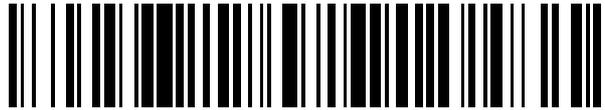


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 051**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2015 PCT/US2015/041448**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16014612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2015 E 15825438 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3042201**

54 Título: **Composiciones y métodos para el diagnóstico de la artritis reumatoide**

30 Prioridad:

**23.07.2014 US 201462028270 P**

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

**12.11.2020**

73 Titular/es:

**INOVA DIAGNOSTICS, INC. (50.0%)**

**9900 Old Grove Road**

**San Diego, CA 92131, US y**

**LEIDEN UNIVERSITY MEDICAL CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MAHLER, MICHAEL;**

**TROUW, LEENDERT A.;**

**DRIJFHOUT, JAN WOUTER;**

**VAN VEELLEN, PETER;**

**TOES, RENÉ y**

**HUIZINGA, TOM**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 793 051 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el diagnóstico de la artritis reumatoide

### Campo

5 La presente descripción se refiere al campo de la biología molecular y, de modo más específico, a métodos para detectar anticuerpos antiproteína carbamilada ("anti-carbamylated protein", anti-CarP) en el suero de pacientes con artritis reumatoide (AR).

### Antecedentes

10 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria que ataca principalmente a las articulaciones sinoviales. Investigaciones recientes han demostrado que la población de pacientes con AR es heterogénea y que ciertos autoanticuerpos pueden usarse como biomarcadores para clasificar subgrupos de pacientes con AR y predecir diferentes cursos de avance de la enfermedad para diferentes subgrupos de pacientes.

15 Los autoanticuerpos dirigidos contra proteínas citrulinadas (ACPA) son biomarcadores establecidos en la AR y están incluidos, por ejemplo, en los criterios para la AR de 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (véase, por ejemplo, Aletaha D. *et al.*, 2010, Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative, *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, 69,1580-1588). Los pacientes con AR que forman ACPA en general sufren un curso más grave de la enfermedad, tienen menos probabilidad de entrar en una remisión sin fármacos y están sujetos a un conjunto diferente de factores de riesgo ambientales y genéticos que los pacientes con AR que no forman ACPA.

20 En fechas recientes, se ha descubierto una segunda clase de biomarcadores de autoanticuerpos para la AR que complementa la información de diagnóstico y de pronóstico proporcionada por los ACPA. Las investigaciones han demostrado que puede predecirse un curso más grave de la enfermedad en pacientes con AR negativos a ACPA basándose en la detección de autoanticuerpos dirigidos contra proteínas carbamiladas (anticuerpos anti-CarP). La presencia de anticuerpos anti-CarP está asociada con un avance más radiológico de la AR y con la conversión del dolor articular no inflamatorio (artralgia) en AR clínicamente manifestada que, en último término, provoca una enfermedad inflamatoria crónica sistémica.

25 Pueden detectarse anticuerpos anti-CarP en muestras de suero muchos años antes de la aparición de los síntomas clínicos de la AR. La detección temprana de anticuerpos anti-CarP puede permitir a los candidatos en riesgo de AR o a los pacientes con AR de estadio temprano tomar medidas preventivas para mejorar, retrasar o evitar la aparición de la AR. Sin embargo, un desarrollo más amplio de los anticuerpos anti-CarP como biomarcadores de diagnóstico y de pronóstico en la AR se ve impedido por las limitaciones de los ensayos de anticuerpos anti-CarP existentes.

30 Por tanto, son necesarios nuevos métodos para detectar anticuerpos anti-CarP. La presente descripción soluciona esta necesidad proporcionando nuevas composiciones y métodos para el desarrollo de ensayos de anticuerpos anti-CarP y también proporciona ventajas relacionadas.

### Sumario

35 La invención proporciona, en general, composiciones y métodos para el diagnóstico y el pronóstico de la artritis reumatoide.

40 En un primer aspecto, la invención proporciona un complejo que comprende un polipéptido purificado que comprende una alfa-1-antitripsina humana (hA1AT) carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, y uno o más anticuerpos anti-CarP humanos, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT, y en el que el anticuerpo anti-CarP reconoce específicamente a hA1AT, o a uno de sus fragmentos, en su forma carbamilada, pero no en su forma no carbamilada.

En una realización, el complejo está en disolución. En otra realización, el complejo está inmovilizado sobre una superficie.

45 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para detectar un anticuerpo anti-CarP en un sujeto que padece artritis reumatoide (AR), un sujeto sospechoso de padecer AR o un sujeto sospechoso de estar en riesgo de desarrollar AR, que comprende: (a) poner en contacto una muestra de un fluido biológico procedente del sujeto con un polipéptido purificado que comprende una hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP de la muestra y el polipéptido purificado; y (b) detectar la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado.

50 En una realización, la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende uno o más sitios de unión al anticuerpo anti-CarP, cada uno de los cuales puede estar independientemente en un estado carbamilado o en un estado no carbamilado, y en la que el anticuerpo anti-CarP procedente de pacientes con artritis reumatoide humanos se une a los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en sus estados carbamilados, pero no en su estado no

carbamilado, para formar complejos de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP.

En una realización, la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado se detecta mediante un ensayo seleccionado del grupo que consiste en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("enzyme-linked immunosorbent assay", ELISA), un ensayo inmunoabsorbente fluorescente ("fluorescent immunosorbent assay", FIA), un inmunoensayo de quimioluminiscencia ("chemiluminescence immunoassay", CIA), un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo multiplicado por enzimas, un radioinmunoensayo en fase sólida ("solid phase radioimmunoassay", SPROA), un ensayo de polarización de fluorescencia ("fluorescence polarization", FP), un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia ("fluorescence resonance energy transfer", FRET), un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia de resolución en el tiempo ("time-resolved fluorescence resonance energy transfer", TR-FRET), un ensayo de resonancia de plasmón de superficie ("surface plasmon resonance", SPR), y un ensayo de transferencia por puntos ("Dot-Blot"). En otra realización, la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado comprende establecer un nivel del anticuerpo anti-CarP en la muestra. En otra realización, la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido comprende comparar el nivel del anticuerpo anti-CarP en la muestra procedente del sujeto con un nivel control del anticuerpo anti-CarP en una muestra procedente de un individuo control sano, en la que un aumento en el nivel de anticuerpo anti-CarP en la muestra, comparado con el nivel control, indica que el sujeto padece AR.

En otra realización, el método comprende además la etapa inicial de preparar el polipéptido purificado. En otra realización, el método comprende además inmovilizar el polipéptido purificado sobre una superficie. En otra realización, la muestra de fluido biológico es una muestra de sangre, suero, plasma, orina o leche.

En otra realización, se sospecha que el sujeto padece artritis reumatoide (AR). En otra realización, el sujeto es negativo a anticuerpos antiproteína citrulinada ("anti-citrullinated protein antibodies", ACPA).

En una realización del segundo aspecto para diagnosticar la artritis reumatoide (AR) en un sujeto sospechoso de padecer AR, la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado indica que el sujeto padece AR. En otra realización, el polipéptido purificado es un polipéptido recombinante purificado codificado por ADNc.

En otra realización, el polipéptido purificado comprende hA1AT, o uno de sus fragmentos, purificada a partir de sangre, suero, plasma, orina o fluido sinovial. En otra realización, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los restos lisina en la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, está carbamilado.

En otra realización, la hA1AT carbamilada *in vitro* comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra realización, la hA1AT carbamilada *in vitro* tiene más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1. En otra realización, la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende un fragmento de 8 o más aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1. En otra realización, la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende un fragmento de 8 o más aminoácidos contiguos con más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1. En otra realización, la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3-32. En otra realización, la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:33-203.

En una realización del segundo aspecto para determinar la prognosis de la artritis reumatoide (AR) en un sujeto humano, la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado predice el curso del avance de la AR en el sujeto humano.

En otra realización, el sujeto humano es un sujeto asintomático sospechoso de estar en riesgo de desarrollar AR. En otra realización, el sujeto es un paciente con artralgia.

En otra realización, la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado indica que el paciente tiene un riesgo mayor de desarrollar AR que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado, y opcionalmente el sujeto humano es un paciente con AR que presenta un síntoma clínico de AR. En otra realización, la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado predice un curso clínico más grave del avance de la enfermedad de la AR que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado. En otra realización, la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en un paciente indica un riesgo mayor en aproximadamente 10-20% de que un paciente con artralgia desarrolle AR dentro de cinco años desde la determinación de la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado.

En otra realización, la muestra es negativa para anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPA). En otra realización, la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado comprende determinar el nivel de anticuerpo anti-CarP en la muestra. En otra realización, un nivel mayor del anticuerpo anti-CarP en la muestra indica un riesgo mayor de que un paciente asintomático desarrolle AR que un nivel menor del anticuerpo anti-CarP. En otra realización, un nivel mayor del anticuerpo anti-CarP en la muestra predice un curso

más grave del futuro avance de la enfermedad en un paciente con AR que un nivel menor del anticuerpo anti-CarP.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para controlar la eficacia de un tratamiento de la artritis reumatoide (AR) en un paciente con AR, que comprende: (a) poner en contacto dos o más muestras obtenidas del paciente en un primer momento y en un posterior momento a lo largo del curso del tratamiento de la AR con un polipéptido purificado que comprende una hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP de las dos o más muestras y el polipéptido purificado; (b) determinar el nivel del anticuerpo anti-CarP para cada una de dichas dos o más muestras; y (c) comparar el nivel del anticuerpo anti-CarP entre dichas dos o más muestras, en el que un nivel disminuido del anticuerpo anti-CarP en una o más muestras obtenidas en un momento posterior con relación al nivel de anticuerpo anti-CarP obtenido en el primer momento indica que el tratamiento de la AR es eficaz, y un nivel estable o aumentado del anticuerpo anti-CarP indica que el tratamiento de la AR no es eficaz.

En una realización, el nivel del anticuerpo anti-CarP en las muestras obtenidas en un momento posterior disminuye en más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99%.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un kit para detectar un anticuerpo anti-CarP, para diagnosticar, controlar o pronosticar la artritis reumatoide (AR), o para determinar la eficacia de un tratamiento de la AR en un sujeto, que comprende un fragmento de hA1AT carbamylada *in vitro* purificado, y un agente auxiliar, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT.

En una realización, el polipéptido purificado está inmovilizado sobre un soporte sólido. En otra realización, el reactivo auxiliar se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo secundario, un reactivo de detección, un tampón de inmovilización, un tampón de bloqueo, un tampón de lavado y un tampón de detección; opcionalmente en el que (a) el anticuerpo secundario se selecciona de un anticuerpo anti-IgA humana, un anticuerpo anti-IgD humana, un anticuerpo anti-IgE humana, un anticuerpo anti-IgG humana, y un anticuerpo anti-IgM humana; o (b) el reactivo de detección comprende un reactivo de detección fluorescente o un reactivo de detección luminiscente, opcionalmente en el que el reactivo de detección luminiscente comprende luminol o luciferina.

En algunas realizaciones de los métodos o los kits de la invención, el anticuerpo anti-CarP es una pluralidad de anticuerpos anti-CarP. En otras realizaciones, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los restos lisina están carbamylados en la hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, de más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los polipéptidos purificados en la pluralidad de polipéptidos purificados.

En algunas realizaciones de los métodos o los kits de la invención, la hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende uno o más sitios de unión al anticuerpo antiproteína carbamylada (anti-CarP), y cada uno de ellos puede estar independientemente en un estado carbamylado o en un estado no carbamylado, y en los que un anticuerpo anti-CarP procedente de pacientes humanos con AR se une a los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en su estado carbamylado, pero no en su estado no carbamylado, para formar un complejo de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP; y opcionalmente, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, o más del 90% de los sitios de unión del anticuerpo anti-CarP están en sus estados carbamylados. En otras realizaciones, el polipéptido purificado es una pluralidad de polipéptidos purificados; y opcionalmente, en el que más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, o más del 90% de los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP están en su estado carbamylado en más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los polipéptidos purificados en la pluralidad de polipéptidos purificados.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un fragmento de hA1AT carbamylada *in vitro* purificado, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT.

