiagnostica, Arnhem, Países Bajos). Las muestras con un valor superior a 25 unidades/ml se consideraron positivas según las instrucciones del fabricante. Los individuos con anticuerpos contra CCP2 se consideraron positivos para ACPA.

ELISA para la detección de anticuerpos anti-Ca-Fib.

Se recubrieron Fib y Ca-Fib no modificados a razón de 20 µg/ml en 50 µl (diluido en PBS pH 9,0) en placas Nunc Maxisorp DN. Después del lavado en PBS-Tween, se bloquearon las placas mediante la incubación de 200µl pH 9,0 PBS / 2% de BSA durante 2 horas a 4°C. Tras el lavado adicional, se incubaron los pozos con 50µl de suero a una dilución 1/50 en regulador RIA (Tris 10 mM pH 7,6; NaCl 350 mM; 1% de Triton X; 0,5% de desoxicolato de Na; 0,1% de SDS) (Sigma) sobre hielo durante 3 h. Todas las incubaciones posteriores se realizaron en regulador RIA. Como estándar, se utilizaron diluciones seriadas de una combinación de sueros positivos. Se detectó la IgG humana utilizando anticuerpo anti-IgG humano de conejo marcado con HRP (DAKO) incubado sobre hielo durante 2 h. Después de los últimos lavados, se visualizó la actividad de la enzima HRP usando ABTS. Se transformó la absorbancia en Fib y Ca-Fib en aU/ml. Se estableció el límite para una respuesta positiva como la media más 2 x la desviación estándar de la reactividad específica anti-CarP de los controles sanos.

Se analizaron 67 sueros de niños sanos y 110 sueros de pacientes que padecen de artritis juvenil.

Estadística

Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) 17.0 mediante regresión logística. Se consideraron los valores P inferiores a 0,05 que son estadísticamente significativos.

Ejemplo 2

Materiales y métodos

Pacientes y sueros de control.

El sueros analizados eran de pacientes que participan en el grupo clínico de artritis temprana de Leiden (EAC). El EAC de Leiden es un grupo de inicio de pacientes con artritis de reciente comienzo (duración de los síntomas < 2 años) que se inició en el Departamento de Reumatología del Centro Médico de la Universidad de Leiden en 1993 (42). Todos los pacientes con AR cumplen con los criterios del Colegio Americano de Reumatología (anteriormente la Asociación Americana de Reumatismo) revisados en 1987 para la clasificación de la AR (43) dentro de 1 año de seguimiento. Se involucraron un total de 571 pacientes con AR en el análisis. Las muestras de los pacientes se compararon con 305 muestras de control sanas que viven también en la zona de Leiden. Los protocolos fueron aprobados por el comité de ética local pertinente y todos los participantes dieron su consentimiento informado.

Detección de anticuerpos anti-CarP por ELISA.

En resumen, se recubrieron placas Nunc Maxisorp (Thermo Scientific) con FCS no modificado y FCS modificado, durante la noche. Después de los lavados y del bloqueo, se incubaron los pozos con suero. Se detectó IgG o IgA humana enlazada utilizando anticuerpos anti-IgG o anti-IgA humanos de conejo (Dako). Seguido por anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra marcado con HRP (Dako). Después de los últimos lavados se visualizó la actividad de la enzima HRP usando ABTS (44). Una descripción más detallada de las modificaciones de las proteínas y ensayos ELISA basados en FCS y Fib, incluyendo F(ab)2, está disponible en línea (SI-materiales y métodos). Se estableció el límite para una respuesta positiva como la media más 2 x la desviación estándar de la reactividad anti-CarP específica de los controles sanos. Los métodos para la detección de ACPA y transferencias tipo Western se encuentran disponibles en línea (SI-materiales y métodos).

ELISA para péptidos Fib.

Se recubrió estreptavidina (Invitrogen) a razón de 2 µg/ml en 100 µl en placas Nunc a 4°C DN. Después del lavado, se incubaron los péptidos Fib que contenían ya sea una arginina, citrulina, homocitrulina o una lisina (Fig. 8A) (45) a razón de 10 µg/ml en 100 µl de PTB durante 1 h a TA. A continuación, se detectó la reactividad de anticuerpos reactivos a estos antígenos como se describió anteriormente.

Estudios de inhibición.

Para determinar si los anticuerpos anti-CarP y ACPA son anticuerpos de reacción cruzada, se realizaron estudios de inhibición en los que se incubaron previamente las muestras de suero positivas para autoanticuerpos, positivas tanto para los anticuerpos ACPA y como anti-CarP, con concentraciones crecientes ya sea de FCS no modificado, Ca-FCS, Ci-FCS o bien la forma que contenía citrulina o arginina del péptido CCP1 (46). Después de incubación previa a temperatura ambiente (TA), se analizaron las muestras para determinar la reactividad contra Ca-FCS y Ci-FCS como se describió anteriormente. Se incubaron previamente muestras de suero y F(ab')2 positivas tanto para Ci-Fib como para Ca-Fib con Fib, Ci-Fib y Ca-Fib a 4°C DN y posteriormente se analizaron en los ELISA para Fib (SI-materiales y métodos).

Progreso radiológico.

En el grupo de EAC, se evaluaron las radiografías de las manos y los pies, que habían sido obtenidas de manera longitudinal, de acuerdo con el método de Sharp / van der Heijde (47). La evaluación y el análisis han sido descritos en detalle más arriba (24). Los datos se analizan directamente, o usando análisis de mediciones repetidas para hacer utilización óptima de los datos longitudinales obtenidos para cada paciente (24). Información más detallada está disponible en línea (SI-materiales y métodos).

Generación de antígenos.

Como no sabíamos si los anticuerpos contra las proteínas carbamiladas estarían presentes en sueros de pacientes con AR, o que proteínas reconocerían, nos propusimos estudiar un conjunto diverso de proteínas carbamiladas, para maximizar las posibilidades de detectar la mayoría de las reactividades anti-CarP. Para ello hemos utilizado suero de ternera fetal (FCS) (Bodinco) que se carbamiló, citrulinó o se dejó sin tratar. Para la generación de FCS carbamilado (Ca-FCS), se diluyó FCS en H_2O hasta 4 mg/ml y se añadió cianato de potasio (Sigma) hasta una concentración de 1 M. Después de incubación a 37°C durante 12 h, se dializó extensamente la muestra contra H_2O. Se generó fibrinógeno carbamilado (Ca-Fib) mediante la incubación de 5 mg/ml de fibrinógeno (Fib) con cianato de potasio 0,5 M a 4°C durante 3 días seguido de una gran dializada contra PBS. Se generaron FCS citrulinado (Ci-FCS) y fibrinógeno citrulinado (Ci-Fib) mediante la incubación de 10 mg de FCS o Fib en un volumen de 1 ml que contenía Tris-HCl 0,1 M pH7,6, $CaCl_2$ 0,015 M y PAD4 40 U (Sigma) durante 24 horas a 37°C. Se confirmó la presencia de residuos de citrulina y homocitrulina mediante el análisis por espectrometría de masas.

Para Fib se observó, en los segmentos de proteína que se analizaron, una extensa citrulinación y carbamilación completa.

Detección de anticuerpos anti-CarP por ELISA.

Se recubrieron FCS no modificado y FCS modificado a razón de 10 µg/ml en 50 µl (diluido en regulador de carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6) (CB) en placas Nunc Maxisorp (Thermo Scientific), durante la noche (DN). Después del lavado en PBS que contenía 0,05% de Tween (Sigma) (PT), se bloquearon las placas mediante la incubación de 100 µl de PBS / 1% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) durante 6 horas a 4ºC. Tras el lavado adicional, se incubaron los pozos con 50 µl de suero con una dilución 1/50 en PBS / 0,05% de Tween / 1% de regulador BSA (PTB) sobre hielo durante la noche. Todas las incubaciones posteriores se realizaron en PTB. Como estándar, se utilizaron diluciones seriadas de una combinación de sueros positivos. Se detectó IgG o IgA humana utilizando anticuerpo anti-IgG humano de conejo (DAKO) o anticuerpo anti-IgA humano de conejo (Dako) incubado sobre hielo durante 3,5 h. Después del lavado, se incubaron los pozos en hielo durante 3,5 h con anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra marcado con HRP (Dako). Después de los últimos lavados, se visualizó la actividad de la enzima HRP usando ABTS como se describió anteriormente (25). Se usaron sueros de sujetos sanos (n = 305) como controles. Se transformó la absorbancia tanto de Ca-FCS como de FCS en aU/mL y se restó la señal de fondo (aU/mL) de FCS de la señal (aU/mL) de Ca-FCS para analizar la reactividad específica de anti-CarP (Fig. 7). Hemos establecido el límite para una respuesta positiva como la media más 2 veces la desviación estándar de la reactividad específica anti-CarP de los controles sanos.

ELISA para el fibrinógeno.

Se recubrieron Fib Ci-Fib y Ca-Fib no modificados a razón de 20 µg/ml en 50 µl (diluido en PBS pH 9,0) en placas Nunc Maxisorp DN. Después del lavado en PT, se bloquearon las placas mediante la incubación de 200 µl de PBS pH 9,0 / 2% de BSA durante 2 horas a 4ºC. Tras el lavado adicional, se incubaron los pozos con 50 µl de suero con una dilución 1/50 en regulador RIA (Tris 10 mM pH 7,6; NaCl 350 mM; 1% de Triton X; 0,5% de desoxicolato de Na; 0,1% de SDS) (Sigma) sobre hielo durante 3 h. Todas las incubaciones posteriores se realizaron en regulador RIA. Como estándar, se utilizaron diluciones seriadas de una combinación de sueros positivos. Se detectó IgG humana utilizando anticuerpo anti-IgG humana de conejo marcado con HRP (DAKO) incubada sobre hielo durante 2 h. Después de los últimos lavados, se visualizó la actividad de la enzima HRP usando ABTS. Se analizaron los sueros de 214 pacientes con AR y 54 sujetos sanos como controles. Se transformó la absorbancia tanto de Fib Ci-Fib como de Ca-Fib en aU/mL. Se estableció el límite para una respuesta positiva como la media más 2 veces la desviación estándar de la reactividad específica anti-CarP de los controles sanos. Estos ensayos se repitieron tres veces mostrando los mismos datos.

Preparación de F(ab')2.

Se aisló el IgG total de 2 sueros anti-CarP positivos y 2 sueros de control a través de una columna HP de proteína A HiTrap^{MR} (GE Healthcare) siguiendo el protocolo para la columna proporcionado por el fabricante. Se generaron fragmentos de F(ab')2 a partir de muestras de IgG purificadas usando un kit de preparación de F(ab')2 (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se verificó la naturaleza molecular de la IgG intacta y el F(ab')2 usando geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Estos F(ab')2 se utilizaron en ELISA como se describió anteriormente, usando ahora ya sea anticuerpo anti-IgG, IgA, IgM humano kappa, lambda de conejo marcado con HRP (anti-cadena ligera) (Dako) o anti-IgG humano de conejo marcado con HRP (Dako).

Detección de ACPA por ELISA.

ACPA se midieron mediante ELISA para CCP2 (Immunoscan RA Mark 2; Eurodiagnostica, Arnhem, Países Bajos). Las muestras con un valor superior a 25 unidades/ml se consideraron positivas según las instrucciones del fabricante. Un pequeño porcentaje de los pacientes con AR positivos para ACPA puede estar fuera de la reactividad anti-CCP2, y por lo tanto, ambos términos se utilizarán para indicar explícitamente lo que se ha utilizado en nuestros análisis.

La reactividad de ACPA hacia Ci-FCS se detectó utilizando placas de ELISA que estaban recubiertas con Ci-FCS (50 µl/pozo de 10 µg/ml) diluido con CB en las placas Nunc Maxisorp DN a 4ºC. Las placas se lavaron en PT seguido de bloqueo con 100 µl de solución de PBS/1% de BSA a 37ºC durante 1 h. Después del lavado, los sueros se incubaron con una dilución 1/50 en 50 µl de PTB y se incubaron a 37ºC durante 1 h. Después del lavado, se detectaron IgA e IgG humanas como se describió anteriormente.

Detección de anticuerpos anti-CarP por transferencias tipo Western.

Se cargaron FCS, Ca-FCS y Ci-FCS en geles de poliacrilamida - dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y se transfirieron a membranas Hybond-C Extra (Amersham). Se incubaron las transferencias en regulador de bloqueo (3% de leche ELK / PBS / 0,05% de Tween) durante 1 h a TA, después de lavar con PT. Se incubaron posteriormente las transferencias con 2,5 ml de suero diluido 1:500 en regulador de bloqueo durante 1,5 h a TA. Los sueros eran o bien positivos para ACPA, negativos para anti-CarP o negativos para ACPA positivos para anti-CarP, de acuerdo a lo determinado por ELISA. Después de tres

lavados con PT, se incubaron las transferencias con 5 mL de anti-IgG humano de conejo marcado con HRP diluido en regulador de bloqueo durante 1 h a TA. A continuación, se lavaron las transferencias y se visualizaron los anticuerpos enlazados usando quimioluminiscencia mejorada (Amersham).

Estadísticas de la progresión radiológica.

La asociación entre la positividad de anticuerpos anti-CarP y la progresión radiográfica se analizó mediante el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) 17.0 como se describió anteriormente. Los valores P por debajo de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizó un análisis de regresión normal multivariante para datos longitudinales con puntuación radiológica como variable de respuesta. Este método analiza mediciones repetidas de una vez y toma ventaja de la correlación entre estas mediciones, lo que resulta en un error estándar más preciso. Las puntuaciones radiológicas fueron transformadas mediante logaritmo para obtener una distribución normal. La tasa de destrucción de las articulaciones con el tiempo fue analizada mediante una interacción de tiempo con anti-CarP. Se supuso que el efecto del tiempo a ser lineal en el lapso de la interacción. El efecto del tiempo se introdujo también como factor en el modelo, permitiendo un perfil de respuesta medio con el tiempo. La edad, el género y el período de inclusión como elementos de tratamiento, se incluyeron como variables de corrección en todos los análisis. En un análisis por separado se corrigió el efecto de los anticuerpos anti-CarP por el efecto de anti-CCP y RF.

Ejemplo 1

Resultados

Detección de anticuerpos anti-CarP.

Se generó un nuevo ELISA para detectar anticuerpos anti-CarP a partir de suero y del fluido sinovial usando placas recubiertas con FCS carbamilado, generado in vitro. Se generó un estándar a partir de una combinación de sueros positivos que muestra un enlazamiento que depende de la dosis tanto de IgG como de IgA con FCS carbamilado (Ca-FCS) y sin enlazamiento con FCS nativo (Figura 1A). Ya que la homocitrulina y la citrulina son residuos muy similares, pero difieren entre sí por un átomo, hemos querido excluir la posibilidad de que los anticuerpos anti-CarP fueran en realidad ACPA. Como una primera prueba para excluir esto, se realizaron estudios de inhibición que muestran que el anticuerpo anti-CarP que se enlaza con Ca-FCS sólo puede ser inhibido por el mismo Ca-FCS y no por FCS citrulinado (Ci-FCS), FCS nativo o por péptidos utilizados para detectar ACPA (Figura 1B) lo que indica que anti-CarP es verdaderamente de una reactividad diferente. También, el enlazamiento de ACPA con placas de CCP2 no fue inhibido por la adición de Ca-FCS (datos no mostrados). Dado que estos métodos se basan en ELISA también deseamos confirmar nuestros hallazgos utilizando transferencias tipo Western. Se corrieron FCS y Ca-FCS en geles no reductores, y después de tiñeron las transferencias tipo Western utilizando sueros de pacientes que eran positivos o negativos para los anticuerpos anti-CarP como se detectó por ELISA. El suero de pacientes positivos para anticuerpos anti-CarP dio positivo en los carriles cargados con Ca- FCS mientras que no se observó reactividad en los carriles cargados con FCS (Figura 1C). Los sueros de pacientes negativos para anticuerpo anti-CarP no mostraron tal coloración. Usando coloración de Coomassie en geles cargados se confirmó que los carriles cargados con FCS contenían cantidades similares de proteína. En conjunto, estos datos indican que ahora hemos generado un nuevo ensayo que puede detectar específicamente anticuerpos anti-CarP, tanto IgG como IgA.

Anticuerpos anti-CarP están presentes en la AR

A partir de la clínica de artritis temprana de Leiden (EAC) hemos utilizado los pacientes que sufren de AI o AR, de acuerdo con los criterios de inclusión de 1987. Además hemos utilizado controles sanos también de la región de Leiden. Se midió la presencia de anticuerpos anti-CarP en pacientes y controles simultáneamente. Valores de DO se calcularon en unidades arbitrarias por mL utilizando un estándar. Utilizamos las personas sanas para calcular el punto límite para la positividad como se define por la media más 2 veces la desviación estándar de los controles sanos. Se consideró que las muestras eran positivas cuando tenían un título más alto que el punto límite y una absorbancia que era al menos 0,1 unidades más alto en Ca-FCS en comparación con FCS [17]. Usando este enfoque se estableció que el 42% de los pacientes con AR eran positivos para anticuerpos IgG anti-CarP mientras que el 54% de los sueros de pacientes con AR analizados fueron positivos para anticuerpos IgA anti-CarP (Figura 2). Los análisis de muestras pareadas de suero/fluido sinovial revelaron que IgG e IgA anti-CarP también se pueden encontrar en el fluido sinovial de los pacientes que son positivos para estos autoanticuerpos en suero (datos no mostrados).
Los anticuerpos anti-CarP están presentes en el suero y fluido sinovial en una proporción sustancial de pacientes con AR.

Los anticuerpos anti-CarP son independientes de ACPA

A continuación, hemos querido analizar si los anticuerpos anti-CarP se presentan independientemente de ACPA. Para ello se analizó la relación entre los anticuerpos ACPA y anti-CarP en una serie de 373 pacientes con AR. Nuestros datos muestran que el 14% y el 23% de los pacientes con AR no mostraron ACPA pero albergaban IgG e IgA anti-CarP, respectivamente. Del mismo modo, 22% y 19% de los pacientes con AR fueron positivos para ACPA pero negativos para

IgG e IgA anti-CarP, respectivamente (Figura 3). En un acercamiento en los individuos negativos para ACPA observamos que alrededor del 50% de todos los pacientes con AR negativos para ACPA dieron positivo para anticuerpos anti-CarP. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CarP se producen independientemente de ACPA.

Los anticuerpos anti-CarP son predictivos para el desarrollo de AR.

Los pacientes que presentan por sí mismos al inicio del estudio un diagnóstico de artritis indiferenciada puede entrar en remisión, desarrollar otra forma de artritis o puede desarrollar AR. Clínicamente sería relevante poder discriminar entre los pacientes que requieren de tratamiento y los pacientes que remitirán espontáneamente. Por lo tanto, se analizaron 425 pacientes que tenían AI al inicio del estudio para detectar la presencia de anticuerpos anti-CarP y el desarrollo de la AR (n = 151). Hemos observado que la positividad para anticuerpos IgG anti-CarP no se asoció con el desarrollo de AR de acuerdo a los criterios de 1987 de una manera estadísticamente significativa (p = 0,11). En contraste, los anticuerpos IgA anti-CarP se asociaron fuertemente con el desarrollo futuro de la AR en el grupo de la AI en su conjunto (p = 0,002) (Figura 4). Este efecto fue especialmente prominente en los individuos negativos para ACPA (Figura 4).

La medición de anticuerpos anti-CarP en pacientes que sufren de artritis indiferenciada es útil para identificar personas en riesgo de desarrollar AR.

Los anticuerpos anti-CarP se asocian con daño radiológico más severo.

Finalmente se analizó si los pacientes con AR que al inicio del estudio son positivos para anticuerpos anti-CarP tendrían un curso clínico diferente de su enfermedad y, por tanto, se comparó el grado de daño de las articulaciones con el tiempo. También en este análisis, la positividad de anticuerpos IgG anti-CarP no se asoció con daño radiológico de una manera estadísticamente significativa (p = 0,43). Sin embargo, los anticuerpos IgA anti-CarP están fuertemente asociados con daño más severo a las articulaciones (p = 0,002) (Figura 5), un efecto que era independiente del factor reumatoide (FR) o ACPA. En conjunto, estos datos indican que los anticuerpos anti-CarP están asociados con un curso de la enfermedad más severo, independiente de la presencia de la AR y/o ACPA.

Discusión

Aquí se describe una nueva familia de autoanticuerpos que reconocen proteínas carbamiladas (anti-CarP). Estos anticuerpos anti-CarP se pueden detectar tanto en isotipos IgG como IgA. Tanto los estudios de inhibición como los estudios de grupos muestran que los anticuerpos anti-CarP son diferentes de ACPA. Curiosamente, la positividad para anti-CarP, especialmente IgA, tiene implicaciones clínicas ya que los individuos positivos para IgA anti-CarP tienen un mayor riesgo de pasar de la AI a la AR y los pacientes con AR positivos para IgA anti-CarP tienen un peor desenlace en comparación con los pacientes con AR negativos para IgA anti-CarP.

Decidimos utilizar una mezcla compleja de proteínas como fuente inicial de antígenos proteicos carbamilados y por lo tanto generamos Ca-FCS. Observamos que existen anticuerpos que están dirigidos específicamente contra la forma carbamilada de FCS que no se enlaza a FCS nativo o citrulinado tanto en sistemas ELISA como de transferencia tipo Western. Estos anticuerpos son tanto de isotipos IgG como IgA lo que indica que se derivan de células B de clase conmutada, un proceso que requeriría la cooperación de células T. De hecho, los datos indican que las células T dirigidas a homocitrulina pueden ser inducidas por inmunización con antígenos modelo carbamilado [11].

Mostramos aquí que la detección de estos anticuerpos en la artritis temprana puede predecir el futuro desarrollo de la AR y predecir un curso más severo de la enfermedad. Puesto que se ha demostrado que el tratamiento agresivo temprano es beneficioso [18, 19], la invención describe métodos para el tratamiento de la artritis de un individuo que padece o está en riesgo de padecer la artritis, comprendiendo dicho método un diagnóstico de artritis de dicho individuo en donde dicho diagnóstico comprende un método para la determinación de un anticuerpo anti-CarP en una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo. Preferiblemente se determinó que la muestra contiene un anticuerpo anti-CarP. Un tratamiento más riguroso de dicho individuo positivo para anti-CarP es beneficioso para el paciente.

En conclusión, junto con el sistema de autoanticuerpos que reconoce proteínas citrulinadas (ACPA), también está presente un sistema de autoanticuerpos contra las proteínas carbamiladas (anti-CarP). La detección de tales anticuerpos es útil ya que su presencia, independientemente de ACPA, está asociada con el desarrollo de AI hasta AR y se asocia con un curso más severo de la enfermedad.

Ejemplo 2

Resultados

Los anticuerpos anti-CarP y ACPA son diferentes familias de anticuerpos.

Para detectar anticuerpos contra las proteínas carbamiladas (anticuerpos anti-CarP) hemos desarrollado un ELISA usando FCS carbamilado (Ca-FCS) y FCS no modificado como antígenos. Analizando los sueros de 40 pacientes con AR y 40 controles, se observó que los sueros de pacientes con AR reaccionaron con Ca-FCS en comparación con sueros obtenidos de sujetos sanos tanto con reactividad de IgG (Fig. 7A, B) como de IgA (Fig. 7C, D). La mayor reactividad de sueros de AR con Ca-FCS se enfatiza aún más después de la sustracción de la reactividad contra FCS sin modificar (Fig. 7C, E). Ya que la citrulina y la homocitrulina son dos aminoácidos bastante similares (Fig. 6), a continuación deseamos determinar si ACPA también reconoce homocitrulina cuando encuentra en la misma posición que la citrulina en un péptido. Para este fin se realizaron varios ELISA utilizando un péptido citrulinado Fib que se sabe que es reconocido por ACPA (23). Dentro de esta cadena principal del péptido, se introdujo una citrulina, una arginina, una homocitrulina o un residuo de lisina para su posterior análisis. El análisis de un conjunto de 76 sueros con AR se observó que ACPA sólo reconoció el péptido citrulinado, pero no el péptido que contiene arginina, o el péptido que contiene homocitrulina (Fig. 8A). Estos datos indican que ACPA, puede discriminar entre citrulina y homocitrulina presentes dentro de la misma cadena principal del péptido. A continuación, se quiso analizar si existe reactividad cruzada entre anticuerpos anti-CarP y ACPA para enlazamiento con proteínas modificadas después de la traducción. Por lo tanto, se realizaron estudios de inhibición utilizando sueros que eran reactivos tanto con antígenos citrulinados como carbamilados. Se analizó el enlazamiento de anticuerpos anti-CarP con placas recubiertas con Ca-FCS después de la incubación previa con Ca-FCS, FCS citrulinado (Ci-FCS), FCS nativo o por péptidos citrulinados utilizados para detectar ACPA (CCP1). Después de la incubación previa, se observó que el enlazamiento del anticuerpo anti-CarP con Ca-FCS sólo puede ser inhibido por Ca-FCS pero no por FCS citrulinado (Ci-FCS), FCS nativo o por péptidos utilizados para detectar ACPA (Fig. 8B). También se llevó a cabo el experimento de inhibición inverso donde se analizó el enlazamiento de ACPA con placas recubiertas con Ci-FCS siguiendo el mismo procedimiento de incubación previa. Se observó que el enlazamiento de ACPA con Ci-FCS sólo podía ser inhibido por Ci-FCS y el péptido citrulinado pero no por Ca-FCS, FCS no modificado, o la forma arginina del péptido (Fig. 8C). Juntos, estos datos indican que los anticuerpos anti-CarP y ACPA no son de reactividad cruzada, o sólo de reactividad cruzada limitada y específicamente dirigida contra homocitrulina, respectivamente antígenos que contienen citrulina. Puesto que todas las observaciones descritas anteriormente se hicieron usando ELISA, también deseamos confirmar nuestros hallazgos usando una técnica diferente. Por esta razón se realizó un análisis de transferencia tipo Western usando FCS, Ca-FCS y Ci-FCS en geles reducidos, seguido por la transferencia tipo Western. Las diferentes transferencias se incubaron con sueros de individuos que eran ya sea positivos para anti-CarP Carpa positivo y negativos para ACPA o negativos para anti-CarP y positivos para ACPA. Se observó una tinción positiva de la muestra positiva para anti-CarP sólo sobre Ca-FCS pero no sobre Ci-FCS o FCS (Fig. 8D). En contraste, la muestra negativa para anti-CarP, positiva para ACPA reaccionó con Ci-FCS, pero no con Ca-FCS y FCS (Fig. 8D). Para confirmar la presencia de anticuerpos anti-CarP repetimos estos experimentos utilizando una proteína más definida, Fib humana, como antígeno objetivo. Fib fue citrulinado por PAD (Ci-Fib) o carbamilado por cianato (Ca-Fib). La forma no modificada (Fib), Ci-Fib y Ca-Fib se utilizaron como antígenos en ELISA. Similar a las observaciones para FCS, se observó un enlazamiento significativo de anticuerpos con los pozos recubiertos con Ci-Fib y Ca-Fib, pero no con Fib (Fig. 9A). Esto fue en gran medida restringido a los sueros con AR y no los controles ($p = <0,0001$). Para analizar la reactividad cruzada también se realizaron estudios de inhibición como se describe aquí más arriba. Los análisis de ELISA confirmaron que los anticuerpos ACPA y anti-CarP no tienen en gran medida reactividad cruzada. Para asegurar que la reactividad hacia las proteínas carbamiladas esté mediada por parte del enlazamiento con el antígeno de los anticuerpos, se generaron F(ab')2. Como era de esperar, F(ab')2, generado a partir de muestras positivas para IgG anti-CarP, pero no a partir de muestras negativas muestra reactividad anti-CarP (Fig. 9C, D). Como se observa con el uso de anticuerpos intactos, también podría ser inhibida la reactividad de F(ab')2 hacia Ca-Fib específicamente por Ca-Fib, mientras que la reactividad de F(ab')2 hacia Ci-Fib sólo podría ser inhibida específicamente por Ci-Fib (Fig. 9E).

En conjunto, estos datos indican que los anticuerpos anti-CarP y ACPA reconocen diferentes antígenos, uno reconoce proteínas citrulinadas (ACPA) y el otro proteínas carbamiladas (anti-CarP). Asimismo, estos datos indican que el reconocimiento del antígeno es más probablemente mediado a través de los dominios variables presentes en los fragmentos F(ab')2.

Los anticuerpos anti-CarP están presentes en la AR.

Tras la identificación de los anticuerpos anti-CarP como una familia de autoanticuerpos separada de ACPA quisimos cuantificar la presencia de estos anticuerpos anti-CarP en una gran población de pacientes con AR y controles. Por esta razón, primero se generó un estándar, que comprende una combinación de sueros positivos para el anticuerpo anti-CarP. Este estándar mostró una dosis que depende de la dosis específica, que se enlaza tanto con IgG como con IgA a FCS carbamilado (Ca-FCS), pero que no se enlaza con FCS no modificado (Fig. 10A, B). Para este análisis se utilizó nuevamente el ensayo basado en FCS en un intento de captar la mayor cantidad de reactividad de anti-CarP como sea posible. Hemos establecido un punto límite para la positividad utilizando sueros de 305 individuos sanos como se describe en la sección de métodos. Usando este enfoque se observó que 45% de los sueros de pacientes con AR analizados son positivos para anticuerpos IgG anti-CarP (Fig. 10C). Del mismo modo, el 43% de los sueros probados de pacientes con AR son positivos para anticuerpos IgA anti-CarP (Fig. 10D).