En la presente se describe un método para controlar la eficacia de un tratamiento de la AR en un paciente con AR, que incluye a) poner en contacto dos o más muestras obtenidas del paciente en un primer momento y en un posterior momento a lo largo del curso del tratamiento de la AR con un polipéptido purificado que incluye una hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP de las dos o más muestras y el polipéptido purificado; b) determinar el nivel del anticuerpo anti-CarP para cada una de dichas dos o más muestras; y c) comparar el nivel del anticuerpo anti-CarP entre dichas dos o más muestras, en el que un nivel disminuido del anticuerpo anti-CarP en una o más muestras obtenidas en un momento posterior con relación al nivel de anticuerpo anti-CarP obtenido en el primer momento indica que el tratamiento de la AR es eficaz.

En algunos casos, el nivel del anticuerpo anti-CarP en las muestras obtenidas en un momento posterior disminuye en más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99%.

En el contexto de la invención, debe entenderse que las referencias a A1AT se refieren a la A1AT humana.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un esquema que ilustra la carbamitación como una modificación postraduccional de una proteína.

5 La figura 2 muestra una gráfica que ilustra un análisis de ELISA fraccionario de suero de ternero fetal carbamitado ("carbamyated fetal calf serum", Car-FCS), separado mediante HPLC de intercambio iónico (MonoQ). La figura 2A compara las fracciones de la HPLC con respecto a su contenido relativo en proteínas (círculos blancos), su reactividad con un anticuerpo de IgG humana anti-CarP (cuadrados negros) y su reactividad con suero normal (PMDx, rombos blancos). La figura 2B compara fracciones de la HPLC seleccionadas con respecto a su reactividad  
10 con muestras de suero procedentes de pacientes CarP<sup>+</sup>/ACPA<sup>-</sup> RA (BVx0038: círculo blanco; BVx0077: triángulo blanco), pacientes CarP<sup>+</sup>/ACPA<sup>+</sup> RA (BVx0032: rombos blancos; BVx0008: cruz doble) y controles normales (Neg (PMDx 1193); Neg (PMDx 1196); cruces).

La figura 3 ilustra la identificación de A1AT como la principal proteína carbamitada en la fracción 1G4 de HPLC. La figura 3A ilustra el análisis de muestras procedentes de la fracción 1G4 de HPLC en un gel de SDS-PAGE. Las  
15 bandas de proteínas 3 y 4 se cortaron y se retiraron, y se sometieron a digeridos con quimotripsina. Las figuras 3B y 3C ilustran los resultados del análisis de espectrometría de masas ("mass-spectrometry", MS) de las bandas de proteínas 3 y 4. Los fragmentos de la A1AT se identificaron con unas puntuaciones de probabilidad del >95%. La figura 3B muestra un listado de proteínas identificadas en las bandas de proteínas 3 y 4, independientemente de la presencia de restos lisina carbamitados en las proteínas. La figura 3C muestra un listado de proteínas en las bandas  
20 de proteínas 3 y 4 que contienen restos lisina carbamitados.

La figura 4 ilustra la detección de anticuerpos anti-CarP en muestras de suero procedentes de pacientes humanos con AR usando suero de ternero fetal no carbamitado o carbamitado *in vitro* (Ca-FCS) y A1AT humana no carbamitada o carbamitada *in vitro* (Ca-A1AT). Se representan las señales de absorbancia relativa de ELISA colorimétricos para cada muestra de paciente y cada antígeno no carbamitado o carbamitado. La figura 4 demuestra  
25 que el reconocimiento de antígenos de los anticuerpos anti-CarP en muestras de suero procedentes de pacientes humanos con AR es específica de la carbamitación.

La figura 5 ilustra la detección de anticuerpos anti-CarP en muestras de suero procedentes de pacientes humanos con AR usando suero de ternero fetal carbamitado *in vitro* (Ca-FCS) o A1AT humana carbamitada *in vitro* (Ca-A1AT). Los resultados de ejemplos de ensayos de ELISA de Ca-FCS se representan gráficamente frente a los resultados de los correspondientes ejemplos de ensayos de A1AT. La figura 5 demuestra que la inmunorreactividad anti-Ca-FCS de los anticuerpos anti-CarP se correlaciona con su actividad contra Ca-A1AT.  
30

La figura 6 ilustra un ejemplo de comparación de suero de ternero fetal carbamitado *in vitro* (Ca-FCS) y A1AT humana carbamitada *in vitro* (Ca-A1AT) en la discriminación de pacientes con AR y controles sanos. La figura 6A muestra los resultados de un análisis de característica operativa del receptor ("receiver operating characteristic", ROC) comparativo (eje de abscisas: tasa de negativos verdaderos; eje de ordenadas: tasa de positivos verdaderos; Ca-FCS: cuadrados negros; CA-A1AT: rombos blancos). La figura 6B muestra una comparación de las sensibilidades de ensayo de Ca-FCS y Ca-A1AT a una especificidad fijada del 98,8% (PV: positivos verdaderos; NV: negativos verdaderos). La figura 6C muestra una comparación de las proporciones de probabilidad de positivos y negativos (LR(+), LR(-)) y las oportunidades relativas ("odds ratios", OR) para los ensayos de Ca-FCS y CA-A1AT, respectivamente.  
40

### Descripción detallada

Los autoanticuerpos dirigidos contra proteínas carbamitadas (anticuerpos anti-CarP) son biomarcadores de diagnóstico y de pronóstico en la AR. Son necesarios ensayos de detección de anticuerpos anti-CarP sensibles y robustos para facilitar la investigación más a fondo y el desarrollo de biomarcadores de anticuerpos anti-CarP. En  
45 último término, son necesarios ensayos de anticuerpos anti-CarP que puedan cumplir con los estrictos requisitos normativos para los ensayos de diagnóstico y de pronóstico clínicos para desarrollar la utilidad clínica completa de los anticuerpos anti-CarP. Para desarrollar estos ensayos de elevada actuación, son necesarios componentes del ensayo que puedan producirse de modo reproducible y ser definidos y caracterizados desde el punto de vista analítico.

50 Los ensayos actuales para la detección de anticuerpos anti-CarP en muestras de suero de pacientes humanos con AR implican el uso de suero de ternero fetal carbamitado (Car-FCS) como reactivo de captura. El suero de ternero fetal (FCS) y Car-FCS son reactivos biológicos complejos que son difíciles de fabricar de una manera reproducible y contienen multitud de componentes de proteína y de no proteína que interaccionan de modo no específico con los anticuerpos anti-CarP y otras inmunoglobulinas en muestras de suero humano. Las señales de fondo no específicas observadas en ensayos de anticuerpos anti-CarP basados en Car-FCS son relativamente altas y pueden ser  
55 variables, dependiendo del lote de FCS usado.

- 5 La presente descripción se basa, en parte, en la comprensión de que, para mejorar la sensibilidad, la precisión, la reproducibilidad y la robustez de los ensayos de anticuerpos anti-CarP y para facilitar el control de calidad estricto y un alto grado de reproducibilidad entre lotes en la producción de reactivos de ensayo y kits de ensayo clínicos, son necesarias nuevas composiciones y métodos que se basen en reactivos de captura de anticuerpos anti-CarP purificados.
- La presente descripción también se basa, en parte, en el descubrimiento de que la ( $\alpha$ )1-antitripsina bovina carbamylada es un destacado antígeno en el FCS que es reconocido por los anticuerpos anti-CarP que se encuentran en muestras de suero de pacientes humanos con AR. Véanse, por ejemplo, los ejemplos 1 y 2, y las figuras 1-4.
- 10 La presente descripción beneficia a los pacientes con AR proporcionando nuevas herramientas para la evaluación de diagnóstico y de pronóstico de su enfermedad. En especial, los pacientes con AR ACPA-negativos se beneficiarán de las composiciones y los métodos de esta descripción. Se ha demostrado que la detección de anticuerpos anti-CarP en pacientes con AR ACPA-negativos predice la aparición de AR clínicamente manifestada y un avance de la enfermedad más grave. Las composiciones y los métodos de esta descripción pueden facilitar la
- 15 detección temprana de la AR y, con ello, permitir a los candidatos en riesgo de AR o a los pacientes con AR en estadio temprano tomar medidas preventivas para prevenir, retrasar o mejorar el avance posterior de la AR.
- Debe advertirse de que, tal como se emplea en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido purificado" incluye una mezcla de dos o más polipéptidos
- 20 purificados, y similares.
- El término "aproximadamente", en particular remitido a una cantidad concreta, incluye las desviaciones de más o menos 5%.
- Tal como se emplean en la presente, los términos "incluye", "incluyendo", "comprende", "comprendiendo", "contiene", "conteniendo" y cualquiera de sus variaciones, cubren una inclusión no exclusiva, de modo que un
- 25 proceso, un método, un subproducto del proceso o una composición de materia que incluye, comprende o contiene un elemento o una lista de elementos no incluye solo esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no listados expresamente o inherentes a dicho proceso, método, subproducto del proceso o composición de materia.
- Tal como se emplea en la presente, el término "carbamilación" incluye la conversión de una amina en una carbamida (urea). La carbamilación puede producirse, por ejemplo, como una reacción química o una reacción enzimática. La
- 30 carbamilación química incluye, sin limitación, reacciones de aminas con ácido isocianico (HNCO), grupos cianato ([NCO]-), tiocianato o isocianato de compuestos orgánicos. En algunas realizaciones, la carbamilación incluye la reacción de una amina con cianato. En algunas realizaciones, la carbamilación incluye la reacción de una amina con cianato de potasio. La carbamilación enzimática puede ser catalizada, por ejemplo, por una peroxidasa o una carbamoil-transferasa. En algunas realizaciones, la carbamilación es catalizada por una mieloperoxidasa (MPO). En
- 35 algunas realizaciones, la carbamilación es catalizada por una lisina-carbamoil-transferasa.
- La carbamilación incluye la carbamilación de biomoléculas (por ejemplo, polipéptidos, péptidos, lípidos, carbohidratos, o ácidos nucleicos) y de moléculas artificiales, tales como plásticos o polímeros.
- En algunas realizaciones, la carbamilación incluye la conversión de un resto lisina en un resto homocitrulina, por
- 40 ejemplo, en un péptido o un polipéptido. El resto lisina puede convertirse en homocitrulina, por ejemplo, mediante modificación química o enzimática del grupo  $\epsilon$ -amino de la cadena lateral de lisina para formar homocitrulina (también denominada K(Car)). Véase, por ejemplo, la figura 1B. En algunas realizaciones, la carbamilación incluye la sustitución de un resto lisina por un resto homocitrulina en un péptido o un polipéptido, por ejemplo, mediante la incorporación de un resto homocitrulina en el lugar de un resto lisina durante la síntesis del péptido o polipéptido.
- La carbamilación puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la carbamilación *in vitro* puede incluir la
- 45 modificación química o enzimática o la síntesis química o bioquímica (por ejemplo, la síntesis de péptidos, la traducción *in vitro*) de biomoléculas purificadas (por ejemplo, péptidos o polipéptidos) o la modificación química o enzimática de muestras biológicas complejas, tales como suero de ternero fetal (FCS), suero humano y similares. La carbamilación *in vivo* puede incluir, por ejemplo, la modificación enzimática de biomoléculas en células recombinantes (por ejemplo, células HEK, CHO, o Sf9; células de *E. coli*; células de levadura u otras) que contienen
- 50 ADNc que codifica una lisina-carbamoil transferasa u otras enzimas que catalizan reacciones de carbamilación.
- Las biomoléculas carbamyladas, tales como péptidos o polipéptidos, pueden carbamylarse en una única posición, por ejemplo, un único resto lisina, o en una pluralidad de posiciones, por ejemplo, en una pluralidad de restos lisina. En algunas realizaciones, más del 1%, más del 3%, más del 5%, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 25%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del
- 55 95%, o más del 99% de todos los restos lisina en un péptido o un polipéptido están carbamylados.
- Tal como se emplea en la presente, el término "pluralidad" se refiere a una población de dos o más miembros, tales como miembros de polipéptidos u otras moléculas mencionadas. En algunas realizaciones, los dos o más miembros

de una pluralidad de miembros son los mismos miembros. Por ejemplo, una pluralidad de polipéptidos puede incluir dos o más miembros de polipéptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos y que tienen los mismos restos lisina carbamilados. En algunas realizaciones, los dos o más miembros de una pluralidad de miembros son miembros diferentes. Por ejemplo, una pluralidad de polipéptidos puede incluir dos o más miembros de polipéptidos que tienen diferente secuencia de aminoácidos. En otro ejemplo, una pluralidad de polipéptidos puede incluir dos o más miembros de polipéptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero que tienen restos lisina carbamilados en diferentes posiciones o en un grado diferente. Una pluralidad incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 o más miembros diferentes. Una pluralidad también puede incluir 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000, 50000,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $7 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$  o  $1 \times 10^7$  o más miembros diferentes. Una pluralidad incluye todos los números enteros entre los anteriores ejemplos de números de pluralidad.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "en riesgo" se refiere a un aumento en la probabilidad de que un sujeto desarrolle cierto trastorno de enfermedad o síntoma clínico de una enfermedad en el futuro. Por ejemplo, es más probable que un sujeto que está "en riesgo de desarrollar AR" o que está "en riesgo de desarrollar síntomas clínicos de la AR" desarrolle en el futuro AR o síntomas clínicos de la AR que el sujeto promedio en una población concreta. Un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar un trastorno de enfermedad en el futuro no está sufriendo est trastorno. Un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar un trastorno de enfermedad puede mostrar ciertos biomarcadores, tales como niveles elevados de anticuerpos anti-CarP, que indican una mayor probabilidad de que el sujeto desarrolle cierto trastorno de enfermedad (por ejemplo, AR) o síntomas clínicos de cierto trastorno de enfermedad (por ejemplo, dolor de articulaciones, inflamación de articulaciones sinoviales).

El término "polipéptido", tal como se usa en la presente, incluye un oligopéptido corto de entre 2 y 30 aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 o 30 aminoácidos), así como cadenas de aminoácidos más largas, por ejemplo, más de 30 aminoácidos, más de 50 aminoácidos, más de 100 aminoácidos, más de 150 aminoácidos, más de 200 aminoácidos, más de 300 aminoácidos, más de 400 aminoácidos, más de 500 aminoácidos, o más de 600 aminoácidos. Los polipéptidos de esta descripción incluyen, por ejemplo, polipéptidos recombinantes, polipéptidos purificados a partir de tejidos o fluidos corporales y cualquiera de sus fragmentos. Pueden producirse fragmentos de polipéptidos, por ejemplo, mediante digestiones con proteasa de proteínas de longitud completa, la expresión recombinante de fragmentos de polipéptidos, o mediante síntesis química de oligopéptidos. Los polipéptidos de esta descripción pueden ser modificados de modo postraducciona l o químico (por ejemplo, carbamilación, fosforilación, biotinilación, unión de tintes fluorescentes y similares). Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos no naturales que no están codificados por el código genético natural. Por ejemplo, los polipéptidos pueden incluir estructuras de esqueleto metiladas, estructuras de esqueleto peptoid e (glicinas poli-N-sustituidas), L-aminoácidos, R-aminoácidos y similares. Los polipéptidos pueden tener secuencias de tipo salvaje, secuencias de variantes naturales, secuencias mutantes (por ejemplo, mutaciones puntuales, mutantes de delección) y similares.

La expresión "anticuerpo anti-CarP", tal como se emplea en la presente, se refiere a un autoanticuerpo generado por un organismo contra un autoantígeno carbamilado. El anticuerpo anti-CarP reconoce específicamente antígenos en su forma carbamilada, pero no en su forma no carbamilada. Los antígenos reconocidos por el anticuerpo anti-CarP pueden incluir un autoantígeno carbamilado, o uno de sus fragmentos, o proteínas carbamiladas no relacionadas con el autoantígeno carbamilado. La presencia de un anticuerpo anti-CarP tiene valor de diagnóstico y de pronóstico para la evaluación de enfermedades que implican respuestas autoinmunitarias contra proteínas carbamiladas (CarP), tales como la artritis reumatoide (AR). Según esta descripción, la alfa-1-antitripsina carbamilada *in vitro* (Car-A1AT) es una de las proteínas carbamiladas reconocidas por un anticuerpo anti-CarP que se encuentra, por ejemplo, en el suero de pacientes humanos con AR. El anticuerpo anti-CarP puede pertenecer a cualquier clase o subclase de anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CarP puede ser un anticuerpo IgM, IgA (por ejemplo, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>), IgD, IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>), o IgE. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP de esta descripción interacciona a través de la región Fab (fragmento de unión al antígeno) con un sitio de unión al anticuerpo anti-CarP en A1AT carbamilada *in vitro*. El anticuerpo anti-CarP puede ser un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, tal como se encuentra en muestras de sangre, plasma o suero. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP de esta descripción puede ser un anticuerpo procesado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP está desglucosilado o fragmentado (por ejemplo, en fragmentos Fab). El anticuerpo anti-CarP puede ser una pluralidad de anticuerpos anti-CarP, que incluyen uno o más anticuerpos anti-CarP monoclonales o uno o más anticuerpos anti-CarP policlonales. Diferentes anticuerpos anti-CarP en la pluralidad de anticuerpos anti-CarP pueden unirse a las mismas proteínas carbamiladas o a diferentes proteínas carbamiladas. Diferentes anticuerpos anti-CarP en la pluralidad de anticuerpos anti-CarP pueden reconocer el mismo sitio de unión al anticuerpo carbamilado o diferentes sitios de unión al anticuerpo carbamilado en proteínas carbamiladas.

En los métodos y las composiciones proporcionados en la presente, las proteínas purificadas de esta descripción pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones, las proteínas purificadas se inmovilizan a través de una molécula conectora que acopla la proteína purificada al soporte sólido. Cuando se menciona la inmovilización de moléculas (por ejemplo, proteínas purificadas) a un soporte sólido, los términos "inmovilizado" y "unido" se emplean de modo intercambiable en la presente, y ambos términos incluyen la unión directa o indirecta, covalente o no covalente, a menos que se indique lo contrario de modo explícito o indicado por el contexto. En

algunas realizaciones, se prefiere la unión covalente, pero, en general, todo lo que se requiere es que las moléculas (por ejemplo, proteínas purificadas) permanezcan inmovilizadas o unidas al soporte bajo las condiciones en que esté previsto usar el soporte, por ejemplo, en aplicaciones que requieran la unión de anticuerpos o la detección.

5 Las expresiones "superficie sólida", "soporte sólido" y otros equivalentes gramaticales en la presente se refieren a cualquier material que sea apropiado o que pueda modificarse para que sea apropiado para la unión de las proteínas purificadas de esta descripción. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, el número de posibles sustratos es muy grande. Los posibles sustratos incluyen, pero no se limitan a vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (que incluyen acrílicos, poliestireno, poliuretanos, Teflon™, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, cerámicas, resinas, sílice o materiales basados en sílice, que incluyen silicio y silicio modificado, 10 metales de carbono, vidrios inorgánicos, haces de fibras ópticas, y una diversidad de otros polímeros. En algunas realizaciones, los soportes sólidos están colocados en placas de pocillos de microtitulación (por ejemplo, una placa de 96 pocillos, de 384 pocillos o de 1536 pocillos). En algunas realizaciones, los soportes sólidos están colocados dentro de una célula de flujo o un aparato de células de flujo (por ejemplo, una célula de flujo en un chip Biacore™ o un chip de proteínas).

15 En algunas realizaciones, el soporte sólido incluye una superficie con un patrón adecuada para la inmovilización de proteínas purificadas en un patrón ordenado (por ejemplo, un chip de proteínas). Una "superficie con un patrón" se refiere a una disposición de diferentes regiones en una capa expuesta sobre un soporte sólido o dentro de este. Por ejemplo, una o más de las regiones pueden ser elementos en los que una o más proteínas purificadas están presentes. Los elementos pueden estar separados por regiones intersticiales en las que las proteínas purificadas no 20 están presentes. En algunas realizaciones, el patrón puede ser un formato de x-y de elementos que se encuentran en filas y columnas. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición repetida de elementos y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición aleatoria de elementos y/o regiones intersticiales. Se describen ejemplos de superficies con patrón que pueden usarse en los métodos y las composiciones proporcionados en la presente en la solicitud de patente de EE.UU. n.º de publicación 2008/0280785 A1, la solicitud de patente de EE.UU. n.º de publicación 2004/0253640 A1, la solicitud de patente de EE.UU. n.º de publicación 2003/0153013 A1, y la publicación internacional n.º WO 2009/039170 A2.

25 En algunas realizaciones, el soporte sólido incluye una matriz de pocillos o depresiones en una superficie. Esta puede fabricarse como se conoce en general en la técnica usando una diversidad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a fotolitografía, técnicas de estampado, técnicas de moldeado y técnicas de micrograbado. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, la técnica usada dependerá de la composición y la forma del sustrato de la matriz.

30 En algunas realizaciones, el soporte sólido o su superficie no son planos, tal como la superficie interna o externa de un tubo o un recipiente. En algunas realizaciones, el soporte sólido incluye microesferas o esferas. Las "microesferas" o "esferas" o "partículas" o sus equivalentes gramaticales significan en la presente partículas discretas pequeñas. Las composiciones de esferas adecuadas incluyen, pero no se limitan a plásticos, cerámicas, vidrio, poliestireno, metilistireno, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, sol de toria, grafito de carbono, óxido de titanio, nailon, látex o dextranos reticulados, tales como Sephadose, celulosa, nailon, micelas reticuladas y Teflon™, así como puede utilizarse cualquier otro material descrito en la presente para los soportes sólidos. "Bangs Beads Technical Product Guide" de Bangs Laboratories (Fishers, Ind) es una guía útil. En algunas realizaciones, las 40 microesferas son microesferas o esferas magnéticas.

No es necesario que las esferas sean esféricas; pueden usarse partículas irregulares. Como alternativa o además, las esferas pueden ser porosas. El tamaño de las esferas varía de nanómetros, por ejemplo, 100 nm, a milímetros, por ejemplo, 1 mm, y en algunas realizaciones se prefiere de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 200 micrómetros. En algunas realizaciones, el tamaño de las esferas varía de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 45 5 micrómetros. En algunas realizaciones, pueden usarse esferas menores que aproximadamente 0,2 micrómetros o mayores que aproximadamente 200 micrómetros.

50 Se advierte que, tal como se emplean en la presente, los términos "organismo", "individuo", "sujeto" o "paciente" se emplean como sinónimos y son intercambiables. Los sujetos de esta descripción incluyen sujetos sanos, sujetos asintomáticos y sujetos enfermos. Los sujetos enfermos pueden padecer cualquier enfermedad asociada con unos niveles aberrantes de anticuerpos antiproteína carbamílada (anti-CarP). La expresión "niveles aberrantes de anticuerpos anti-CarP", tal como se emplea en la presente, se refiere a unos niveles de anticuerpos anti-CarP en una muestra que se desvían significativamente de la mediana de los niveles de anticuerpos anti-CarP que se encuentran en una población de sujetos sanos. En algunas realizaciones, los niveles aberrantes de anticuerpos anti-CarP son mayores que la mediana de los niveles de anticuerpos anti-CarP. En algunas realizaciones, los niveles aberrantes 55 de anticuerpos anti-CarP son menores que la mediana de los niveles de anticuerpos anti-CarP.