Los anticuerpos anti-CarP también están presentes en el suero de los pacientes con AR negativo para anti-CCP2.

El grupo de pacientes con AR analizados en este estudio consistió tanto de individuos positivos para ACPA como negativos para ACPA, medido por el ensayo de CCP2. Por lo tanto, a continuación se analizó la asociación entre anticuerpos anti-CarP y anticuerpos anti-CCP2. La presencia de anticuerpos anti-CarP y anticuerpos anti-CCP2 mostró un grado limitado de correlación cuando se analiza la población completa con AR (r^2 = 0,27, p < 0,001 para IgG anti-CarP o r^2 = 0,15, p < 0,001 para IgA). Sin embargo, también se identificó una cantidad sustancial de pacientes con AR que sólo eran positivos para anticuerpos anti-CCP2, así como un grupo de pacientes que sólo es positivo para anticuerpos anti-CarP (Fig. 10E, F). Observamos que aproximadamente el 16% de los pacientes con AR negativos para anti-CCP2 muestra anticuerpos IgG anti-CarP, mientras que el 30% de los pacientes con AR negativos para anti-CCP2 dieron positivo para IgA anti-CarP (Fig. 10G, H). Estos datos indican que la presencia de anticuerpos anti-CarP se superpone con la aparición de anticuerpos anti-CCP2, pero que esta superposición no es absoluta ya que más del 30% de los pacientes negativos para anti-CCP2 albergan anticuerpos anti-CarP. En total, más del 35% de todos los pacientes negativos para anti-CCP2 tiene ya sea anticuerpos IgG o IgA anti-CarP.

Los anticuerpos anti-CarP se asocian con daño radiológico más severo.

La presencia de ACPA se asocia con un curso más severo de la enfermedad clínica tal como se mide por el daño radiológico. Para analizar si la presencia de anticuerpos anti-CarP también son predictivos para un curso más severo de una enfermedad, se comparó el grado de daño de las articulaciones con el tiempo entre los pacientes positivos y negativos para anti-CarP participantes en el grupo EAC de Leiden. Este grupo es un grupo de inicio de pacientes con artritis de reciente comienzo donde se toman radiografías de las manos y de los pies de todos los pacientes con AR a intervalos anuales para evaluar el daño radiológico utilizando el método de Sharp - van der Heijde (24). So observó que la presencia de IgG anti-CarP se asocia fuertemente con una progresión más severa de la enfermedad. Los pacientes positivos para IgG anti-CarP tenían más destrucción de las articulaciones después de más de 7 años que los pacientes negativos para IgG sin (ß = 2,01, IC del 95% 1,68-2,40, p = 8,68 x 10^{-14}) o con la corrección de ACPA y RF (ß = 1,41, IC del 95% 1,13-1,76, p = 0,002) (Fig. 13). Se asoció IgA anti-CarP con más destrucción de las articulaciones después más de 7 años que los pacientes negativos para IgA anti-CarP sin corrección de la ACPA y RF (ß = 1.21, IC del 95% 1,01-1,45, p = 0,041), pero no después de la corrección (p = 0,855) (Fig. 13). Como el análisis descrito anteriormente no muestran si los anticuerpos anti-CarP predicen la progresión radiológica en los subgrupos con AR negativos para anti-CCP2, positivos para CCP2 o ambos, se realizó a continuación un análisis estratificado. Es importante destacar que este análisis reveló que la presencia de IgG anti-CarP se asocia con un daño articular más severo en el subgrupo negativo para anti-CCP2 (ß = 1,86, IC del 95% 1,41-2,66, p = 1,8 x 10^{-5}) (Fig. 11). Del mismo modo, se observó una tendencia similar hacia más daño articular con el tiempo para los pacientes negativos para anti-CCP2 analizados como positivos para los anticuerpos IgA anti-CarP (ß = 1,25; IC del 95% 0,98-1,58; p = 0,071) (Fig. 13). En contraste, en el subgrupo positivo para anti-CCP2, que ya se caracteriza por destrucción severa de las articulaciones, no se observó ningún aumento adicional en los individuos que albergaban también anticuerpos anti-CarP (Fig. 13). Juntos, estos datos indican que la detección de anticuerpos anti-CarP al inicio del estudio es predictiva de un curso más destructivo de la enfermedad en la AR negativa para anti-CCP2 tal como se mide por el método de Sharp / van der Heijde.

Discusión

Una familia de autoanticuerpos que reconocen proteínas carbamiladas, anticuerpos anti-CarP, puede ser detectada en sueros de pacientes con AR. Tanto los estudios de inhibición como los estudios de grupos muestran que los anticuerpos anti-CarP y ACPA representan dos familias de autoanticuerpos diferentes e independientes, una que reconoce proteínas carbamiladas y la otra proteínas citrulinadas. Nuestros datos muestran que los anticuerpos anti-CarP y ACPA son, por lo general, no de reacción cruzada, aunque no se excluye que existe cierta reactividad cruzada a nivel de población, como también se indica en los datos recientes obtenidos en conejos después de la vacunación con proteínas carbamiladas (14). Curiosamente, la positividad para los anticuerpos anti-CarP, está relacionada con el resultado clínico ya que los individuos positivos para IgG anti-CarP, pero negativos para los anticuerpos anti-CCP2, tienen un curso más destructivo de la enfermedad en comparación con los pacientes con AR negativos para IgG anti-CarP.

Actualmente se desconoce que proteínas sufren modificaciones postraduccionales como la carbamilación. La carbamilación está mediada por cianato que está en equilibrio con urea. Se ha reportado que el aumento de las concentraciones de urea, el tabaquismo y la inflamación desplazan este equilibrio hacia el cianato y por lo tanto una carbamilación mejorada (13). Ya que actualmente no se conocen objetivos relevantes in vivo para anticuerpos anti-CarP, se utilizó una mezcla compleja de proteínas como fuente inicial de antígenos proteicos carbamilados para la detección de anticuerpos anti-CarP. Los análisis de transferencias tipo Western indican el reconocimiento por parte de anticuerpos anti-CarP de al menos una proteína dominante presente en FCS después de la carbamilación empleando Cianato (que representa altas concentraciones de urea) (Fig. 8D). Sin embargo, estos datos probablemente no representan la situación in vivo donde carbamilación es un proceso más gradual, pero que se produce constantemente (25). A este respecto, es probable que las proteínas especialmente de larga vida adquieran residuos de homocitrulina con el tiempo ya que carbamilación es casi irreversible y por lo tanto dará lugar a la acumulación de residuos de homocitrulina en las proteínas con una vida media larga. Curiosamente, se conoce la articulación por la presencia de proteínas de larga vida tales como colágenos y otras proteínas expresadas en el cartílago. Por lo tanto, es concebible que dichas proteínas de matriz acumulen residuos de homocitrulina

durante la vida, especialmente bajo condiciones de inflamación. De hecho, se ha demostrado que la homocitrulina está presente en la articulación (11), posiblemente representando la naturaleza de larga vida de muchas proteínas derivadas de la articulación. Será interesante conocer la identidad de estas proteínas y si éstas puede servir como un objetivo para anticuerpos anti-CarP.

La naturaleza molecular de los antígenos reconocidos por ACPA ha sido identificada hace más de 15 años mediante la descripción de que la citrulina es un constituyente esencial de los antígenos reconocidos por estos anticuerpos específicos de la AR (26, 27). Este hallazgo ha tenido un impacto considerable, ya que ha abierto el camino a ideas relevantes y novedosas en el diagnóstico y etiopatogenia de la AR (1). Por ejemplo, ACPA hace parte ahora de los nuevos criterios de ACR/EULAR para AR (28), y han sido implicado en la patogénesis de la AR, tanto en modelos animales (29, 30, 31) como en estudios en humanos ex vivo (32 , 33, 34, 35). Es importante destacar que la descripción de ACPA ha llevado a la comprensión de que la AR constituye al menos dos síndromes clínicos que comparten muchas características clínicas, pero que difieren con respecto a los antecedentes genéticos, factores ambientales que predisponen y la progresión / remisión clínica (36, 3, 4, 37, 38). Aunque claramente es demasiado pronto para permitir conclusiones firmes, es tentador especular que los anticuerpos anti-CarP también contribuyen a la patogénesis de la enfermedad y/o muestran valor diagnóstico, dada la naturaleza similar de los antígenos reconocidos y su presencia en la enfermedad negativa para ACPA.

La presencia de anticuerpos anti-CarP en la enfermedad negativa para anti-CCP2 es altamente intrigante ya que podría representar potencialmente un nuevo biomarcador que identifique positivamente al menos parte de esta manifestación de la AR. Para obtener una mayor comprensión de esta posibilidad es importante establecer si la presencia de anticuerpos anti-CarP es específica para la AR o también se encuentra en otras enfermedades reumáticas, así como si su presencia predice el desarrollo de AR (negativo para ACPA) en RA pacientes que sufren de AR temprana sin clasificar y/o dolencias de las articulaciones como artralgia.

Para establecer un punto límite para definir una muestra como positiva hemos analizado la presencia de IgG e IgA dirigidas contra Ca-FCS y FCS en el suero de controles sanos. Todas las muestras se analizaron para determinar la reactividad hacia Ca-FCS y FCS, y se convirtieron los valores de absorbancia en aU/mL utilizando un estándar positivo de anticuerpos anti-CarP presentes en la misma placa. Ya que los sueros de varios sujetos individuales también muestran reactividad hacia FCS no modificado, restamos la 'reactividad de FCS' de la reactividad hacia Ca-FCS utilizando aU/mL como se define mediante la curva estándar. Se calculó posteriormente el límite como la media más dos veces la desviación estándar y aplicamos el límite a los datos de los pacientes con AR siguiendo una estrategia similar. La desventaja de este método es que se utiliza un estándar en Ca-FCS para la determinación de aU/mL hacia FCS, otra entidad antigénica. Sin embargo, este método permitió el cálculo de una respuesta específica a la modificación postraduccional.

Cada método para establecer un punto límite tiene sus ventajas y limitaciones.

Por lo tanto, posteriormente confirmamos nuestras observaciones utilizando también otra estrategia, mediante el cálculo del punto límite como la media más 2 veces la desviación estándar de la respuesta anti-Ca-FCS en los controles. Este punto límite se aplicó a los datos de los pacientes con AR, como también se empleó antes (39). La asociación con la progresión radiológica de IgG en la AR negativa para ACPA sigue siendo significativa, aunque con un menor nivel de significación ($p = 0,001$).

Desde una perspectiva clínica, la detección de anticuerpos anti-CarP en la artritis temprana podría ser muy gratificante ya que predicen un curso más severo de la enfermedad. Ya que el tratamiento agresivo precoz en la AR ha demostrado que previene daños en el futuro (40, 41), la detección de anticuerpos anti-CarP podría ser beneficiosa para identificar a los pacientes negativos para anti-CCP2 en riesgo de desarrollar una enfermedad severa. La identificación de estos pacientes podría ser importante para guiar las decisiones de tratamiento temprano después de la aparición de los síntomas, sobre todo en pacientes con artritis temprana que son difíciles de clasificar.

En conclusión, además del sistema de autoanticuerpos que reconoce proteínas citrulinadas (ACPA), un sistema de autoanticuerpos contra proteínas carbamiladas (anti-CarP) está presente en sueros de pacientes con AR. La detección de anticuerpos anti-CarP podría ofrecer nuevas posibilidades para identificar a los pacientes en riesgo de un curso más severo de la enfermedad.

Referencias

1. Klareskog L, Ronnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol 2008; 26:651-75.
2. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet 2007; 80(5):867-75.
3. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2005; 7(5):R949-R958.

4. van der Woude D., Young A, Jayakumar K, Mertens BJ, Toes RE, van der HD et al. Prevalence of and predictive factors for sustained disease-modifying antirheumatic drug-free remission in rheumatoid arthritis: results from two large early arthritis cohorts. Arthritis Rheum 2009; 60(8):2262-71.
5. Visser K, Verpoort KN, van DH, van der Kooij SM, Allaart CF, Toes RE et al. Pretreatment serum levels of anticyclic citrullinated peptide antibodies are associated with the response to methotrexate in recent-onset arthritis. Ann Rheum Dis 2008; 67(8):1194-5.
6. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to antitumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebocontrolled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. Arthritis Rheum 2006; 54(9):2793-806.
7. Quartuccio L, Fabris M, Salvin S, Atzeni F, Saracco M, Benucci M et al. Rheumatoid factor positivity rather than anti-CCP positivity, a lower disability and a lower number of anti-TNF agents failed are associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2009; 48(12):1557-9.
8. Gyorgy B, Toth E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. Int J Biochem Cell Biol 2006; 38(10):1662-77.
9. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. Science 2004; 306(5694):279-83.
10. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J Exp Med 2010; 207(9):1853-62.
11. Mydel P, Wang Z, Brisslert M, Hellvard A, Dahlberg LE, Hazen SL et al. Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis. J Immunol 2010; 184(12):6882-90.
12. Sirpal S. Myeloperoxidase-mediated lipoprotein carbamylation as a mechanistic pathway for atherosclerotic vascular disease. Clin Sci (Lond) 2009; 116(9):681-95.
13. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. Nat Med 2007; 13(10):1176-84.
14. Turunen S, Koivula MK, Risteli L, Risteli J. Anticitrulline antibodies can be caused by homocitrulline-containing proteins in rabbits. Arthritis Rheum 2010; 62(11):3345-52.
15. van Aken J., van Bilsen JH, Allaart CF, Huizinga TW, Breedveld FC. The Leiden Early Arthritis Clinic. Clin Exp Rheumatol 2003; 21(5 Suppl 31):S100-S105.
16. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988; 31(3):315-24.
17. Verpoort KN, Cheung K, Ioan-Facsinay A, van der Helm-van Mil AH, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF et al. Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles. Arthritis Rheum 2007; 56(12):3949-52.
18. van der Helm-van Mil AH, le CS, van DH, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions. Arthritis Rheum 2007; 56(2):433-40.
19. van Dongen H, van Aken J, Lard LR, Visser K, Ronday HK, Hulsmans HM et al. Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2007; 56(5):1424-32.
23. Willemze A, et al. (2011) The interaction between HLA shared epitope alleles and smoking and its contribution to autoimmunity against several citrullinated antigens. Arthritis Rheum 63:1823-1832.
24. van der Linden MP, et al. (2009) Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 60:2242-2247.
25. Berlyne GM (1998) Carbamylated proteins and peptides in health and in uremia. Nephron 79:125-130.
26. Masson-Bessiere C, et al. (2001) The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. J Immunol 166:4177-4184.
27. Schellekens GA, et al. (1998) Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest 101:273-281.
28. Aletaha D, et al. (2010) The 2010 American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis. Arthritis and Rheumatism.
29. Hill JA, et al. (2008) Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. The Journal of Experimental Medicine 205:967-979.
30. Kuhn KA, et al. (2006) Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. J Clin Invest 116:961-973.
31. Uysal H, et al. (2009) Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. J Exp Med
32. Clavel C, et al. (2008) Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. Arthritis Rheum 58:678-688.
33. Lu MC, et al. (2010) Anti-citrullinated protein antibodies bind surface-expressed citrullinated Grp78 on monocyte/macrophages and stimulate tumor necrosis factor alpha production. Arthritis Rheum 62:1213-1223.
34. Schuerwegh AJM, et al. (2010) Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences 107:2586-2591.