60 En algunas realizaciones, los sujetos sanos nunca han padecido una enfermedad concreta. En algunas realizaciones, los sujetos sanos han estado enfermos previamente. En algunas realizaciones, los sujetos sanos están siendo sometidos a un chequeo médico rutinario. En algunas realizaciones, los sujetos sanos son miembros de un grupo control en un ensayo clínico. En algunas realizaciones, los sujetos sanos están en riesgo de contraer una enfermedad, según se determina mediante la presencia de ciertos factores de riesgo que son muy conocidos en

la técnica. Estos factores de riesgo incluyen, sin limitación, una predisposición genética, una historia personal de enfermedad, una historia familiar de enfermedad, un factor de estilo de vida, un factor ambiental, un indicador de diagnóstico y similares.

- 5 En algunas realizaciones, el sujeto es asintomático. Los sujetos sintomáticos incluyen sujetos sanos que fundamentalmente no presentan riesgo o presentan solo un riesgo bajo de desarrollar AR (por ejemplo, el sujeto asintomático presenta una probabilidad menor que 10%, menor que 5%, menor que 3%, o menor que 1% de desarrollar AR en los siguientes cinco años). Los sujetos asintomáticos también incluyen sujetos sanos que presentan un riesgo alto de desarrollar AR (por ejemplo, el sujeto asintomático presenta una probabilidad mayor que 50%, mayor que 70%, mayor que 90%, o mayor que 95% de desarrollar AR en los siguientes cinco años).
- 10 Los sujetos sintomáticos incluyen también sujetos enfermos que pueden mostrar indicadores de diagnóstico temprano suaves de la AR, pero que, de otro modo, no están enfermos ni se quejan (por ejemplo, sin dolor de articulaciones sinoviales, sin trastorno inflamatorio sistémico). En algunas realizaciones, el paciente asintomático es un paciente con artralgia.
- 15 En algunas realizaciones, el sujeto padece AR. En algunas realizaciones, el sujeto es sospechoso de padecer AR. En algunas realizaciones, el sujeto padece AR con dolor articular. En algunas realizaciones, el sujeto padece AR con un trastorno inflamatorio sistemático. En algunas realizaciones, el sujeto padece artritis idiopática juvenil ("juvenile idiopathic arthritis", JIA). En algunas realizaciones, el sujeto padece un síndrome pre-AR. En algunas realizaciones, el síndrome pre-AR es artralgia.
- 20 En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar AR. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una predisposición genética a desarrollar AR o una historia familiar de AR. En algunas realizaciones, el sujeto está expuesto a ciertos factores de estilo de vida (por ejemplo, es fumador) que estimulan el desarrollo de AR, o el sujeto muestra manifestaciones de enfermedad clínicas de la AR. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente que está recibiendo un tratamiento clínico para diagnosticar la AR o para evaluar el riesgo de desarrollar AR.
- 25 En algunas realizaciones, los sujetos presentan anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPA), por ejemplo, en su sangre u otro fluido o tejido corporal (sujetos ACPA-positivos). En algunas realizaciones, los sujetos presentan unos niveles elevados de ACPA, por ejemplo, en su sangre u otro fluido o tejido corporal, con relación a sujetos control normales. En algunas realizaciones, los sujetos no presentan anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPA), por ejemplo, en su sangre u otro fluido o tejido corporal (sujetos ACPA-negativos).
- 30 En algunas realizaciones, los sujetos presentan anticuerpos antiproteína carbamilada (anticuerpos anti-CarP antibodies), por ejemplo, en su sangre u otro fluido o tejido corporal (sujetos positivos a anticuerpos anti-CarP), o los sujetos presentan unos niveles elevados de anticuerpos anti-CarP, por ejemplo, en su sangre u otro fluido o tejido corporal, con relación a sujetos control normales. En algunas realizaciones, los sujetos son negativos a anticuerpos anti-CarP.
- 35 En algunas realizaciones, el sujeto no ha recibido tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto se está sometiendo a tratamientos de la AR (por ejemplo, tratamientos con fármacos). En algunas realizaciones, el sujeto está en remisión. En algunas realizaciones, la remisión está inducida por fármacos. En algunas realizaciones, la remisión no tiene relación con fármacos.
- 40 En algunas realizaciones, el sujeto es un modelo animal para la AR. En algunas realizaciones, el modelo animal es un modelo de ratón o de conejo para la AR. En algunas realizaciones, el modelo animal implica inducir respuestas de anticuerpos anti-CarP mediante la vacunación del animal con proteínas carbamiladas (CarP).
- En la presente se describe un polipéptido purificado que incluye alfa-1-antitripsina (A1AT) carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos. En algunos casos, la A1AT carbamilada *in vitro* es una A1AT de mamífero. La A1AT carbamilada *in vitro* de la invención es una A1AT humana (hA1AT). En algunos casos, la A1AT carbamilada *in vitro* es una A1AT bovina (bA1AT).
- 45 En la presente se describe un polipéptido purificado que incluye una hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos.
- En la presente se describe un polipéptido purificado que incluye una bA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos.
- En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es un polipéptido recombinante purificado codificado por ADNc.
- 50 Los métodos para expresar y purificar polipéptidos recombinantes son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos recombinantes pueden expresarse y purificarse de células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*), células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*), células de mamífero (por ejemplo, CHO) y otras. Los polipéptidos recombinantes pueden expresarse y purificarse como proteínas de fusión que incluyen marcadores para la detección de proteínas o marcadores de purificación por afinidad (por ejemplo, marcador His, marcador GST, marcador Myc),
- 55 incluyendo marcadores escindibles (por ejemplo, marcadores que incluyen un sitio de ruptura de TEV).

5 En algunas realizaciones, el polipéptido se purifica a partir de un tejido o un fluido corporal obtenido de un organismo. Los tejidos o los fluidos corporales pueden incluir cualquier tejido o fluido corporal obtenido del organismo. En algunas realizaciones, los tejidos o fluidos corporales incluyen sangre, suero, plasma, orina o leche (por ejemplo, de cabras, vacas, ovejas). Los expertos en la técnica reconocerán que los métodos para la purificación de polipéptidos a partir de tejidos o fluidos corporales son muy conocidos en la técnica.

10 Pueden encontrarse ejemplos de métodos para expresar y purificar proteínas recombinantes, para purificar proteínas a partir de tejidos o fluidos corporales, y para sintetizar péptidos de modo químico, por ejemplo, en Scopes R.K., Protein Purification - Principles and Practice, Springer Advanced Texts in Chemistry, 3ª edición (1994); Simpson R.J. *et al.*, Basic Methods in Protein Purification and Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1ª edición (2008); Green M.R. y Sambrook J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4ª edición (2012); Jensen K.J. *et al.*, Peptide Synthesis and Applications (Methods in Molecular Biology), Humana Press, 2ª edición (2013).

15 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una hA1AT purificada a partir de sangre, suero, plasma, orina o fluidos sinoviales.

En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una bA1AT purificada a partir de sangre, suero, plasma, orina o leche.

20 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una A1AT nativa. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una A1AT desnaturalizada o desplegada. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado incluye aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales están metilados en el grupo  $\alpha$ -amino para producir polipéptidos con esqueletos metilados. En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales son R-aminoácidos. En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales incluyen tintes (por ejemplo, tintes fluorescentes) o marcadores de afinidad. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado incluye modificaciones químicas. Las modificaciones químicas incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas con biotina, tintes fluorescentes. Los expertos en la técnica reconocerán que los métodos para introducir aminoácidos no naturales en polipéptidos y para modificar polipéptidos de modo químico son muy conocidos en la técnica.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una pluralidad de polipéptidos purificados.

30 Los polipéptidos purificados de esta descripción incluyen una A1AT carbamilada *in vitro*. La A1AT puede ser cualquier A1AT de mamífero. La A1AT puede ser una A1AT humana, de primate (por ejemplo, mono, chimpancé, orangután o gorila), gato, perro, conejo, animal de granja (por ejemplo, vaca, caballo, cabra, oveja o cerdo) o roedor (por ejemplo, ratón, rata, hámster o cobaya). La A1AT de la invención es una A1AT humana (hA1AT). En algunos casos, la A1AT es una A1AT bovina (bA1AT).

En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, incluye la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 de una A1AT humana madura (aminoácidos 25-418 de la secuencia de referencia de NCBI NP\_001002235.1; GI:50363221), o uno de sus variantes naturales:

SEQ ID NO:1

EDPQGDAAQKTDTSHHQDHDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNI  
 FFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRT  
 LNQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVFGDTEE  
 AKKQINDYVEKGTQGGKIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFKGGKWERPFVVK  
 DTEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLG NAT  
 AIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKS  
 VLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGA  
 MFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK

35 La A1AT, o uno de sus fragmentos, puede incluir la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 de una A1AT bovina madura (aminoácidos 25-416 de la secuencia de referencia de NCBI NP\_776307.1; GI:27806941), o uno de sus variantes naturales:

SEQ ID NO:2

GVLQGHAVQETDDTSHQEAACHKIAPNLANFAFSIYHHLAHQSNTSNIFF  
 SPVSIASAFAMLSLGAKGNTHTEILKGLGFNLTELAEAEIHKGFQHLLHTL  
 NQPNHQLQLTTGNGLFINESAKLVDTFLEDVKNLYHSEAFSINFRDAEEA  
 KKKINDYVEKGGSHGKIVELVKVLDPNTVFALVNYISFKGKWEKPFEMKH  
 TTERDFHVDEQTTVKVPMMNRLGMFDLHYCDKLASWVLLLDYVGNVT  
 ACFILPDLGKLQQLEDKLNELLAKFLEKKYASSANLHLPKLSISETYDLK  
 SVLGDVGITEVFSRADLSGITKEQPLKVSALHKAALTIDEKGTEAVGST  
 FLEAIPMSLPPDVEFNRPFLCILYDRNTKSPLFVGKVVNPTQA

- 5 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado incluye una A1AT de longitud completa. En algunas realizaciones, la A1AT de longitud completa contiene la secuencia señal N-terminal. En algunas realizaciones, la A1AT de longitud completa es una A1AT madura que carece de la secuencia señal N-terminal. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una A1AT de longitud completa.
- 10 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado incluye un fragmento de A1AT. En algunas realizaciones, el fragmento de A1AT incluye más de 3, más de 5, más de 10, más de 15, más de 20, más de 25, más de 50, más de 75, más de 100, más de 125, más de 150, más de 200, más de 250, más de 300, más de 350, o más de 400 aminoácidos consecutivos de un polipéptido de A1AT de longitud completa. En algunas realizaciones, el fragmento de A1AT incluye menos del 100%, menos del 95%, menos del 90%, menos del 80%, menos del 75%, menos del 70%, menos del 65%, menos del 60%, menos del 55%, menos del 50%, menos del 45%, menos del 40%, menos del 35%, menos del 30%, menos del 25%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, o menos del 5% de aminoácidos consecutivos de la A1AT de longitud completa. En algunas realizaciones, el fragmento de A1AT es un fragmento de péptido de A1AT.
- 15 En algunas realizaciones, el fragmento de A1AT se sintetiza de modo químico. En algunas realizaciones, el fragmento de A1AT se sintetiza de modo químico usando cualquier método de síntesis de péptidos conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el fragmento de A1AT se produce como un polipéptido recombinante. En algunas realizaciones, el fragmento de A1AT se produce mediante la digestión enzimática de A1AT de longitud completa, o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, la digestión enzimática se realiza con una proteasa o peptidasa.
- 20 En algunas realizaciones, la proteasa o peptidasa es una exoproteasa o una exopeptidasa. En algunas realizaciones, la proteasa o peptidasa es una endoproteasa o una endopeptidasa. En algunas realizaciones, la proteasa o peptidasa incluye una serina proteasa, treonina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasa, ácido glutámico proteasa, o metaloproteasa. En algunas realizaciones, la proteasa o peptidasa incluye tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, cualquier catepsina (por ejemplo, catepsina B, L, D, K o G). Los expertos en la
- 25 técnica reconocerán que los métodos para la síntesis química, la producción recombinante, o la digestión enzimática de A1AT de longitud completa, o sus fragmentos, son muy conocidos en la técnica.
- 30 El fragmento de A1AT puede incluir cualquier secuencia parcial de aminoácidos que contiene lisina de un polipéptido de A1AT de longitud completa. La secuencia parcial de aminoácidos puede incluir, por ejemplo, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 12 o más, 14 o más, 16 o más, 18 o más, 20 o más, 24 o más, 28 o más, o 32 o más aminoácidos consecutivos del polipéptido de A1AT de longitud completa. Dos o más fragmentos de péptido de A1AT pueden tener secuencias de aminoácidos de A1AT parcialmente solapantes. Las secuencias de aminoácidos de A1AT solapantes pueden solaparse con respecto a 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 12 o más, 14 o más, 16 o más, 18 o más, 20 o más, 24 o más, 28 o más o 32 o más aminoácidos consecutivos del polipéptido de A1AT de longitud completa.
- 35 Los ejemplos de fragmentos de A1AT pueden tener las siguientes secuencias parciales de aminoácidos de la A1AT humana, SEQ ID NO:3-32:

SEQ ID NO:3: AEDPQGDAQAQKTDTSHHQDQDH  
 SEQ ID NO:4: HHDQDHPTFNKITPNLAFAF  
 SEQ ID NO:5: TAFAMLSLGTKADTHDEILEG  
 SEQ ID NO:6: GNGLFLSEGLKLVDFKLEDV  
 SEQ ID NO:7: FLSEGLKLVDFKLEDVKKLYH  
 SEQ ID NO:8: KLVDFKLEDVKKLYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:9: TVNFGDTEEAKKQINDYVEKG  
 SEQ ID NO:10: AKKQINDYVEKGTQGGKIVDLV  
 SEQ ID NO:11: NDYVEKGTQGGKIVDLVKELDR  
 SEQ ID NO:12: GTQGGKIVDLVKELDRDTVFAL  
 SEQ ID NO:13: VFALVNYIFFKGGKWERPFVVK  
 SEQ ID NO:14: KGGKWERPFVVKDTEEDFHVD  
 SEQ ID NO:15: DFHVDQVTTVKVPMMKRLGMF  
 SEQ ID NO:16: QVTTVKVPMMKRLGMFNIQHC  
 SEQ ID NO:17: RLGFMFNIQHCKKLSSWVLLMK  
 SEQ ID NO:18: KKLSSWVLLMKYLGNATAIFF  
 SEQ ID NO:19: TAIFFLPDEGKLQHLENELTH  
 SEQ ID NO:20: ENELTHDIITKFLNEDRRSA  
 SEQ ID NO:21: DRRSASLHLPKLSITGTYDLK  
 SEQ ID NO:22: KLSITGTYDLKSVLGQLGITK  
 SEQ ID NO:23: KSVLGQLGITKVFSNGADLSG  
 SEQ ID NO:24: LSGVTEEAPLKLKAVHKAVL  
 SEQ ID NO:25: VTEEAPLKLKAVHKAVLTID  
 SEQ ID NO:26: APLKLKAVHKAVLTIDEKGT  
 SEQ ID NO:27: VHKAVLTIDEKGTAAAGAMFL  
 SEQ ID NO:28: AIPMSIPPEVKFNKPFVFLMI  
 SEQ ID NO:29: MSIPPEVKFNKPFVFLMIEQN  
 SEQ ID NO:30: FVFLMIEQNTKSPLFMGKVVN  
 SEQ ID NO:31: EQNTKSPLFMGKVVNPTQKAA  
 SEQ ID NO:32: ALVNYIFFKGGKWERPFVVKDT

5 Los fragmentos de A1AT de esta descripción incluyen uno o más restos lisina. Los fragmentos de A1AT pueden estar carbamilados o no carbamilados en uno o más restos lisina. En algunas realizaciones, los fragmentos de A1AT están carbamilados en todos los restos lisina. Los fragmentos de A1AT carbamilada presentan homocitrulina en la posición de uno o más restos lisina. En algunas realizaciones, los fragmentos de A1AT presentan homocitrulina en la

posición de todos los restos lisina. En algunas realizaciones, los fragmentos de A1AT que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:3-32 están carbamilados en uno o más restos lisina.

En algunas realizaciones, la A1AT es un polipéptido de tipo salvaje o uno de sus variantes naturales.

5 En algunas realizaciones, la A1AT es un polipéptido mutante. Los polipéptidos mutantes incluyen, sin limitación, mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, duplicaciones y similares.

10 La A1AT puede ser un homólogo de un polipéptido de A1AT de longitud completa de tipo salvaje. La A1AT puede ser un homólogo de la A1AT humana de longitud completa (hA1AT). La A1AT puede ser un homólogo de la A1AT bovina de longitud completa (bA1AT). El homólogo de A1AT puede tener más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con una A1AT de tipo salvaje.

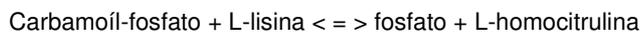
En algunas realizaciones, la A1AT incluye una secuencia de aminoácidos homóloga a SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos homóloga a SEQ ID NO:1 tiene más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1.

15 La A1AT descrita en la presente puede incluir una secuencia de aminoácidos homóloga a SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos homóloga a SEQ ID NO:2 tiene más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:2.

Las A1AT en las proteínas purificadas de esta descripción se carbamilan *in vitro*. Véase, por ejemplo, la figura 1.

20 En algunas realizaciones, la carbamilación *in vitro* incluye una reacción química. En algunas realizaciones, la reacción química incluye una reacción de aminas con ácido isocianico (HNCO), cianato ([NCO]<sup>-</sup>), un compuesto orgánico que contiene un grupo isocianato, o una reacción de aminas con tiocianato. En algunas realizaciones, la reacción química incluye una reacción de una amina con cianato. En algunas realizaciones, la reacción química incluye una reacción de una amina con cianato de potasio.

25 En algunas realizaciones, la carbamilación *in vitro* es catalizada por una enzima. En algunas realizaciones, la enzima cataliza la reacción:



30 En algunas realizaciones, la enzima es una transferasa. En algunas realizaciones, la enzima es una lisina-carbamoil-transferasa. En algunas realizaciones, la enzima es una peroxidasa. En algunas realizaciones, la peroxidasa es una mieloperoxidasa (MPO).

35 En algunas realizaciones, la carbamilación *in vitro* incluye la incorporación de un resto homocitrulina en la A1AT. En algunas realizaciones, el resto homocitrulina reemplaza a uno o más restos lisina en la A1AT. En algunas realizaciones, todos los restos lisina en A1AT son reemplazados por restos homocitrulina. En algunas realizaciones, el resto homocitrulina reemplaza a uno o más restos aminoácidos distintos de restos lisina en la A1AT. En algunas realizaciones, los restos homocitrulina reemplazan a una combinación de restos lisina y no lisina en la A1AT. En algunas realizaciones, el resto homocitrulina se incorpora a A1AT *in vitro*. En algunas realizaciones, el resto homocitrulina se incorpora a A1AT mediante síntesis peptídica. En algunas realizaciones, el resto homocitrulina es una pluralidad de restos homocitrulina.

40 Cualquier resto lisina en A1AT, o uno de sus fragmentos, puede carbamilarse *in vitro* (ser reemplazado por homocitrulina) por sí solo o en combinación con cualquier otro resto lisina en la A1AT o en combinación con cualquier otra combinación de restos lisina en A1AT. Cualquier número de restos lisina en A1AT puede carbamilarse *in vitro*. Cualquier combinación de restos lisina en A1AT puede carbamilarse. En algunas realizaciones, todos los restos lisina de A1AT están carbamilados.

45 Los siguientes ejemplos ilustran que cualquier resto lisina individual en un ejemplo de A1AT, o uno de sus fragmentos, puede carbamilarse *in vitro* por sí solo o en combinación con cualquier número de restos lisina en A1AT, o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, la A1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, incluye una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 33-203, en las que los restos lisina carbamilados (restos homocitrulina) se indican como **K(Car)**:

SEQ ID NO:33: AEDPQGDAAQK(Car)TDTSHHDQDH  
 SEQ ID. NO:34: HHDQDHPTFNK(Car)ITPNLAFAF  
 SEQ ID NO:35: TAFAMLSLGTK(Car)ADTHDEILEG  
 SEQ ID NO:36: GNGLFLSEGLK(Car)LVDKFLEDV  
 SEQ ID NO:37: GNGLFLSEGLKLVDK (Car)FLEDV  
 SEQ ID NO:38: GNGLFLSEGLK(Car)LVDK(Car)FLEDV  
 SEQ ID NO:39: FLSEGLK(Car)LVDKFLEDVKKLYH  
 SEQ ID NO:40: FLSEGLKLVDK(Car)FLEDVKKLYH  
 SEQ ID NO:41: FLSEGLKLVDKFLEDVK(Car)KLYH  
 SEQ ID NO:42: FLSEGLKLVDKFLEDVKK(Car)LYH  
 SEQ ID NO:43: FLSEGLK(Car)LVDK(Car)FLEDVKKLYH  
 SEQ ID NO:44: FLSEGLK(Car)LVDKFLEDVK(Car)KLYH  
 SEQ ID NO:45: FLSEGLK(Car)LVDKFLEDVKK(Car)LYH  
 SEQ ID NO;46: FLSEGLKLVDK(Car)FLEDVK(Car)KLYH  
 SEQ ID NO:47: FLSEGLKLVDK(Car)FLEDVKK(Car)LYH  
 SEQ ID NO:48: FLSEGLKLVDKFLEDVK(Car)K(Car)LYH  
 SEQ ID NO:49: FLSEGLK(Car)LVDK(Car)FLEDVK(Car)KLYH  
 SEQ ID NO:50: FLSEGLK(Car)LVDK(Car)FLEDVKK(Car)LYH  
 SEQ ID NO:51: FLSEGLK(Car)LVDKFLEDVK(Car)K(Car) LYH  
 SEQ ID NO:52: FLSEGLKLVDK(Car)FLEDVK(Car)K(Car)LYH  
 SEQ ID NO:53: FLSEGLK(Car)LVDK(Car)FLEDVK(Car)K(Car)LYH