35. Trouw LA, et al. (2009) Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. Arthritis Rheum 60:1923-1931.
36. Linn-Rasker SP, et al. (2006) Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. Ann Rheum Dis 65:366-371.
37. van Gaalen FA, et al. (2004) Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 50:2113-2121.
38. Verpoort KN, et al. (2005) Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 52:3058-3062.
39. Verpoort KN, et al. (2007) Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles. Arthritis Rheum 56:3949-3952.
40. van der Helm-van Mil AH, et al. (2007) A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions. Arthritis Rheum 56:433-440.
41. van Dongen H, et al. (2007) Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 56:1424-1432.
42. de Rooy DPC, et al. (2011) Predicting arthritis outcomesGQ6what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic? Rheumatology 50:93-100.
43. Arnett FC, et al. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 31:315-324.
44. Suwannalai P, et al. (2011) Anti-citrullinated protein antibodies have a low avidity compared with antibodies against recall antigens. Annals of the Rheumatic Diseases 70:373-379.
45. Verpoort KN, et al. (2007) Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles. Arthritis and Rheumatism 56:3949-3952.
46. Schellekens GA, et al. (1998) Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest 101:273-281.
47. van der Heijde D (2000) How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. Journal of Rheumatology 27:261-263.

Tabla I. Lista de péptidos que contienen lisina de Fibrinógeno alfa y sus contrapartes que contienen homocitrulina

	Péptidos que contienen lisina de fibrinógeno alfa		Péptidos que contienen homocitrulina de fibrinógeno alfa
1	RVVERHQSACKDSDWPFCSDE	1	RVVERHQSAChomocitDSDWPFCSDE
2	PFCSDEDWNYKCPSGCRMKGL	2	PFCSDEDWNYhomocitCPSGCRMhomocitGL
3	NYKCPSGCRMKGLIDEVNQDF	3	NYhomocitCPSGCRMhomocitGLIDEVNQDF
4	VNQDFTNRINKLKNSLFEYQK	4	VNQDFTNRINhomocitLhomocitNSLFEYQhomocit
5	QDFTNRINKLKNSLFEYQKNN	5	QDFTNRINhomocitLhomocitNSLFEYQhomocitNN
6	KLKNSLFEYQKNNKDSHSLTT	6	homocitLhomocitNSLFEYQhomocitNNhomocitDSHSLTT
7	NSLFEYQKNNKDSHSLTTNIM	7	NSLFEYQhomocitNNhomocitDSHSLTTNIM
8	EDLRSRIEVLKRKVIEKVQHI	8	EDLRSRIEVLhomocitRhomocitVIEhomocitVQHI
9	LRSRIEVLKRKVIEKVQHIQL	9	LRSRIEVLhomocitRhomocitVIEhomocitVQHIQL
10	IEVLKRKVIEKVQHIQLLQKN	10	IEVLhomocitRhomocitVIEhomocitVQHIQLLQhomocitN
11	EKVQHIQLLQKNVRAQLVDMK	11	EhomocitVQHIQLLQhomocitNVRAQLVDMhomocit
12	KNVRAQLVDMKRLEVDIDIKI	12	homocitNVRAQLVDMhomocitRLEVDIDIhomocitI
13	MKRLEVDIDIKIRSCRGSCSR	13	MhomocitRLEVDIDIhomocitIRSCRGSCSR
14	SRALAREVDLKDYEDQQKQLE	14	SRALAREVDLhomocitDYEDQQhomocitQLE
15	VDLKDYEDQQKQLEQVIAKDL	15	VDLhomocitDYEDQQhomocitQLEQVIAhomocitDL
16	QQKQLEQVIAKDLLPSRDRQH	16	QQhomocitQLEQVIAhomocitDLLPSRDRQH
17	SRDRQHLPLIKMKPVPDLVPG	17	SRDRQHLPLIhomocitMhomocitPVPDLVPG
18	DRQHLPLIKMKPVPDLVPGNF	18	DRQHLPLIhomocitMhomocitPVPDLVPGNF
19	PVPDLVPGNFKSQLQKVPPEW	19	PVPDLVPGNFhomocitSQLQhomocitVPPEW
20	VPGNFKSQLQKVPPEWKALTD	20	VPGNFhomocitSQLQhomocitVPPEWhomocitALTD
21	SQLQKVPPEWKALTDMPQMRM	21	SQLQhomocitVPPEWhomocitALTDMPQMRM
22	SSGTGGTATWKPGSSGPGSTG	22	SSGTGGTATWhomocitPGSSGPGSTG
23	PGTRREYHTEKLVTSKGDKEL	23	PGTRREYHTEhomocitLVTShomocitGDhomocitEL
24	EYHTEKLVTSKGDKELRTGKE	24	EYHTEhomocitLVTShomocitGDhomocitELRTGhomocitE
25	TEKLVTSKGDKELRTGKEKVT	25	TEhomocitLVTShomocitGDhomocitELRTGhomocitEhomocitVT
26	SKGDKELRTGKEKVTSGSTTT	26	ShomocitGDhomocitELRTGhomocitEhomocitVTSGSTTT
27	GDKELRTGKEKVTSGSTTTTR	27	GDhomocitELRTGhomocitEhomocitVTSGSTTTTR
28	STTTTRRSCSKTVTKTVIGPD	28	STTTTRRSCShomocitTVThomocitTVIGPD
29	TRRSCSKTVTKTVIGPDGHKE	29	TRRSCShomocitTVThomocitTVIGPDGHhomocitE
30	TKTVIGPDGHKEVTKEVVTSE	30	ThomocitTVIGPDGHhomocitEVThomocitEVVTSE
31	IGPDGHKEVTKEVVTSEDGSD	31	IGPDGHhomocitEVThomocitEVVTSEDGSD
32	AAFFDTASTGKTFPGFFSPML	32	AAFFDTASTGhomocitTFPGFFSPML
33	GSESGIFTNTKESSSHHPGIA	33	GSESGIFTNThomocitESSSHHPGIA
34	PGIAEFPSRGKSSSYSKQFTS	34	PGIAEFPSRGhomocitSSSYShomocitQFTS
35	PSRGKSSSYSKQFTSSTSYNR	35	PSRGhomocitSSSYShomocitQFTSSTSYNR
36	YNRGDSTFESKSYKMADEAGS	36	YNRGDSTFEShomocitSYhomocitMADEAGS
37	GDSTFESKSYKMADEAGSEAD	37	GDSTFEShomocitSYhomocitMADEAGSEAD
38	EADHEGTHSTKRGHAKSRPVR	38	EADHEGTHSThomocitRGHAhomocitSRPVR
39	GTHSTKRGHAKSRPVRDCDDV	39	GTHSThomocitRGHAhomocitSRPVRDCDDV
40	SGTQSGIFNIKLPGSSKIFSV	40	SGTQSGIFNIhomocitLPGSShomocitIFSV
41	IFNIKLPGSSKIFSVYCDQET	41	IFNIhomocitLPGSShomocitIFSVYCDQET
42	LNFNRTWQDYKRGFGSLNDEG	42	LNFNRTWQDYhomocitRGFGSLNDEG
43	VRGIHTSPLGKPSLSP	43	VRGIHTSPLGhomocitPSLSP

Tabla II. Lista de péptidos que contienen lisina de Fibrinógeno beta y sus contrapartes que contienen homocitrulina

	Péptidos que contienen lisina de fibrinógeno beta	Péptidos que contienen homocitrulina de fibrinógeno beta
1	MKRMVSWSFHKL	MhomocitRMVSWSFHhomocitL
2	MKRMVSWSFHKLKTMKHLLLL	MhomocitRMVSWSFHhomocitLhomocitTMhomocitHLLLL
3	RMVSWSFHKLKTMKHLLLLLL	RMVSWSFHhomocitLhomocitTMhomocitHLLLLLL
4	SWSFHKLKTMKHLLLLLLCVF	SWSFHhomocitLhomocitTMhomocitHLLLLLLCVF
5	LLLLLCVFLVKSQGVNDNEEG	LLLLLCVFLVhomocitSQGVNDNEEG
6	FSARGHRPLDKKREEAPSLRP	FSARGHRPLDhomocithomocitREEAPSLRP
7	SARGHRPLDKKREEAPSLRPA	SARGHRPLDhomocithomocitREEAPSLRPA
8	SGGGYRARPAKAAATQKKVER	SGGGYRARPAhomocitAAATQhomocithomocitVER
9	ARPAKAAATQKKVERKAPDAG	ARPAhomocitAAATQhomocithomocitVERhomocitAPDAG
10	RPAKAAATQKKVERKAPDAGG	RPAhomocitAAATQhomocithomocitVERhomocitAPDAGG
11	AAATQKKVERKAPDAGGCLHA	AAATQhomocithomocitVERhomocitAPDAGGCLHA
12	SSSFQYMYLLKDLWQKRQKQV	SSSFQYMYLLhomocitDLWQhomocitRQhomocitQV
13	YMYLLKDLWQKRQKQVKDNEN	YMYLLhomocitDLWQhomocitRQhomocitQVhomocitDNEN
14	LLKDLWQKRQKQVKDNENVVN	LLhomocitDLWQhomocitRQhomocitQVhomocitDNENWN
15	DLWQKRQKQVKDNENVVNEYS	DLWQhomocitRQhomocitQVhomocitDNENVVNEYS
20	PWSCEEI IRKGGETSEMYLI	PVVSCEEIIRhomocitGGETSEMYLI
21	MYLIQPDSSVKPYRVYCDMNT	MYLIQPDSSVhomocitPYRVYCDMNT
22	VDFGRKWDPYKQGFGNVATNT	VDFGRhomocitWDPYhomocitQGFGNVATNT
23	FGNVATNTDGKNYCGLPGEYW	FGNVATNTDGhomocitNYCGLPGEYW
24	LPGEYWLGNDKISQLTRMGPT	LPGEYWLGNDhomocitISQLTRMGPT
25	TELLIEMEDWKGDKVKAHYGG	TELLIEMEDWhomocitGDhomocitVhomocitAHYGG
26	LIEMEDWKGDKVKAHYGGFTV	LIEMEDWhomocitGDhomocitVhomocitAHYGGFTV
27	EMEDWKGDKVKAHYGGFTVQN	EMEDWhomocitGDhomocitVhomocitAHYGGFTVQN
28	GGFTVQNEANKYQISVNKYRG	GGFTVQNEANhomocitYQISVNhomocitYRG
29	EANKYQISVNKYRGTAGNALM	EANhomocitYQISVNhomocitYRGTAGNALM
30	NDGWLTSDPRKQCSKEDGGGW	NDGWLTSDPRhomocitQCShomocitEDGGGW
31	LTSDPRKQCSKEDGGGWWYNR	LTSDPRhomocitQCShomocitEDGGGWWYNR
32	WGGQYTWDMAKHGTDDGWWM	WGGQYTWDMAhomocitHGTDDGVVWM
33	TDDGVVWMNWKGSWYSMRKMS	TDDGWWMNWhomocitGSWYSMRhomocitMS
34	NWKGSWYSMRKMSMKIRPFFQ	NWhomocitGSWYSMRhomocitMSMhomocitIRPFFQ
35	SWYSMRKMSMKIRPFFPQQ	SWYSMRhomocitMSMhomocitIRPFFPQQ

Tabla III. Lista de péptidos que contienen lisina de Fibrinógeno gamma y sus contrapartes que contienen homocitrulina

	Péptidos que contienen lisina de fibrinógeno gamma	Péptidos que contienen homocitrulina de fibrinógeno gamma
1	IADFLSTYQTKVDKDLQSLED	IADFLSTYQThomocitVDhomocitDLQSLED
2	FLSTYQTKVDKDLQSLEDILH	FLSTYQThomocitVDhomocitDLQSLEDILH
3	LEDILHQVENKTSEVKQLIKA	LEDILHQVENhomocitTSEVhomocitQLIhomocitA
4	HQVENKTSEVKQLIKAIQLTY	HQVENhomocitTSEVhomocitQLIhomocitAIQLTY
5	NKTSEVKQLIKAIQLTYNPDE	NhomocitTSEVhomocitQLIhomocitAIQLTYNPDE
6	QLTYNPDESSKPNMIDAATLK	QLTYNPDESShomocitPNMIDAATLhomocit
7	KPNMIDAATLKSRKMLEEIMK	homocitPNMIDAATLhomocitSRhomocitMLEEIMhomocit
8	MIDAATLKSRKMLEEIMKYEA	MIDAATLhomocitSRhomocitMLEEIMhomocitYEA
9	KSRKMLEEIMKYEASILTHDS	homocitSRhomocitMLEEIMhomocitYEASILTHDS
10	LQEIYNSNNQKIVNLKEKVAQ	LQEIYNSNNQhomocitIVNLhomocitEhomocitVAQ
11	NSNNQKIVNLKEKVAQLEAQC	NSNNQhomocitIVNLhomocitEhomocitVAQLEAQC
12	NNQKIVNLKEKVAQLEAQCQE	NNQhomocitIVNLhomocitEhomocitVAQLEAQCQE
13	QLEAQCQEPCKDTVQIHDITG	QLEAQCQEPChomocitDTVQIHDITG
14	DTVQIHDITGKDCQDIANKGA	DTVQIHDITGhomocitDCQDIANhomocitGA
15	TGKDCQDIANKGAKQSGLYFI	TGhomocitDCQDIANhomocitGAhomocitQSGLYFI
16	DCQDIANKGAKQSGLYFIKPL	DCQDIANhomocitGAhomocitQSGLYFIhomocitPL
17	GAKQSGLYFIKPLKANQQFLV	GAhomocitQSGLYFIhomocitPLhomocitANQQFLV
18	GSGNGWTVFQKRLDGSVDFKK	GSGNGWTVFQhomocitRLDGSVDFhomocithomocit
19	QKRLDGSVDFKKNWIQYKEGF	QhomocitRLDGSVDFhomocithomocitNWIQYhomocitEGF
20	KRLDGSVDFKKNWIQYKEGFG	homocitRLDGSVDFhomocithomocitNWIQYhomocitEGFG
21	VDFKKNWIQYKEGFGHLSPTG	VDFhomocithomocitNWIQYhomocitEGFGHLSPTG

(continuación)

	Péptidos que contienen lisina de fibrinógeno gamma	Péptidos que contienen homocitrulina de fibrinógeno gamma

22	GTTEFWLGNEKIHLISTQSAI	22	GTTEFWLGNEhomocitIHLISTQSAI
23	RTSTADYAMFKVGPEADKYRL	23	RTSTADYAMFhomocitVGPEADhomocitYRL
24	AMFKVGPEADKYRLTYAYFAG	24	AMFhomocitVGPEADhomocitYRLTYAYFAG
25	GFDFGDDPSDKFFTSHNGMQF	25	GFDFGDDPSDhomocitFFTSHNGMQF
26	QFSTWDNDNDKFEGNCAEQDG	26	QFSTWDNDNDhomocitFEGNCAEQDG
27	EQDGSGWWMNKCHAGHLNGVY	27	EQDGSGWWMNhomocitCHAGHLNGVY
28	GVYYQGGTYSKASTPNGYDNG	28	GVYYQGGTYShomocitASTPNGYDNG
29	YDNGIIWATWKTRWYSMKKTT	29	YDNGIIWATWhomocitTRWYSMhomocithomocitTT
30	ATWKTRWYSMKKTTMKIIPFN	30	ATWhomocitTRWYSMhomocithomocitTTMhomocitIIPFN
31	TWKTRWYSMKKTTMKIIPFNR	31	TWhomocitTRWYSMhomocithomocitTTMhomocitIIPFNR
32	RWYSMKKTTMKIIPFNRLTIG	32	RWYSMhomocithomocitTTMhomocitIIPFNRLTIG

Reivindicaciones

1. Un método para la clasificación de un individuo que padece de o que está en riesgo de padecer una forma de artritis dicho método comprendiendo determinar si una muestra que comprende un fluido corporal de dicho individuo comprende un anticuerpo antiproteína carbamilada (anti-CarP), preferiblemente un anticuerpo anti-fibrinógeno carbamilado (anti-Ca-Fib), en donde dicha muestra es negativa para anticuerpo antiproteína citrulinada (ACPA) y en donde la detección de dicho anticuerpo anti-CarP clasifica la muestra como una muestra de un individuo que está en alto riesgo de padecer actualmente de o de estar en riesgo de desarrollar artritis.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 para determinar si dicho individuo está en riesgo de padecer la artritis, y en donde dicho individuo no sufría de artritis en el momento que se obtuvo la muestra de fluido.