SEQ ID NO:54: **K(Car)**LVDFKLEDVKKLYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:55: KLVDK**(Car)**FLEDVKKLYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:56: KLVDKFLLEDVK**(Car)**KLYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:57: KLVDKFLLEDVKK**(Car)**LYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:58: **K(Car)**LVDFK**(Car)**FLEDVKKLYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:59: **K(Car)**LVDFKFLLEDVK**(Car)**KLYHSEAFTV  
 SEQ ID. NO:60: **K(Car)**LVDFKFLLEDVKK**(Car)**LYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:61: KLVDK**(Car)**FLEDVK**(Car)**KLYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:62: KLVDK**(Car)**FLEDVKK**(Car)**LYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:63: KLVDKFLLEDVK**(Car)****K(Car)**LYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:64: **K(Car)**LVDFK**(Car)**FLEDVK**(Car)**KLYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:65: **K(Car)**LVDFK**(Car)**FLEDVKK**(Car)**LYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:66: **K(Car)**LVDFKFLLEDVK**(Car)****K(Car)**LYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:67: KLVDK**(Car)**FLEDVK**(Car)****K(Car)**LYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:68: **K(Car)**LVDFK**(Car)**FLEDVK**(Car)****K(Car)**LYHSEAFTV  
 SEQ ID NO:69: TVNFGDTEEA**K(Car)**KQINDYVEKG  
 SEQ ID NO:70: TVNFGDTEEA**KK(Car)**QINDYVEKG  
 SEQ ID NO:71: TVNFGDTEEA**KKQINDYVEK(Car)**G  
 SEQ ID NO:72: TVNFGDTEEA**K(Car)****K(Car)**QINDYVEKG  
 SEQ ID NO:73: TVNFGDTEEA**K(Car)**KQINDYVEK**(Car)**G  
 SEQ ID NO:74: TVNFGDTEEA**KK(Car)**QINDYVEK**(Car)**G  
 SEQ ID NO:75: TVNFGDTEEA**K(Car)****K(Car)**QINDYVEK**(Car)**G  
 SEQ ID NO:76: **AK(Car)**KQINDYVEKGTQGKIVDLV  
 SEQ ID NO:77: **AKK(Car)**QINDYVEKGTQGKIVDLV  
 SEQ ID NO:78: **AKKQINDYVEK(Car)**GTQGKIVDLV  
 SEQ ID NO:79: **AKKQINDYVEKGTQGK(Car)**IVDLV  
 SEQ ID NO:80: **AK(Car)****K(Car)**QINDYVEKGTQGKIVDLV  
 SEQ ID NO:81: **AK(Car)**KQINDYVEK**(Car)**GTQGKIVDLV  
 SEQ ID NO:82: **AK(Car)**KQINDYVEKGTQG**K(Car)**IVDLV  
 SEQ ID NO:83: **AKK(Car)**QINDYVEKGTQGKIVDLV  
 SEQ ID NO:84: **AKKQINDYVEK(Car)**GTQGKIVDLV

SEQ ID NO:85: AKK(Car)QINDYVEKGTQGK(Car)IVDLV  
 SEQ ID NO:86: AKKQINDYVEK(Car)GTQGK(Car)IVDLV  
 SEQ ID NO:87: AK(Car)K(Car)QINDYVEK(Car)GTQGKIVDLV  
 SEQ ID NO:88: AK(Car)K(Car)QINDYVEKGTQGK(Car)IVDLV  
 SEQ ID NO:89: AK(Car)KQINDYVEK(Car)GTQGK(Car)IVDLV  
 SEQ ID NO:90: AKK(Car)QINDYVEK(Car)GTQGK(Car)IVDLV  
 SEQ ID NO:91: AK(Car)K(Car)QINDYVEK(Car)GTQGK(Car)IVDLV  
 SEQ ID NO:92: NDYVEK(Car)GTQGKIVDLVKELDR  
 SEQ ID NO:93: NDYVEKGTQGK(Car)IVDLVKELDR  
 SEQ ID NO:94: NDYVEKGTQGKIVDLVK(Car)ELDR  
 SEQ ID NO:95: NDYVEK(Car)GTQGK(Car)IVDLVKELDR  
 SEQ ID NO:96: NDYVEK(Car)GTQGKIVDLVK(Car)ELDR  
 SEQ ID NO:97: NDYVEKGTQGK(Car)IVDLVK(Car)ELDR  
 SEQ ID NO:98: NDYVEK(Car)GTQGK(Car)IVDLVK(Car)ELDR  
 SEQ ID NO:99: GTQGK(Car)IVDLVKELDRDRTVFAL  
 SEQ ID NO:100: GTQGKIVDLVK(Car)ELDRDRTVFAL  
 SEQ ID NO:101: GTQGK(Car)IVDLVK(Car)ELDRDRTVFAL  
 SEQ ID NO:102: VFALVNYIFFK(Car)GKWERPFEVK  
 SEQ ID NO:103: VFALVNYIFFK GK(Car)WERPFEVK  
 SEQ ID NO:104: VFALVNYIFFK GK WERPFEVK(Car)  
 SEQ ID NO:105: VFALVNYIFFK(Car)GK(Car)WERPFEVK  
 SEQ ID NO:106: VFALVNYIFFK(Car)GKWERPFEVK(Car)  
 SEQ ID NO:107: VFALVNYIFFK GK(Car)WERPFEVK(Car)  
 SEQ ID NO:108: VFALVNYIFFK(Car)GK(Car)WERPFEVK(Car)  
 SEQ ID NO:109: K(Car)GKWERPFEVKDTEEEEDFHVD  
 SEQ ID NO:110: KGK(Car)WERPFEVKDTEEEEDFHVD  
 SEQ ID NO:111: KGKWERPFEVK(Car)DTEEEEDFHVD  
 SEQ ID NO:112: K(Car)GK(Car)WERPFEVKDTEEEEDFHVD  
 SEQ ID NO:113: K(Car)GKWERPFEVK(Car)DTEEEEDFHVD  
 SEQ ID NO:114: K(Car)GK(Car)WERPFEVK(Car)DTEEEEDFHVD  
 SEQ ID NO:115: DFHVDQVTTVK(Car)VPMMKRLGMF

SEQ ID NO:116: DFHVDQVTTVKVPMMK(Car)RLGMF  
 SEQ ID NO:117: DFHVDQVTTVK(Car)VPMMK(Car)RLGMF  
 SEQ ID NO:118: QVTTVK(Car)VPMMKRLGMFNIQHC  
 SEQ ID NO:119: QVTTVKVPMMK(Car)RLGMFNIQHC  
 SEQ ID NO:120: QVTTVK(Car)VPMMK(Car)RLGMFNIQHC  
 SEQ ID NO:121: RLGMFNIQHCK(Car)KLSSWVLLMK  
 SEQ ID NO:122: RLGMFNIQHCKK(Car)LSSWVLLMK  
 SEQ ID NO:123: RLGMFNIQHCKKLSSWVLLMK(Car)  
 SEQ ID NO:124: RLGMFNIQHCK(Car)K(Car)LSSWVLLMK  
 SEQ ID NO:125: RLGMFNIQHCK(Car)KLSSWVLLMK(Car)  
 SEQ ID NO:126: RLGMFNIQHCKK(Car)LSSWVLLMK(Car)  
 SEQ ID NO:127: RLGMFNIQHCK(Car)K(Car)LSSWVLLMK(Car)  
 SEQ ID NO:128: K(Car)KLSSWVLLMKYLGNAIAIFF  
 SEQ ID NO:129: KK(Car)LSSWVLLMKYLGNAIAIFF  
 SEQ ID NO:130: KKLSSWVLLMK(Car)YLGNAIAIFF  
 SEQ ID NO:131: K(Car)K(Car)LSSWVLLMKYLGNAIAIFF  
 SEQ ID NO:132: K(Car)KLSSWVLLMK(Car)YLGNAIAIFF  
 SEQ ID NO:133: KK(Car)LSSWVLLMK(Car)YLGNAIAIFF  
 SEQ ID NO:134: K(Car)K(Car)LSSWVLLMK(Car)YLGNAIAIFF  
 SEQ ID NO:135: TAIFFLPDEGK(Car)LQHLENELTH  
 SEQ ID NO:136: ENELTHDIITK(Car)FLENEDRRSA  
 SEQ ID NO:137: DRRSASLHLPK(Car)LSITGTYDLK  
 SEQ ID NO:138: DRRSASLHLPKLSITGTYDLK(Car)  
 SEQ ID NO:139: DRRSASLHLPK(Car)LSITGTYDLK(Car)  
 SEQ ID NO:140: K(Car)LSITGTYDLKSVLGQLGITK  
 SEQ ID NO:141: KLSITGTYDLK(Car)SVLGQLGITK  
 SEQ ID NO:142: KLSITGTYDLKSVLGQLGITK(Car)  
 SEQ ID NO:143: K(Car)LSITGTYDLK(Car)SVLGQLGITK  
 SEQ ID NO:144: K(Car)LSITGTYDLKSVLGQLGITK(Car)  
 SEQ ID NO:145: KLSITGTYDLK(Car)SVLGQLGITK(Car)  
 SEQ ID NO:146: K(Car)LSITGTYDLK(Car)SVLGQLGITK(Car)

SEQ ID NO:147: **K(Car)**SVLGQLGITK**VFS**NGADLSG  
 SEQ ID NO:148: KSVLGQLGITK**(Car)**VFSNGADLSG  
 SEQ ID NO:149: **K(Car)**SVLGQLGITK**(Car)**VFSNGADLSG  
 SEQ ID NO:150: LSGVTEEAPLK**(Car)**LSKAVHKAVL  
 SEQ ID NO:151: LSGVTEEAPLKLSK**(Car)**AVHKAVL  
 SEQ ID NO:152: LSGVTEEAPLKLSKAVHK**(Car)**AVL  
 SEQ ID NO:153: LSGVTEEAPLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHKAVL  
 SEQ ID NO:154: LSGVTEEAPLK**(Car)**LSKAVHK**(Car)**AVL  
 SEQ ID NO:155: LSGVTEEAPLKLSK**(Car)**AVHK**(Car)**AVL  
 SEQ ID NO:156: LSGVTEEAPLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHK**(Car)**AVL  
 SEQ ID NO:157: VTEEAPLK**(Car)**LSKAVHKAVLTID  
 SEQ ID NO:158: VTEEAPLKLSK**(Car)**AVHKAVLTID  
 SEQ ID NO:159: VTEEAPLKLSKAVHK**(Car)**AVLTID  
 SEQ ID NO:160: VTEEAPLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHKAVLTID  
 SEQ ID NO:161: VTEEAPLK**(Car)**LSKAVHK**(Car)**AVLTID  
 SEQ ID NO:162: VTEEAPLKLSK**(Car)**AVHK**(Car)**AVLTID  
 SEQ ID NO:163: VTEEAPLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHK**(Car)**AVLTID  
 SEQ ID NO:164: APLK**(Car)**LSKAVHKAVLTIDEKGT  
 SEQ ID NO:165: APLKLSK**(Car)**AVHKAVLTIDEKGT  
 SEQ ID NO:166: APLKLSKAVHK**(Car)**AVLTIDEKGT  
 SEQ ID NO:167: APLKLSKAVHKAVLTIDEK**(Car)**GT  
 SEQ ID NO:168: APLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHKAVLTIDEKGT  
 SEQ ID NO:169: APLK**(Car)**LSKAVHK**(Car)**AVLTIDEKGT  
 SEQ ID NO:170: APLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHKAVLTIDEKGT  
 SEQ ID NO:171: APLKLSK**(Car)**AVHKAVLTIDEK**(Car)**GT  
 SEQ ID NO:172: APLKLSKAVHK**(Car)**AVLTIDEK**(Car)**GT  
 SEQ ID NO:173: APLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHK**(Car)**AVLTIDEKGT  
 SEQ ID NO:174: APLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHKAVLTIDEK**(Car)**GT  
 SEQ ID NO:175: APLK**(Car)**LSKAVHK**(Car)**AVLTIDEK**(Car)**GT  
 SEQ ID NO:176: APLKLSK**(Car)**AVHK**(Car)**AVLTIDEK**(Car)**GT  
 SEQ ID NO:177: APLK**(Car)**LSK**(Car)**AVHK**(Car)**AVLTIDEK**(Car)**GT