3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha artritis comprende artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis psoriásica, osteoartritis, polimialgia reumática, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, gota, seudogota, artritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, fibromialgia, enfermedad de Lyme, artritis indiferenciada, artritis no reumatoide o espondiloartropatía.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha artritis es artritis reumatoide, artritis juvenil o artritis indiferenciada.

5. Un kit para la detección de anticuerpos anti-Ca-Fib en un fluido corporal de un individuo, comprendiendo dicho kit un péptido fibrinógeno carbamilado como se muestra en la Tabla I, Tabla II o Tabla III.

6. Un kit de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además un anticuerpo anti-IgG humano y/o un anticuerpo anti-IgA humano.

7. Un kit de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho anticuerpo anti-Ig humano comprende un anticuerpo anti-IgA humano.

8. Un kit de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho anticuerpo anti-Ig humano comprende un anticuerpo anti-IgG humano.

9. Un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que comprende además una proteína o péptido citrulinado.

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en donde dicho anticuerpo anti-CarP y/o anti-Ca-Fib es específico para una proteína o péptidos carbamilados derivados de suero de ternera fetal (FCS) y/o sus equivalentes mejorados.

11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además la determinación de un factor adicional como un clasificador de artritis para dicho individuo.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho factor adicional comprende la determinación de ACPA, factor reumatoide, proteína reactiva C, y/o la velocidad de sedimentación de eritrocitos.

13. Un kit para la detección de anticuerpos anti-CarP en un fluido corporal de un individuo, comprendiendo dicho kit una proteína o péptido carbamilado, un anticuerpo anti-IgG humano, y un anticuerpo anti-IgA humano.

14. El uso de un kit para la detección de anticuerpos anti-CarP, preferiblemente anticuerpos anti-Ca-Fib, en un fluido corporal de un individuo en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo dicho kit una proteína o péptido carbamilado, preferiblemente fibrinógeno carbamilado o un péptido derivado del mismo.

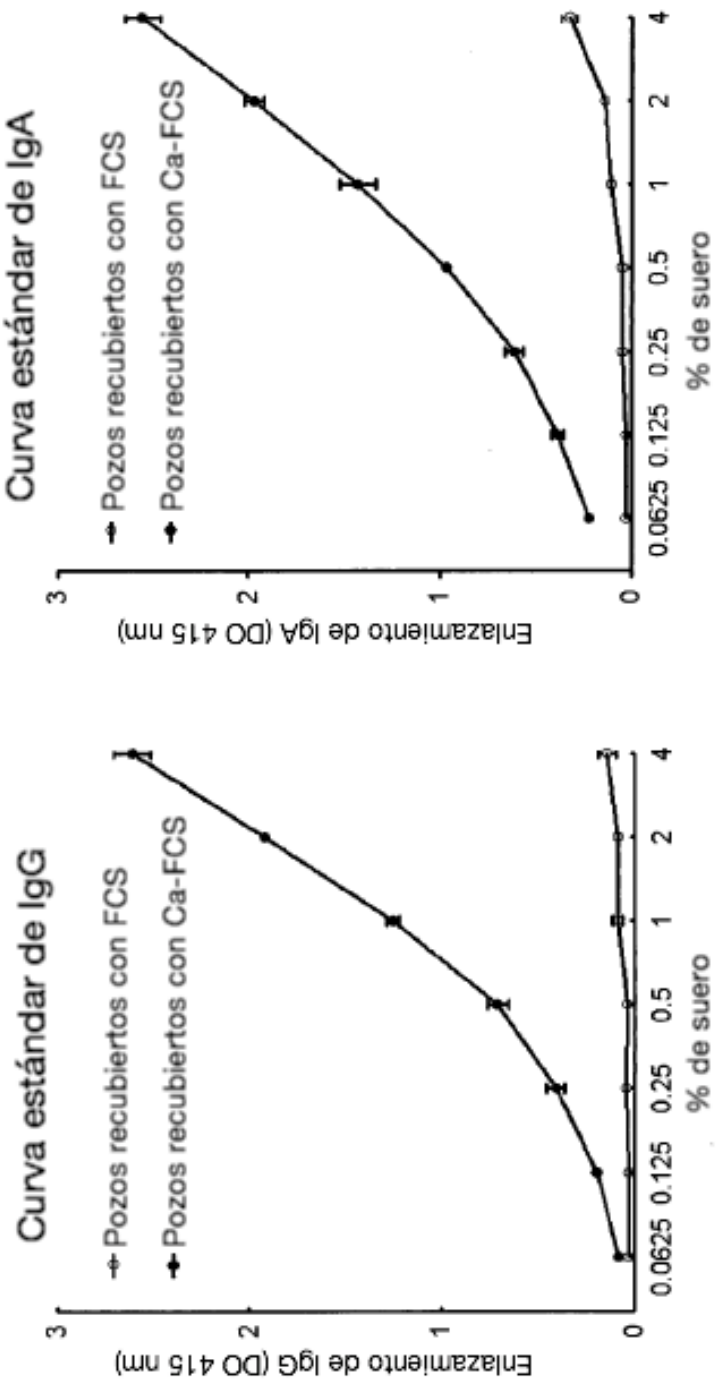
Curva estándar de IgA
Pozos recubiertos con FCS
Pozos recubiertos con Ca-FCS
Enlazamiento de IgA (DO 415 nm)
0
1
2
3
0.0625
0.125
0.25
0.5
1
2
4
% de suero
Curva estándar de IgG
Pozos recubiertos con FCS
Pozos recubiertos con Ca-FCS
Enlazamiento de IgG (DO 415 nm)
0
1
2
3
0.0625
0.125
0.25
0.5
1
2
4
% de suero

Fig. 1A

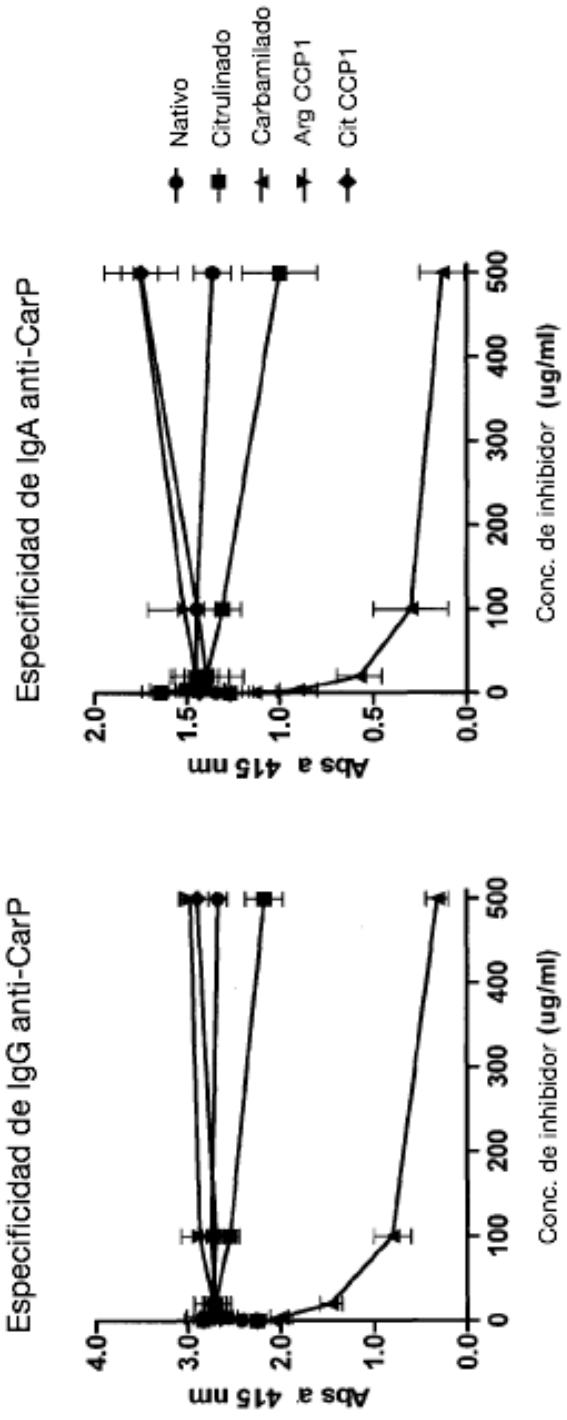
Especificidad de IgA anti-CarP
Nativo
Citrulinado
Carbamilado
Arg CCP1
Cit CCP1
Abs a 415 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
100
200
300
400
500
Conc. de inhibidor (ug/ml)
Especificidad de IgG anti-CarP
Abs a 415 nm
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
100
200
300
400
500
Conc. de inhibidor (ug/ml)

Fig. 1B

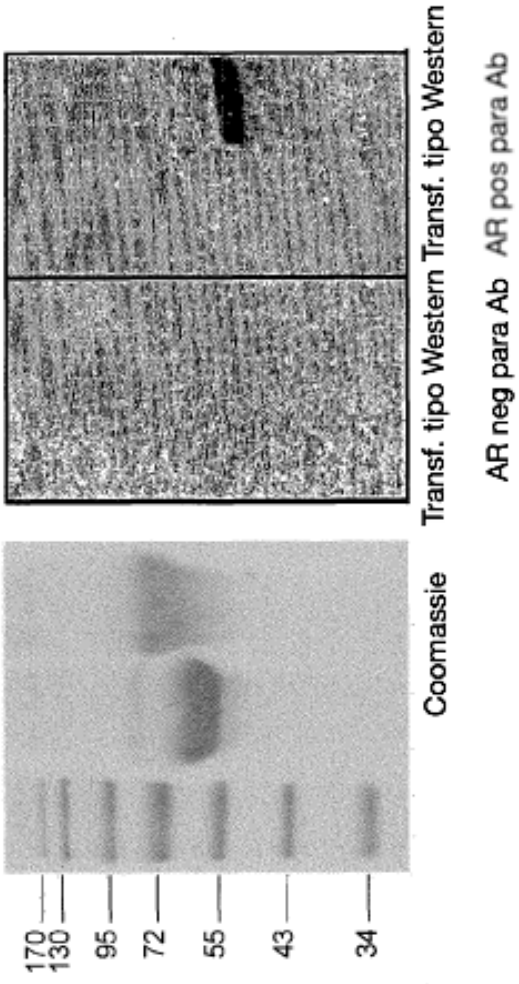
Nativo
Carb
Nativo
Carb
Nativo
Carb
170
130
95
72
55
43
34
Coomassie
Transf. tipo Western
Transf. tipo Western
AR neg para Ab
AR pos para Ab

Fig. 1C

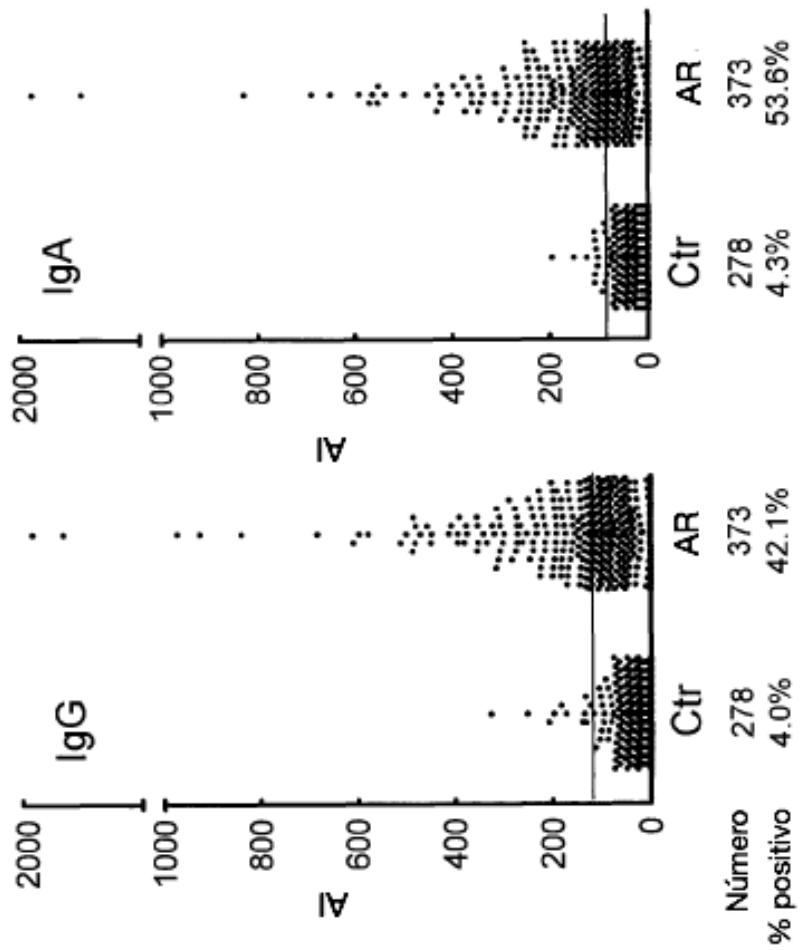
IgG
IgA
2000
1000
800
600
400
200
0
Ctr
AR
Número
% positivo
278
4.0%
373
42.1%
278
4.3%
373
53.6%