SEQ ID NO:178: VHK(Car)AVLTIDEKGTEAAGAMFL  
 SEQ ID NO:179: VHKAVLTIDEK(Car)GTEAAGAMFL  
 SEQ ID NO:180: VHK(Car)AVLTIDEK(Car)GTEAAGAMFL  
 SEQ ID NO:181: AIPMSIPPEVK(Car)FNKPFVFLMI  
 SEQ ID NO:182: AIPMSIPPEVKFNK(Car)PFVFLMI  
 SEQ ID NO:183: AIPMSIPPEVK(Car)FNK(Car)PFVFLMI  
 SEQ ID NO:184: MSIPPEVK(Car)FNKPFVFLMIEQN  
 SEQ ID NO:185: MSIPPEVKFNK(Car)PFVFLMIEQN  
 SEQ ID NO:186: MSIPPEVK(Car)FNK(Car)PFVFLMIEQN  
 SEQ ID NO:187: FVFLMIEQNTK(Car)SPLFMGKVVN  
 SEQ ID NO:188: FVFLMIEQNTKSPLFMGK(Car)VVN  
 SEQ ID NO:189: FVFLMIEQNTK(Car)SPLFMGK(Car)VVN  
 SEQ ID NO:190: EQNTK(Car)SPLFMGKVVNPTQKAA  
 SEQ ID NO:191: EQNTKSPLFMGK(Car)VVNPTQKAA  
 SEQ ID NO:192: EQNTKSPLFMGKVVNPTQK(Car)AA  
 SEQ ID NO:193: EQNTK(Car)SPLFMGK(Car)VVNPTQKAA  
 SEQ ID NO:194: EQNTK(Car)SPLFMGKVVNPTQK(Car)AA  
 SEQ ID NO:195: EQNTKSPLFMGK(Car)VVNPTQK(Car)AA  
 SEQ ID NO:196: EQNTK(Car)SPLFMGK(Car)VVNPTQK(Car)AA  
 SEQ ID NO:197: ALVNYIFFK(Car)GKWERPFEVKDT  
 SEQ ID NO:198: ALVNYIFFKGGK(Car)WERPFEVKDT  
 SEQ ID NO:199: ALVNYIFFKGGKWERPFEVK(Car)DT  
 SEQ ID NO:200: ALVNYIFFK(Car)GK(Car)WERPFEVKDT  
 SEQ ID NO:201: ALVNYIFFK(Car)GKWERPFEVK(Car)DT  
 SEQ ID NO:202: ALVNYIFFKGGK(Car)WERPFEVK(Car)DT  
 SEQ ID NO:203: ALVNYIFFK(Car)GK(Car)WERPFEVK(Car)DT

5 En algunas realizaciones, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, o más del 95% de los restos lisina en la A1AT, o uno de sus fragmentos, está carbamilado. En algunas realizaciones, 100% de los restos lisina en la A1AT, o uno de sus fragmentos, está carbamilado.

10 En algunas realizaciones, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, o más del 95% de los restos lisina en la hA1AT, o uno de sus fragmentos, está carbamilado. En algunas realizaciones, 100% de los restos lisina en la hA1AT, o uno de sus fragmentos, está carbamilado.

10 En algunas realizaciones, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, o más del 95% de los restos lisina en la bA1AT, o uno de sus fragmentos, está carbamilado. En algunas realizaciones, 100% de los restos lisina en la bA1AT, o uno de sus fragmentos, está carbamilado.

carbamilado. En algunas realizaciones, 100% de los restos lisina en la bA1AT, o uno de sus fragmentos, está carbamilado.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una pluralidad de polipéptidos purificados. En algunas realizaciones, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los restos lisina están carbamilados en la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, de más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los polipéptidos purificados en la pluralidad de polipéptidos purificados.

10 En algunas realizaciones, la pluralidad de los polipéptidos purificados incluye polipéptidos purificados, en los que uno o más de los polipéptidos purificados incluye una secuencia de aminoácidos de A1AT de una cualquiera de SEQ ID NO:3-203.

15 En algunas realizaciones, la hA1AT, o uno de sus fragmentos, incluye un fragmento de 8 o más aminoácidos contiguos con más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la hA1AT, o uno de sus fragmentos, incluye un fragmento de 16 o más aminoácidos contiguos con más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1.

20 La hA1AT, o uno de sus fragmentos, descrita en la presente, incluye un fragmento de 8 o más aminoácidos contiguos con más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO.2. En algunas realizaciones, la hA1AT, o uno de sus fragmentos, incluye un fragmento de 16 o más aminoácidos contiguos con más del 60%, más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO.2.

25 Los pacientes con AR pueden ser muy heterogéneos con respecto a sus perfiles de biomarcadores detectables en su sangre. Por ejemplo, algunos pacientes de AR pueden ser positivos para anticuerpos anti-CarP y positivos para ACPA; algunos pacientes de AR pueden ser positivos para anticuerpos anti-CarP y negativos para ACPA; algunos pacientes de AR pueden ser negativos para anticuerpos anti-CarP y positivos para ACPA, y algunos pacientes de AR pueden ser negativos para ambos anticuerpos anti-CarP y ACPA. Se prevé que la determinación de los perfiles exhaustivos de biomarcadores para pacientes con AR facilite la identificación de subpoblaciones de pacientes con AR (por ejemplo, pacientes con AR ACPA/anticuerpos anti-CarP<sup>+</sup>), ayude en el diagnóstico de subtipos de enfermedad de AR, y ayude en el pronóstico del avance de la enfermedad y los resultados de los tratamientos para subtipos específicos de enfermedad de AR. Aunque existe algo de reactividad cruzada, los anticuerpos anti-CarP, en general, preferentemente reconocen proteínas carbamiladas frente a proteínas citrulinadas, y los ACPA, en general, preferentemente reconocen proteínas citrulinadas frente a proteínas carbamiladas. Por tanto, el reconocimiento selectivo de al menos algunas proteínas carbamiladas por los anticuerpos anti-CarP puede usarse para distinguir biomarcadores de anti-CarP y ACPA en muestras de pacientes con AR y para distinguir pacientes de AR basándose en sus perfiles de anticuerpos anti-CarP y ACPA.

40 Las A1AT, o sus fragmentos, de esta descripción incluyen, cada uno, uno o más sitios de unión al anticuerpo anti-CarP, y cada uno de los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP puede estar independientemente en un estado carbamilado o en un estado no carbamilado. Los anticuerpos anti-CarP procedentes de pacientes con artritis reumatoide humanos se unen a los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en las A1AT, o sus fragmentos, en sus estados carbamilados, pero no en sus estados no carbamilados, para formar complejos de Car-A1AT-anticuerpo anti-CarP.

45 En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP incluyen uno o más restos lisina. En algunas realizaciones, uno o más restos lisina en un sitio de unión al anticuerpo anti-CarP están carbamilados (para formar restos homocitrulina) cuando el sitio de unión al anticuerpo anti-CarP está en un estado carbamilado. En algunas realizaciones, uno o más restos lisina en un sitio de unión al anticuerpo anti-CarP no están carbamilados cuando el sitio de unión al anticuerpo anti-CarP está en un estado no carbamilado. En algunas realizaciones, todos los restos lisina en un sitio de unión al anticuerpo anti-CarP están carbamilados cuando el sitio de unión al anticuerpo anti-CarP está en un estado carbamilado.

55 La hA1AT, o uno de sus fragmentos proporcionados en la presente, incluye uno o más sitios de unión al anticuerpo anti-CarP, y cada uno de ellos puede estar independientemente en un estado carbamilado o en un estado no carbamilado, y en la que los anticuerpos anti-CarP procedentes de un paciente con AR humano se unen a los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en su estado carbamilado, pero no en su estado no carbamilado, para formar complejos de Car-hA1AT-anticuerpo anti-CarP.

La bA1AT, o uno de sus fragmentos proporcionados en la presente, incluye uno o más sitios de unión al anticuerpo anti-CarP, y cada uno de ellos puede estar independientemente en un estado carbamilado o en un estado no

carbamilado, y en la que los anticuerpos anti-CarP procedentes de un paciente con AR humano se unen a los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en su estado carbamilado, pero no en su estado no carbamilado, para formar complejos de Car-bA1AT-anticuerpo anti-CarP.

5 En algunas realizaciones, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, o más del 90% de los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP están en sus.

10 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado que incluye la A1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, es una pluralidad de polipéptidos purificados. En algunas realizaciones, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, o más del 90% de los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP están en su estado carbamilado en más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los polipéptidos purificados en la pluralidad de polipéptidos purificados.

15 En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP son reconocidos por anticuerpos anti-CarP procedentes de muestras de pacientes con artritis reumatoide, pero no son reconocidos por ACPA procedentes de muestras de pacientes con artritis reumatoide. Los ACPA pueden dirigirse contra cualquier polipéptido citrulinado, que incluyen proteínas citrulinadas, tales como vimentina citrulinada mutada ("Mutated Citrullinated Vimentin", MCV; anticuerpos anti-Cit-MCV), y péptido citrulinados, tales como el péptido citrulinado cíclico ("cyclic citrullinated peptide", CCP), o sus fragmentos.

20 En algunas realizaciones, uno o más de los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en una proteína purificada de esta descripción son reconocidos por un anticuerpo anti-CarP y un ACPA procedentes de muestras de pacientes con artritis reumatoide. En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP son reconocidos por más del 5%, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 25%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los anticuerpos anti-CarP en una muestra procedente de un paciente con artritis reumatoide, y por menos del 100%, menos del 95%, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 3%, o menos del 1% de APCA en la muestra del paciente con artritis reumatoide. En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP se unen con mayor afinidad a un anticuerpo anti-CarP procedente de una muestra de un paciente con artritis reumatoide que un APCA procedente de una muestra de un paciente con artritis reumatoide. En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP se unen con una afinidad más de 2 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 25 veces, más de 50 veces, más de 100 veces, más de 300 veces, más de 1.000 veces, más de 3.000 veces, más de 10.000 veces, más de 30.000 veces, o más de 100.000 veces mayor a un anticuerpo anti-CarP procedente de una muestra de un paciente con AR que a un APCA procedente de una muestra del paciente con AR.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP es una pluralidad de anticuerpos anti-CarP.

35 En la presente se proporciona un complejo que incluye un polipéptido purificado de esta descripción y uno o más anticuerpos anti-CarP. En algunas realizaciones, el complejo está en disolución. En algunas realizaciones, el complejo está inmovilizado sobre una superficie. En algunas realizaciones, el complejo es un complejo purificado. En algunas realizaciones, el complejo está contenido en un fluido biológico, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, leche y similares. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CarP complejados son anticuerpos purificados. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CarP complejados están contenidos en un fluido biológico, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, leche y similares.

En la presente se describen métodos para preparar un polipéptido purificado que incluye una A1AT carbamilada *in vitro* (por ejemplo, hA1AT o bA1AT), o uno de sus fragmentos. Los métodos incluyen (a) purificar un polipéptido que incluye una A1AT, o uno de sus fragmentos, y (b) carbamilar *in vitro* la A1AT, o uno de sus fragmentos.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido que incluye la A1AT, o uno de sus fragmentos, se purifica en una forma no carbamilada antes de que la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamile *in vitro*. En algunas realizaciones, el polipéptido se purifica en una forma no carbamilada a partir de un lisado celular, tal como un lisado obtenido lisando células recombinantes o células hepáticas que expresan A1AT, o uno de sus fragmentos, a partir de un sobrenadante de cultivo de células (por ejemplo, un sobrenadante de un cultivo de células hepáticas). En algunas realizaciones, el polipéptido se purifica en una forma no carbamilada a partir de sangre, plasma, suero u otro fluido biológico, o de un extracto de tejido, tal como un extracto de hígado. En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro* en el polipéptido purificado en una reacción química o enzimática, por ejemplo, en un tampón de reacción.

55 En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro* para producir un polipéptido que incluye una A1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, antes de que el polipéptido se purifique. En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro*, por ejemplo, usando una reacción química o enzimática, mientras se encuentra en un lisado celular, tal como un lisado obtenido lisando células recombinantes o células hepáticas que expresan A1AT, o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro* en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico, o en un extracto de tejido, tal como

5 un extracto de hígado. En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro* en suero de ternero fetal (FCS), suero bovino, o suero humano. En algunas realizaciones, el polipéptido que incluye la A1AT carbamificada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, se purifica usando técnicas de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad) para producir el polipéptido purificado que incluye el polipéptido de A1AT carbamificado *in vitro*, o uno de sus fragmentos.