Fig. 2

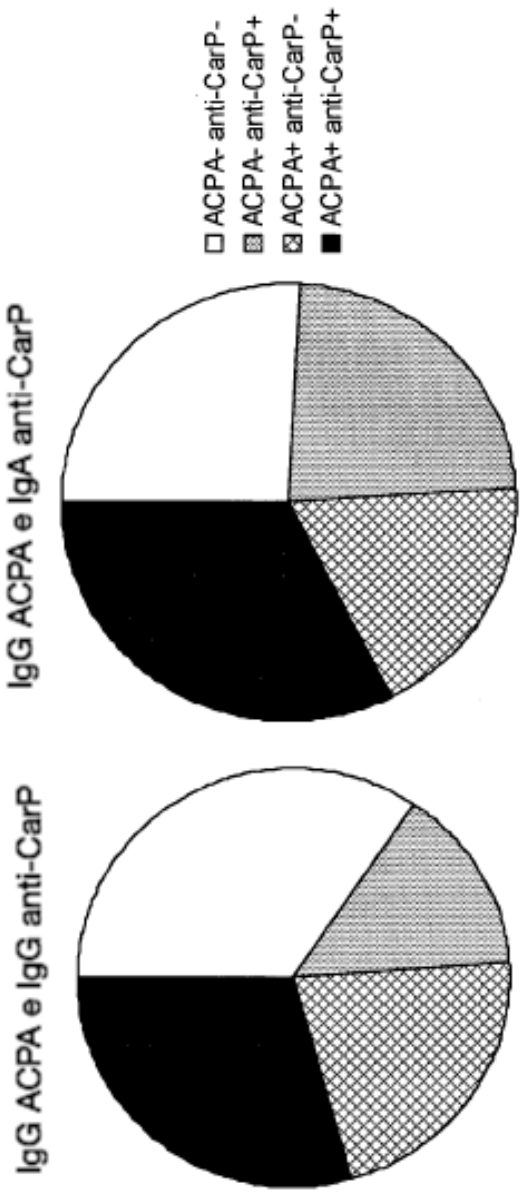
IgG ACPA e IgG anti-CarP
IgG ACPA e IgA anti-CarP
ACPA- anti-CarP-
ACPA- anti-CarP+
ACPA+ anti-CarP-
ACPA+ anti-CarP+

Fig. 3

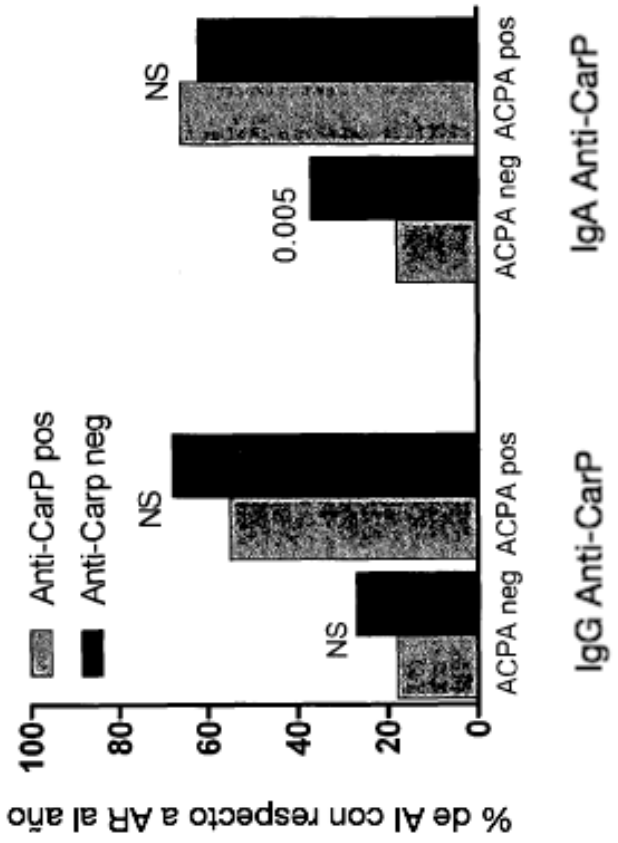
% de Al con respecto a AR al año
100
80
60
40
20
0
Anti-CarP pos
Anti-Carp neg
NS
NS
0.005
NS
ACPA neg
ACPA pos
ACPA neg
ACPA pos
IgG Anti-CarP
IgA Anti-CarP

Fig. 4

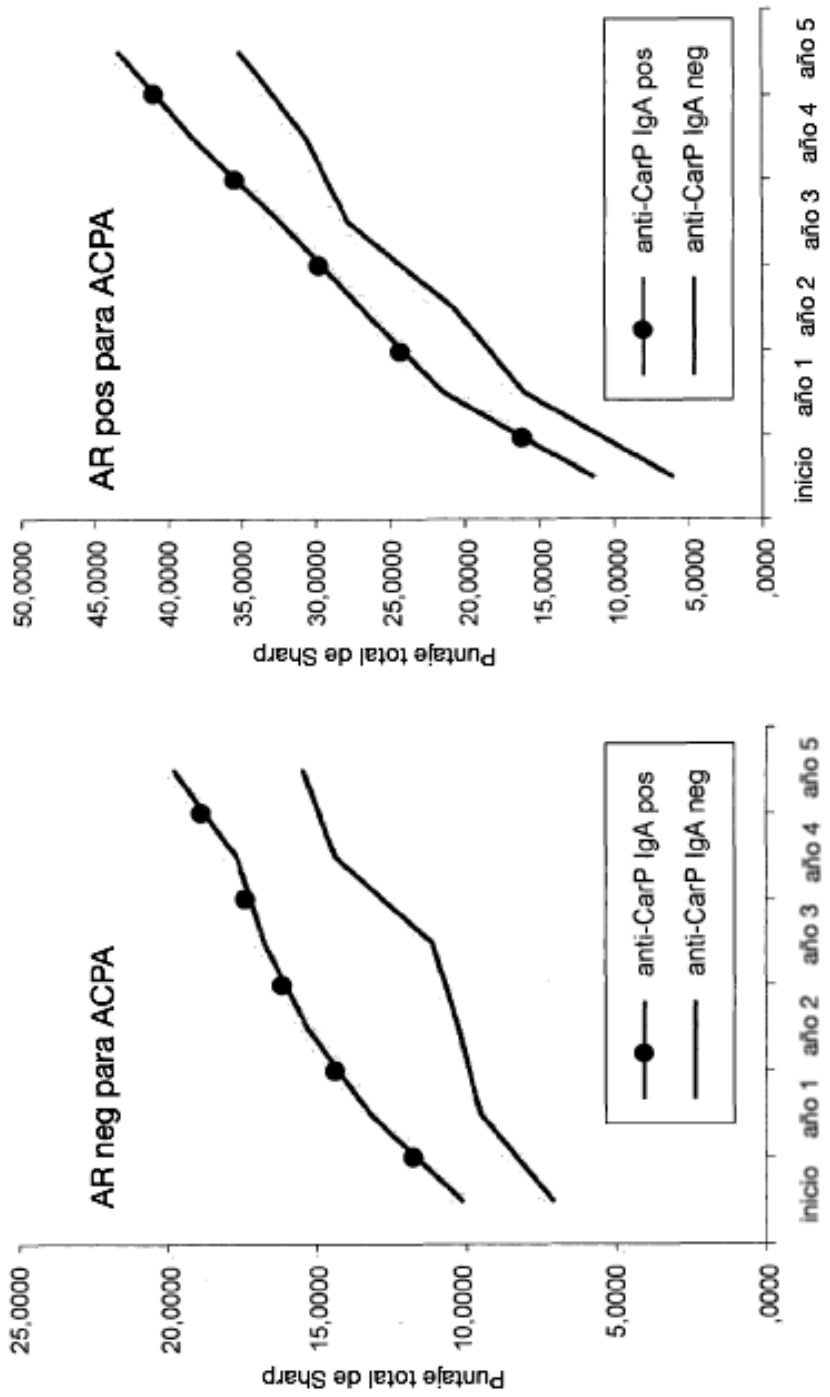
AR pos para ACPA
Puntaje total de Sharp
50,0000
45,0000
40,0000
35,0000
30,0000
25,0000
20,0000
15,0000
10,0000
5,0000
,0000
inicio
año 1
año 2
año 3
año 4
año 5
anti-CarP IgA pos
anti-CarP IgA neg
AR neg para ACPA
Puntaje total de Sharp
25,0000
20,0000
15,0000
10,0000
5,0000
,0000
inicio
año 1
año 2
año 3
año 4
año 5
anti-CarP IgA pos
anti-CarP IgA neg

Fig. 5

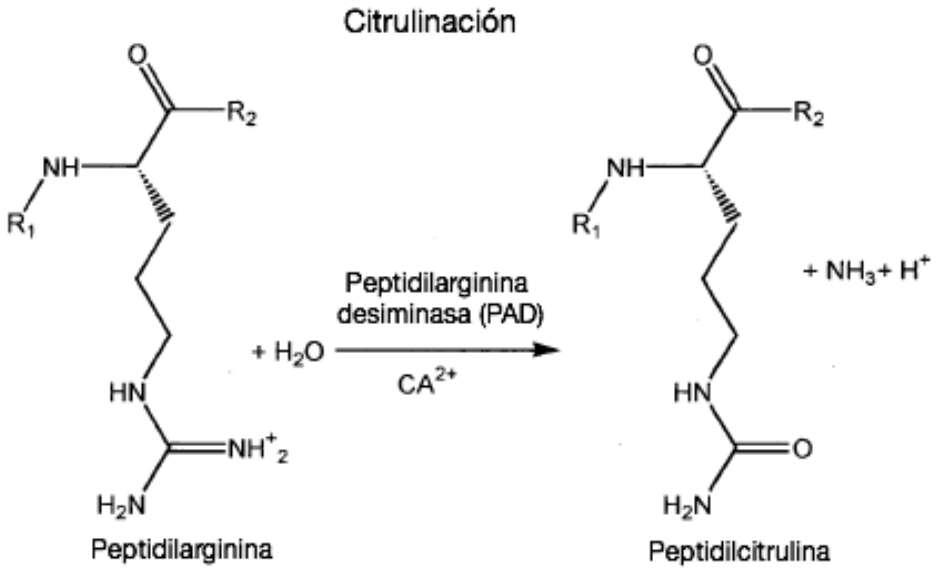
Citrulinación
Peptidilarginina desiminasa (PAD)
+ H2O
CA2+
+ NH3+ H+
Peptidilarginina
Peptidilcitrulina

Fig. 6A

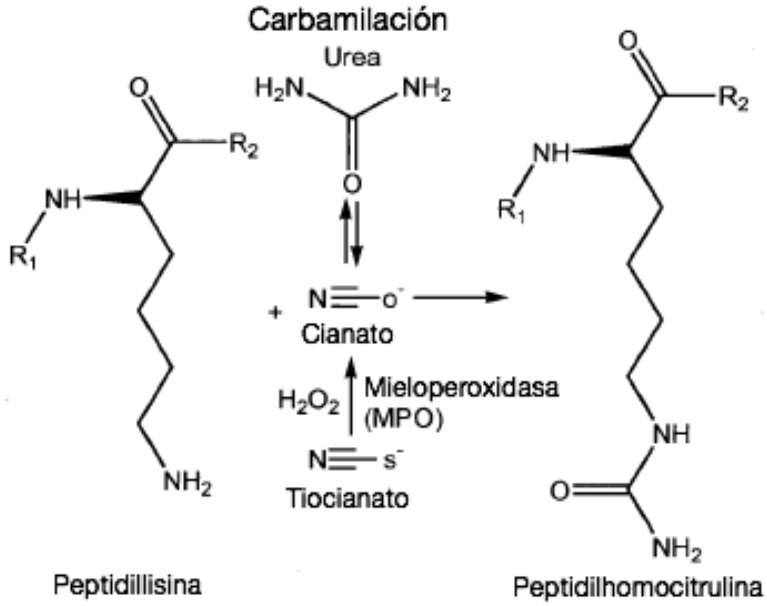
Carbamilación
Urea
Cianato
Mieloperoxidasa (MPO)
H2O2
Tiocianato
Peptidillisina
Peptidilhomocitrulina

Fig. 6B

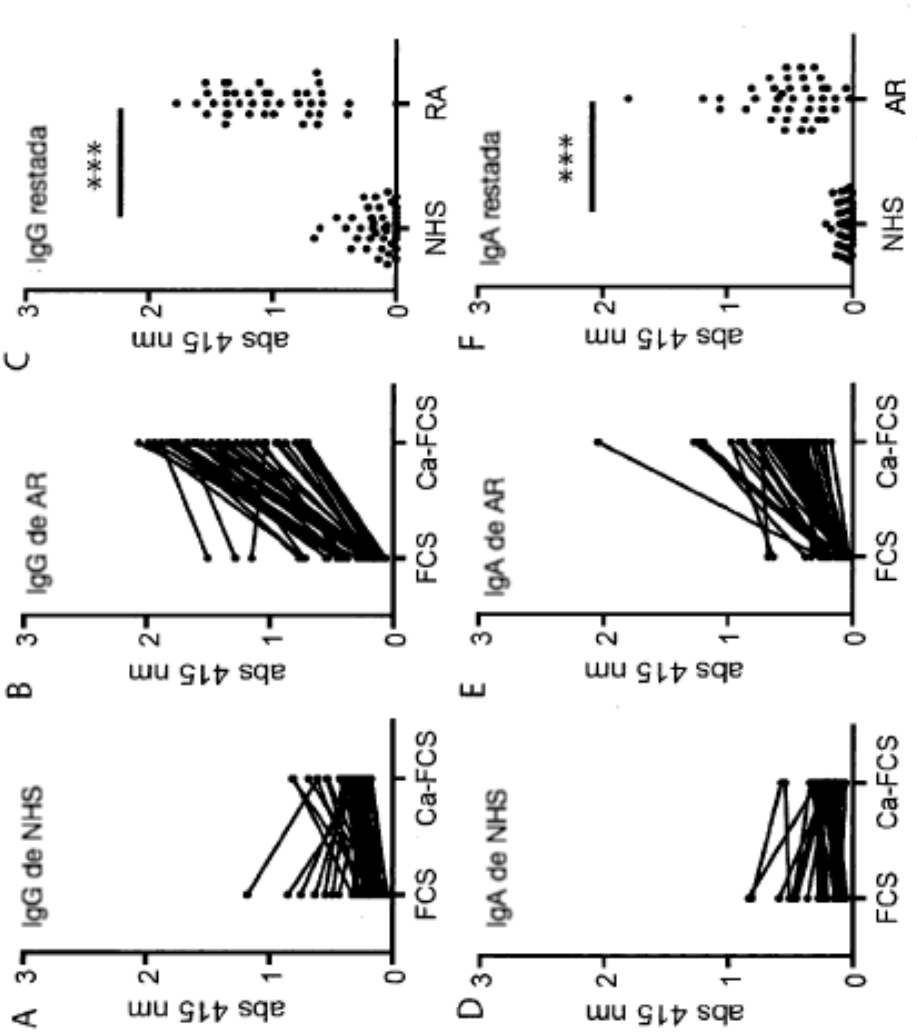
A
IgG de NHS
abs 415 nm
FCS
Ca-FCS
B
IgG de AR
C
IgG restada
***
NHS
RA
D
IgA de NHS
E
IgA de AR
F
IgA restada
AR

Fig. 7

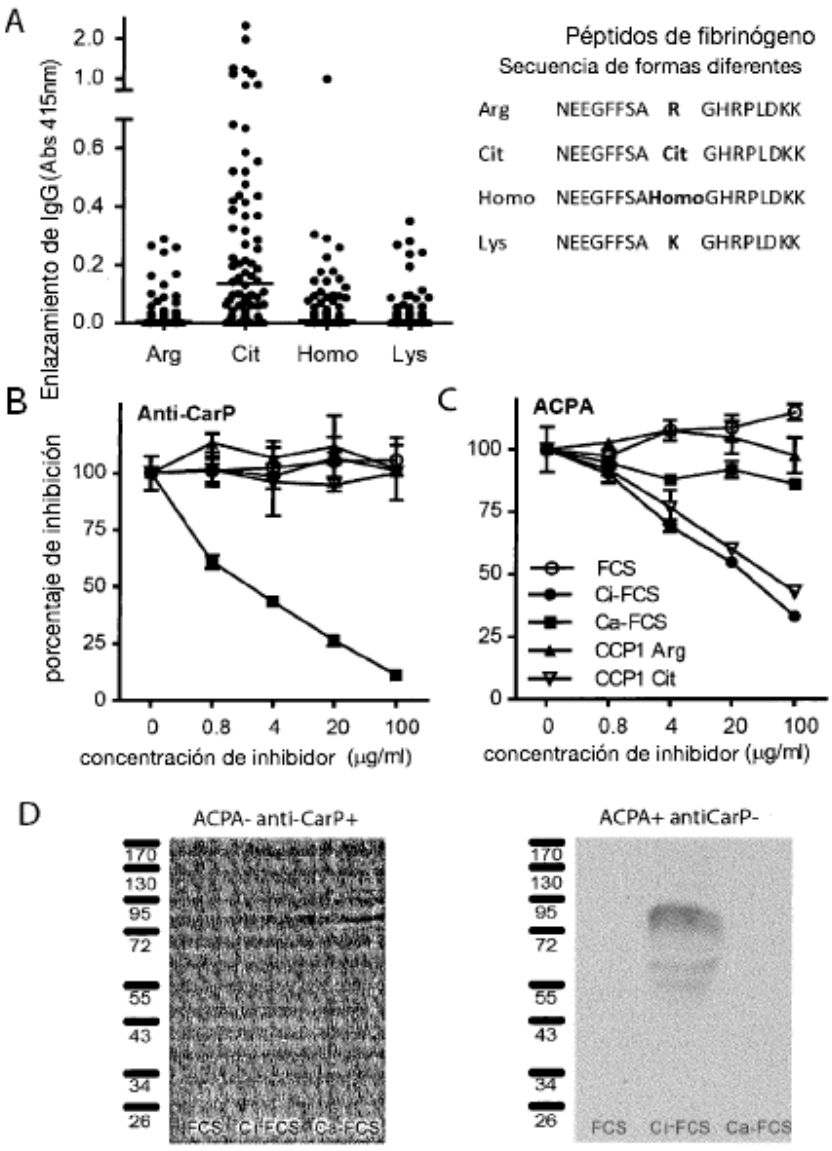
A
Enlazamiento de IgG (Abs 415nm)
2.0
1.0
0.6
0.4
0.2
0.0
Arg
Cit
Homo
Lys
Péptidos de fibrinógeno
Secuencia de formas diferentes
Arg NEEGFFSA R GHRPLDKK
Cit NEEGFFSA Cit GHRPLDKK
Homo NEEGFFSAHomoGHRPLDKK
Lys NEEGFFSA K GHRPLDKK
B
Anti-CarP
porcentaje de inhibición
100
75
50
25
0
0 0.8 4 20 100
concentración de inhibidor (µg/ml)
C
ACPA
100
75
50
25
0
FCS
Ci-FCS
Ca-FCS
CCP1 Arg
CCP1 Cit
0 0.8 4 20 100
concentración de inhibidor (µg/ml)
D
ACPA- anti-CarP+
170
130
95
72
55
43
34
26
FCS Ci-FCS Ca-FCS
ACPA+ antiCarP-
170
130
95
72
55
43
34
26
FCS Ci-FCS Ca-FCS

Fig. 8

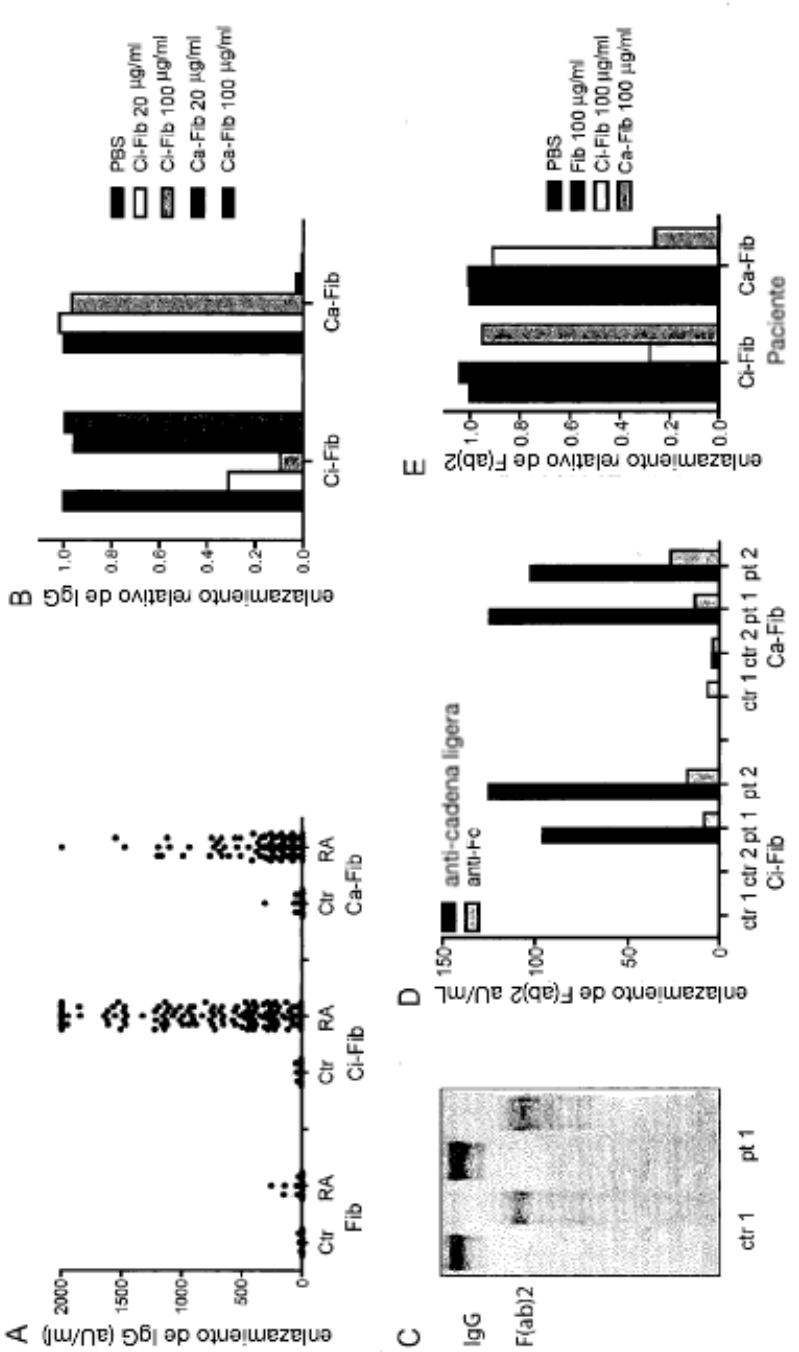
A
enlazamiento de IgG (aU/ml)
2000
1500
1000
500
0
Ctr
RA
Fib
Ctr
RA
Ci-Fib
Ctr
RA
Ca-Fib
B
enlazamiento relativo de IgG
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Ci-Fib
Ca-Fib
PBS
Ci-Fib 20 µg/ml
Ci-Fib 100 µg/ml
Ca-Fib 20 µg/ml
Ca-Fib 100 µg/ml
C
IgG
F(ab)2
ctr 1
pt 1
D
enlazamiento de F(ab)2 aU/mL
150
100
50
0
anti-cadena ligera
anti-Fc
ctr 1 ctr 2 pt 1 pt 2
Ci-Fib
ctr 1 ctr 2 pt 1 pt 2
Ca-Fib
E
enlazamiento relativo de F(ab)2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS
Fib 100 µg/ml
Ci-Fib 100 µg/ml
Ca-Fib 100 µg/ml
Ci-Fib
Ca-Fib
Paciente

Fig. 9

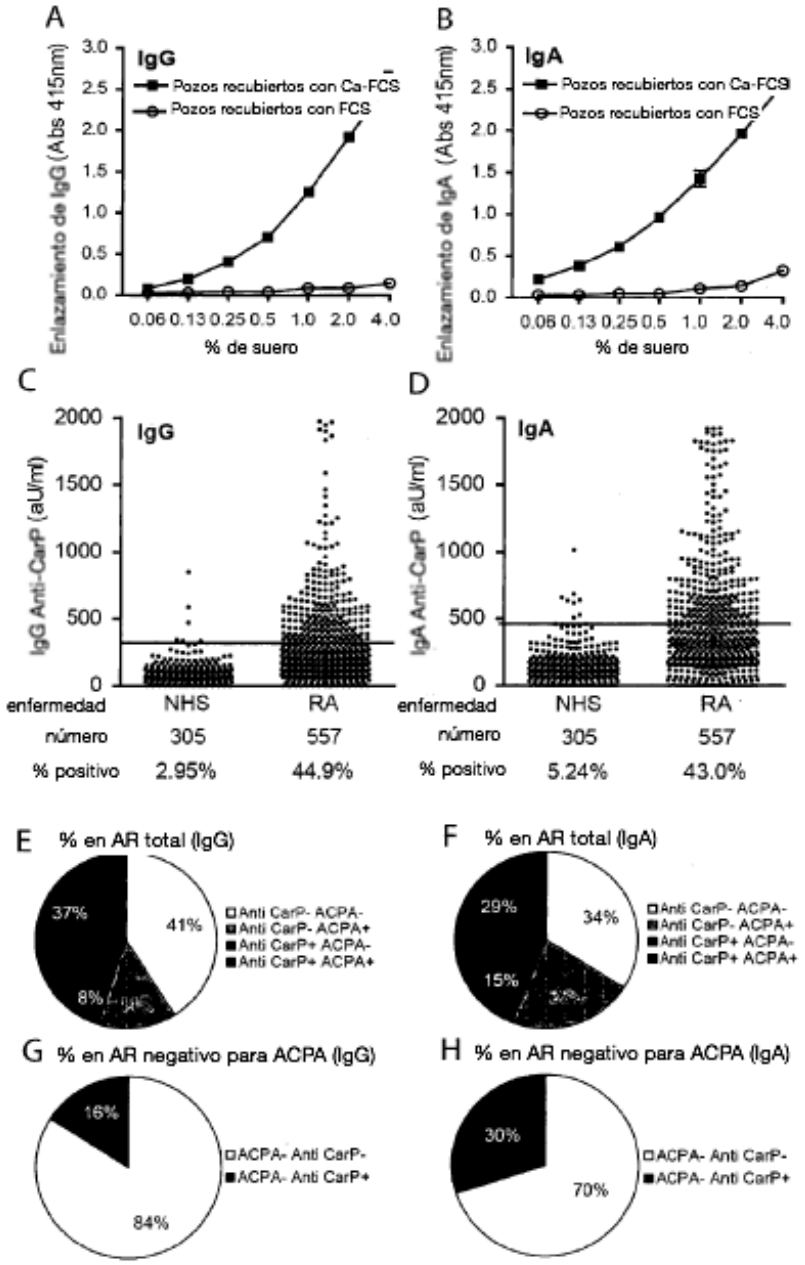
A
IgG
Pozos recubiertos con Ca-FCS
Pozos recubiertos con FCS
Enlazamiento de IgG (Abs 415nm)
% de suero
B
IgA
Pozos recubiertos con Ca-FCS
Pozos recubiertos con FCS
Enlazamiento de IgA (Abs 415nm)
% de suero
C
IgG
IgG Anti-CarP (aU/ml)
enfermedad NHS RA
número 305 557
% positivo 2.95% 44.9%
D
IgA
IgA Anti-CarP (aU/ml)
enfermedad NHS RA
número 305 557
% positivo 5.24% 43.0%
E % en AR total (IgG)
37%
41%
8%
Anti CarP- ACPA-
Anti CarP- ACPA+
Anti CarP+ ACPA-
Anti CarP+ ACPA+
F % en AR total (IgA)
29%
34%
15%
Anti CarP- ACPA-
Anti CarP- ACPA+
Anti CarP+ ACPA-
Anti CarP+ ACPA+
G % en AR negativo para ACPA (IgG)
16%
84%
ACPA- Anti CarP-
ACPA- Anti CarP+
H % en AR negativo para ACPA (IgA)
30%
70%
ACPA- Anti CarP-
ACPA- Anti CarP+

Fig. 10

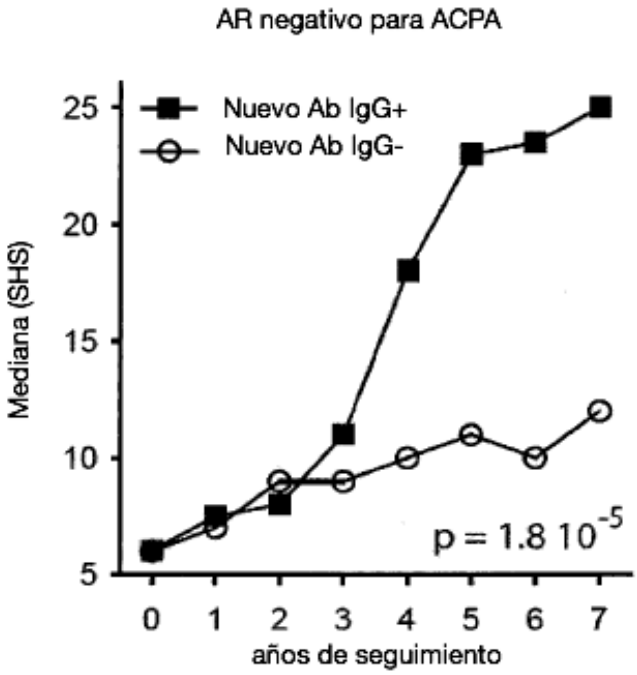
AR negativo para ACPA
Nuevo Ab IgG+
Nuevo Ab IgG-
Mediana (SHS)
25
20
15
10
5
p = 1.8 10-5
0 1 2 3 4 5 6 7
años de seguimiento

Fig. 11

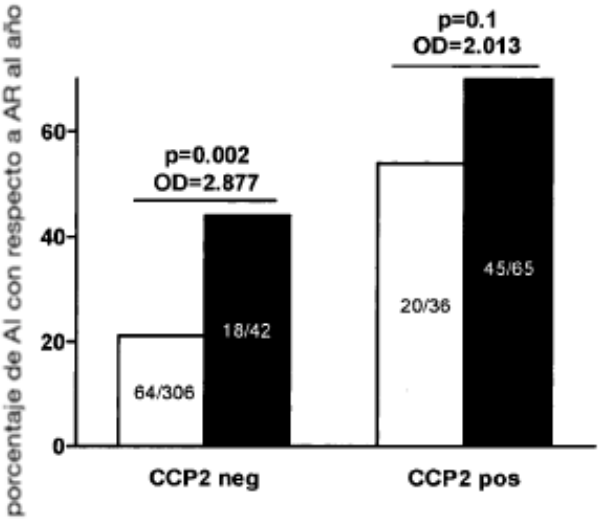

Fig. 12A

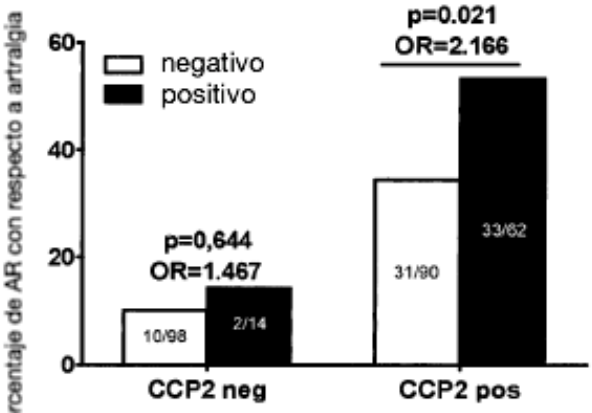

Fig. 12B

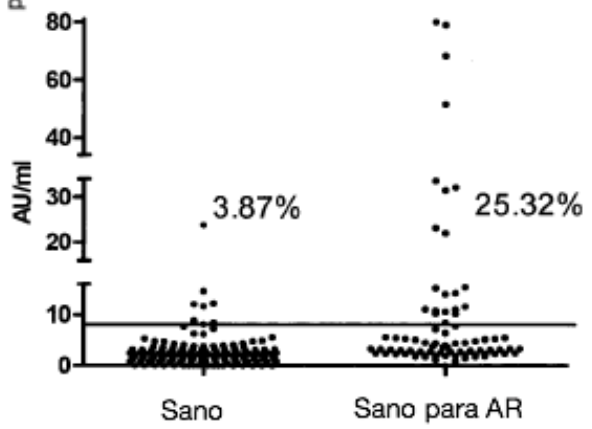

Fig. 12C

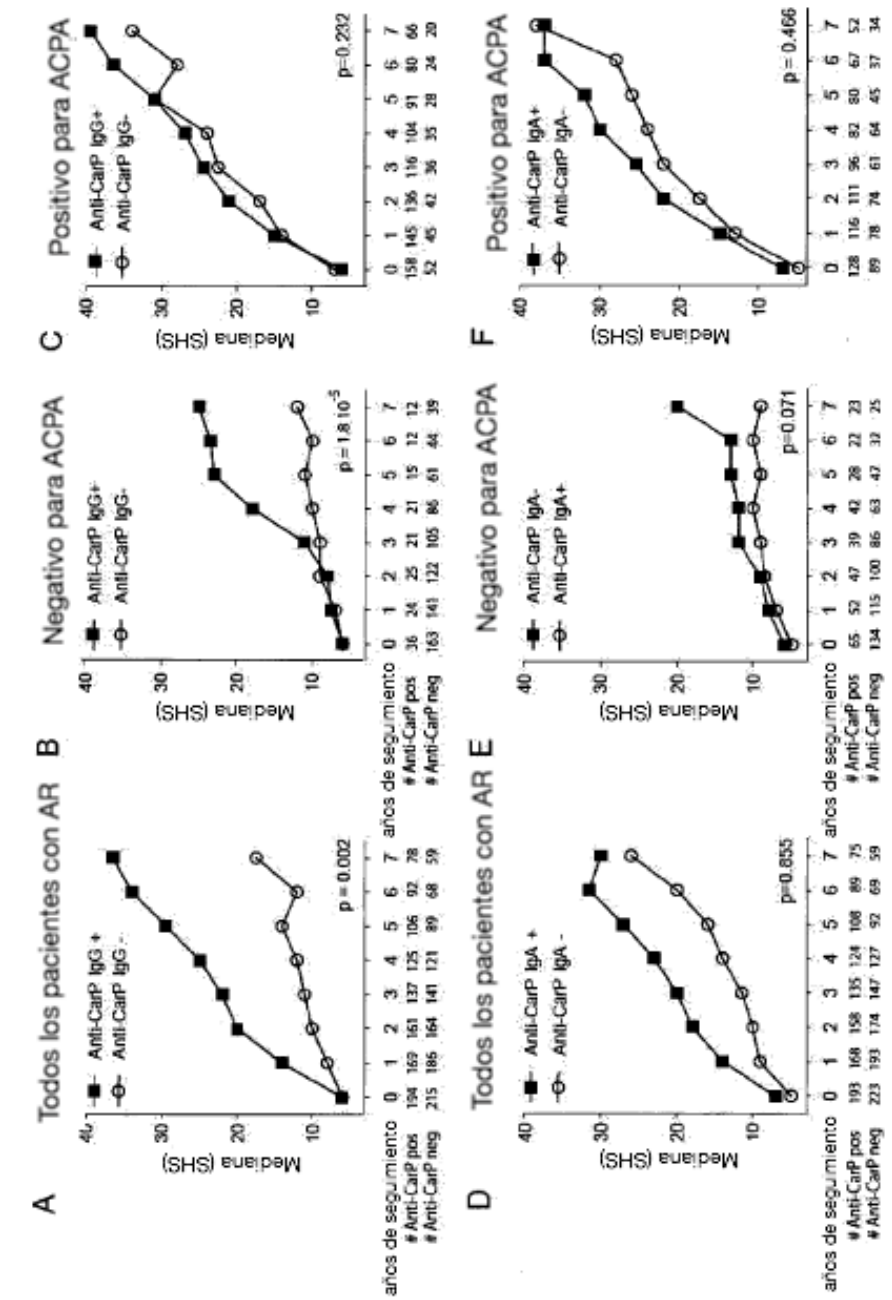
A
Todos los pacientes con AR
Anti-CarP IgG +
Anti-CarP IgG -
Mediana (SHS)
p = 0.002
años de seguimiento 0 1 2 3 4 5 6 7
Anti-CarP pos 194 169 161 137 125 106 92 78
Anti-CarP neg 215 185 164 141 121 89 68 59
B
Negativo para ACPA
Anti-CarP IgG+
Anti-CarP IgG-
Mediana (SHS)
p = 1.8 10-5
años de seguimiento 0 1 2 3 4 5 6 7
Anti-CarP pos 36 24 25 21 21 15 12 12
Anti-CarP neg 163 141 122 105 86 61 44 39
C
Positivo para ACPA
Anti-CarP IgG+
Anti-CarP IgG-
Mediana (SHS)
p=0.232
0 1 2 3 4 5 6 7
158 145 136 116 104 91 80 66
52 45 42 36 35 28 24 20
D
Todos los pacientes con AR
Anti-CarP IgA +
Anti-CarP IgA -
Mediana (SHS)
p=0.855
años de seguimiento 0 1 2 3 4 5 6 7
Anti-CarP pos 193 168 158 135 124 108 89 75
Anti-CarP neg 223 193 174 147 127 92 69 59
E
Negativo para ACPA
Anti-CarP IgA-
Anti-CarP IgA+
Mediana (SHS)
p=0.071
años de seguimiento 0 1 2 3 4 5 6 7
Anti-CarP pos 65 52 47 39 42 28 22 23
Anti-CarP neg 134 115 100 86 63 47 32 25
F
Positivo para ACPA
Anti-CarP IgA+
Anti-CarP IgA-
Mediana (SHS)
p = 0.466
0 1 2 3 4 5 6 7
128 116 111 96 82 80 67 52
89 78 74 61 64 45 37 34

Fig. 13

Secuencia de aminoácidos de Fibrinógeno alfa

```
        10         20         30         40         50         60
MFSMRIVCLV LSVVGTAWTA DSGEGDFLAE GGGVRGPRVV ERHQSACKDS DWPFCSDEDW
        70         80         90        100        110        120
NYKCPSGCRM KGLIDEVNQD FTNRINKLKN SLFEYQKNNK DSHSLTTNIM EILRGDFSSA
       130        140        150        160        170        180
NNRDNTYNRV SEDLRSRIEV LKRKVIEKVQ HIQLLQKNVR AQLVDMKRLE VDIDIKIRSC
       190        200        210        220        230        240
RGSCSRALAR EVDLKDYEDQ QKQLEQVIAK DLLPSRDRQH LPLIKMKPVP DLVPGNFKSQ
       250        260        270        280        290        300
LQKVPPEWKA LTDMPQMRME LERPGGNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS SAGSWNSGSS
       310        320        330        340        350        360
GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKPGSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQNPG SPRPGSTGTW
       370        380        390        400        410        420
NPGSSERGSA GHWTSESSVS GSTGQWHSES GSFRPDSPGS GNARPNNPDW GTFEEVSGNV
       430        440        450        460        470        480
SPGTRREYHT EKLVTSKGDK ELRTGKEKVT SGSTTTTRRS CSKTVTKTVI GPDGHKEVTK
       490        500        510        520        530        540
EVVTSEDGSD CPEAMDLGTL SGIGTLDGFR HRHPDEAAFF DTASTGKTFP GFFSPMLGEF
       550        560        570        580        590        600
VSETESRGSE SGIFTNTKES SSHHPGIAEF PSRGKSSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS
       610        620        630        640        650        660
YKMADEAGSE ADHEGTHSTK RGHAKSRPVR DCDDVLQTHP SGTQSGIFNI KLPGSSKIFS
       670        680        690        700        710        720
VYCDQETSLG GWLLIQQRMD GSLNFNRTWQ DYKRGFGSLN DEGEGEFWLG NDYLHLLTQR
       730        740        750        760        770        780
GSVLRVELED WAGNEAYAEY HFRVGSEAEG YALQVSSYEG TAGDALIEGS VEEGAEYTSH
       790        800        810        820        830        840
NNMQFSTFDR DADQWEENCA EVYGGGWWYN NCQAANLNGI YYPGGSYDPR NNSPYEIENG
       850        860
VVWVSFRGAD YSLRAVRMKI RPLVTQ
```

Fig. 14

Secuencia de aminoácidos de Fibrinógeno beta

```
        10         20         30         40         50         60
MKRMVSWSFH KLKTMKHLLL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF FSARGHRPLD KKREEAPSLR
        70         80         90        100        110        120
PAPPPISGGG YRARPAKAAA TQKKVERKAP DAGGCLHADP DLGVLCPTGC QLQEALLQQE
       130        140        150        160        170        180
RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQYMYL LKDLWQKRQK QVKDNENVVN EYSSELEKHQ
       190        200        210        220        230        240
LYIDETVNSN IPTNLRVLRS ILENLRSKIQ KLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS
       250        260        270        280        290        300
CEEIIRKGGE TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENGGWT VIQNRQDGSV DFGRKWDPYK
       310        320        330        340        350        360
QGFGNVATNT DGKNYCGLPG EYWLGNDKIS QLTRMGPTEL LIEMEDWKGD KVKAHYGGFT
       370        380        390        400        410        420
VQNEANKYQI SVNKYRGTAG NALMDGASQL MGENRTMTIH NGMFFSTYDR DNDGWLTSDP
       430        440        450        460        470        480
RKQCSKEDGG GWWYNRCHAA NPNGRYYWGG QYTWDMAKHG TDDGVVWMNW KGSWYSMRKM
       490
SMKIRPFFPQ Q
```

Fig. 15

Secuencia de aminoácidos de Fibrinógeno gamma

```
        10         20         30         40         50         60
MSWSLHPRNL ILYFYALLFL SSTCVAYVAT RDNCCILDER FGSYCPTTCG IADFLSTYQT
        70         80         90        100        110        120
KVDKDLQSLE DILHQVENKT SEVKQLIKAI QLTYNPDESS KPNMIDAATL KSRKMLEEIM
       130        140        150        160        170        180
KYEASILTHD SSIRYLQEIY NSNNQKIVNL KEKVAQLEAQ CQEPCKDTVQ IHDITGKDCQ
       190        200        210        220        230        240
DIANKGAKQS GLYFIKPLKA NQQFLVYCEI DGSGNGWTVF QKRLDGSVDF KKNWIQYKEG
       250        260        270        280        290        300
FGHLSPTGTT EFWLGNEKIH LISTQSAIPY ALRVELEDWN GRTSTADYAM FKVGPEADKY
       310        320        330        340        350        360
RLTYAYFAGG DAGDAFDGFD FGDDPSDKFF TSHNGMQFST WDNDNDKFEG NCAEQDGSGW
       370        380        390        400        410        420
WMNKCHAGHL NGVYYQGGTY SKASTPNGYD NGIIWATWKT RWYSMKKTTM KIIPFNRLTI
       430        440        450
GEGQQHHLGG AKQVRPEHPA ETEYDSLYPE DDL
```

Fig. 16

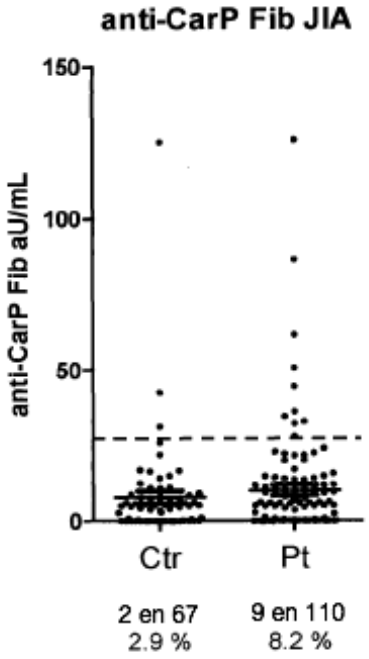
anti-CarP Fib JIA
anti-CarP Fib aU/mL
150
100
50
0
Ctr
Pt
2 en 67
2.9 %
9 en 110
8.2 %

Fig. 17