La A1AT carbamificada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, proporcionada en la presente, es una A1AT humana (hA1AT), o uno de sus fragmentos. La A1AT carbamificada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, descrita en la presente puede ser una A1AT bovina (bA1AT), o uno de sus fragmentos.

10 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado que incluye la A1AT carbamificada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, se prepara mediante síntesis química, por ejemplo, usando una síntesis de péptidos en fase sólida. En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro* reemplazando uno o más restos lisina en la A1AT, o uno de sus fragmentos, por restos homocitrulina durante la síntesis del polipéptido purificado. En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro* mediante una modificación química o enzimática de los grupos  $\epsilon$ -amino de uno o más restos lisina de A1AT.

15 En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro* bajo condiciones que incluyen un exceso molar de un reactivo de carbamitación (por ejemplo, ácido isocianico (HNCO), cianato ([NCO]<sup>-</sup>), compuestos orgánicos que contienen un grupo isocianato, tiocianato, o carbamoil-fosfato) frente al polipéptido purificado que incluye la A1AT, o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, se carbamila *in vitro* bajo condiciones que incluyen un exceso molar de un reactivo de carbamitación frente a los restos  
20 lisina en la proteína purificada que incluye la A1AT, o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, el exceso molar del reactivo de carbamitación es más de 3 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 30 veces, más de 100 veces, más de 300 veces, más de 1.000 veces, más de 3.000 veces, o más de 10.000 veces mayor frente al polipéptido purificado que incluye la A1AT, o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, el exceso molar del reactivo de carbamitación es más de 3 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 30 veces, más de 100  
25 veces, más de 300 veces, más de 1.000 veces, más de 3.000 veces, o más de 10.000 veces mayor frente a los restos lisina en la proteína purificada que incluye la A1AT, o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado que incluye la A1AT carbamificada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, se carbamila bajo condiciones en las que la reacción de carbamitación alcanza un equilibrio termodinámico.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una pluralidad de polipéptidos purificados, por ejemplo, un banco de polipéptidos purificados.

Los métodos para modificar proteínas *in vitro* e *in vivo* son muy conocidos en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos de métodos, por ejemplo, en Lundblad R.L., Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press, 4<sup>a</sup> edición (2014); Walker J.M., The Protein Protocols Handbook (Springer Handbooks), Humana Press, 3<sup>a</sup> edición (2009); Pollegioni L. y Servi S., Unnatural Amino Acids: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 794), Humana Press, edición de 2012 (2011).  
35

Los métodos analíticos para determinar el grado de carbamitación en el polipéptido purificado que incluye la A1AT carbamificada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, la posición de los restos carbamitados en la A1AT, o uno de sus fragmentos, y la homogeneidad de los polipéptidos carbamitados en una población de polipéptidos carbamitados son muy conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, cromatografía líquida (LC), espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida a alta presión (HPLC), electroforesis capilar (CE), o sus combinaciones (por ejemplo, LC-MS).  
40

Pueden encontrarse ejemplos de métodos analíticos para caracterizar proteínas y modificaciones de proteínas, por ejemplo, en Whitelegge J., Protein Mass Spectrometry, volumen 52 (Comprehensive Analytical Chemistry), Elsevier Science, 1<sup>a</sup> edición (2008); Wehr T. *et al.*, Basic HPLC and CE of Biomolecules, Bay Bioanalytical Laboratory, 1<sup>a</sup> edición (1998); Aguilar M.-I., HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press, edición de 2004 (2003).  
45

En la presente se proporcionan kits para detectar un anticuerpo antiproteína carbamificada (anti-CarP) para diagnosticar, controlar o pronosticar la AR, o para determinar la eficacia de un tratamiento de la AR en un sujeto, y el kit incluye un polipéptido purificado que incluye una A1AT carbamificada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, y uno o más reactivos auxiliares. La A1AT carbamificada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, proporcionada en la presente es un polipéptido humano (hA1AT). Una A1AT carbamificada *in vitro* o uno de sus fragmentos, descrita en la presente puede ser un polipéptido bovino (bA1AT).  
50

Los reactivos auxiliares pueden incluir, por ejemplo, un tampón de inmovilización, un reactivo de inmovilización, un tampón de dilución, un anticuerpo secundario, un reactivo de detección, un tampón de bloqueo, un tampón de lavado, un tampón de detección, un reactivo de detección, una disolución de detención, un tampón de enjuagado del sistema, y una disolución de limpieza del sistema.  
55

Los expertos en la técnica apreciarán que, en la técnica, son conocidos numerosos tampones de inmovilización y que la selección de cualquier tampón de revestimiento específico puede basarse, por ejemplo, en la naturaleza de la

superficie revestida (por ejemplo, una placa de microtitulación Nunc Maxisorb) y la naturaleza del sustrato revestido (por ejemplo, Car-AIAT). Los tampones de revestimiento incluyen, por ejemplo, tampones de carbonato de sodio-hidróxido de sodio y tampones fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de revestimiento es  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M (por ejemplo, pH aproximadamente 9,6).

- 5 Los kits de esta descripción pueden incluir cualquier reactivo de inmovilización conocido en la técnica, que incluyen reactivos de inmovilización covalente y no covalente. Los reactivos de inmovilización covalente pueden incluir cualquier reactivo químico o biológico que pueda usarse para inmovilizar covalentemente un polipéptido de esta descripción sobre una superficie. Los reactivos de inmovilización covalente pueden incluir, por ejemplo, un grupo reactivo de carboxilo a amina (por ejemplo, carbodiimidas, tales como EDC o DCC), un grupo reactivo de amina (por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), imidoésteres), un reticulante reactivo a sulfhidrilo (por ejemplo, maleimidias, haloacetilos, disulfuros de piridilo), grupos reticulantes reactivos a carbonilo (por ejemplo, hidrazidas, alcoxiaminas), un reticulante fotorreactivo (por ejemplo, aril azidas, dizirinas), o un grupo de acoplamiento quimioselectivo (por ejemplo, una pareja de reacción de Staudinger). Los reactivos de inmovilización no covalente incluyen cualquier reactivo químico o biológico que pueda usarse para inmovilizar de forma no covalente un polipéptido de esta descripción sobre una superficie, tales como marcadores de afinidad (por ejemplo, biotina) o reactivos de captura (por ejemplo, estreptavidina o anticuerpos antimarcador, tales como anticuerpos anti-His<sub>6</sub> o anti-Myc).

- 20 Los kits de esta descripción pueden incluir combinaciones de reactivos de inmovilización. Estas combinaciones incluyen, por ejemplo, EDC y NHS, que pueden usarse, por ejemplo, para inmovilizar una proteína de esta descripción sobre una superficie, tal como una matriz de dextrano carboxilada (por ejemplo, sobre un chip BIAcore™ CM5 o una esfera basada en dextrano). Las combinaciones de reactivos de inmovilización pueden conservarse como combinaciones de reactivos premezcladas, o uno o más reactivos de inmovilización de la combinación se conserva por separado de otros reactivos de inmovilización.

- 25 En la técnica se conoce una enorme selección de tampones de lavado, tales como tapones basados en tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (por ejemplo, disolución salina tamponada con Tris, "Tris-buffered saline", TBS) o tampones fosfato (por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato, "phosphate-buffered saline", PBS). Los tampones de lavado generalmente incluyen detergentes, tales como detergentes iónicos o no iónicos. En algunas realizaciones, el tampón de lavado es un tampón PBS (por ejemplo, pH aproximadamente 7,4) que incluye Tween@20 (por ejemplo, Tween@20 aproximadamente al 0,05%). En algunas realizaciones, el tampón de lavado es la disolución de lavado BIO-FLASH™ Special Wash Solution (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA).

- 30 Un kit de esta descripción puede incluir cualquier tampón de dilución conocido en la técnica. Los tampones de dilución típicos incluyen una proteína vehículo (por ejemplo, albúmina de suero bovina, "bovine serum albumin", BSA) y un detergente (por ejemplo, Tween@20). En algunas realizaciones, el tampón de dilución es PBS (por ejemplo, pH aproximadamente 7,4) que incluyen BSA (por ejemplo, BSA aproximadamente al 1%) y Tween@20 (por ejemplo, Tween@20 aproximadamente al 0,05%).

- 35 Los anticuerpos secundarios pueden incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgA humana, un anticuerpo anti-IgD humana, un anticuerpo anti-IgE humana, un anticuerpo anti-IgG humana, o un anticuerpo anti-IgM humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos secundarios son anticuerpos antibovinos. Los anticuerpos de detección secundarios pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos secundarios pueden derivarse de cualquier organismo mamífero, que incluye ratones, ratas, hámsteres, cabras, camellos, pollos, conejos y otros. Los anticuerpos secundarios pueden conjugarse a enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, "horseradish peroxidase", HRP), fosfatasa alcalina (PA), luciferasa y similares) o tintes (por ejemplo, tintes colorimétricos, tintes fluorescentes, tintes de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), tintes FRET de resolución en el tiempo ((TR)-FRET) y similares). En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-IgG humana de conejo policlonal, que está conjugado a HRP.

- 40 En algunas realizaciones, el reactivo de detección es un reactivo de detección colorimétrico, un reactivo de detección fluorescente, o un reactivo de detección quimioluminiscente. En algunas realizaciones, el reactivo de detección colorimétrico incluye PNPP (p-nitrofenilfosfato), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) u OPD (o-fenilendiamina). En algunas realizaciones, el reactivo de detección fluorescente incluye QuantaBlu™ o QuantaRed™ (Thermo Scientific, Waltham, MA). En algunas realizaciones, el reactivo de detección luminiscente incluye luminol o luciferina. En algunas realizaciones, el reactivo de detección incluye un activador (por ejemplo,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y un trazador (por ejemplo, conjugado de isoluminol). En algunas realizaciones, el reactivo de detección incluye una o más disoluciones de activador BIO-FLASH™ Trigger (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA).

- 45 Un kit de esta descripción puede incluir cualquier tampón de detección conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el tampón de detección es un tampón de citrato-fosfato (por ejemplo, pH aproximadamente 4,2).

Un kit de esta descripción puede incluir cualquier disolución de detención conocido en la técnica. Las disoluciones de detención de esta descripción terminan o retrasan el posterior revelado del reactivo de detección y las correspondientes señales del ensayo. Las disoluciones de detención pueden incluir, por ejemplo, tampones con pH bajo (por ejemplo, tampón glicina, pH 2,0), agentes caotrópicos (por ejemplo, cloruro de guanidinio, dodecilsulfato de

sodio (SDS)) o agentes reductores (por ejemplo, ditioneitol,  $\beta$ -mercaptoetanol), o similares.

- En algunas realizaciones, los kits de esta descripción incluyen reactivos de limpieza para sistemas de ensayo automáticos. Los sistemas de ensayo automáticos pueden incluir sistemas de cualquier fabricante. En algunas realizaciones, los sistemas de ensayo automáticos incluyen, por ejemplo, los sistemas BIO-FLASH™, BEST 2000™, DS2™, ELx50 WASHER, ELx800 WASHER, ELx800 READER, y Autoblots S20™ (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA). Los reactivos de limpieza pueden incluir cualquier reactivo de limpieza conocido en la técnica. En algunas realizaciones, los reactivos de limpieza son los reactivos de limpieza recomendados por los fabricantes de los sistemas de ensayo automáticos. En algunas realizaciones, los reactivos de limpieza incluyen las disoluciones BIO-FLASH™ System Rinse o BIO-FLASH™ System Cleaning (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA).
- 5 En algunas realizaciones, el kit incluye además un soporte sólido. El soporte sólido puede incluir cualquier soporte conocido en la técnica sobre el cual una proteína de esta descripción puede inmovilizarse. En algunas realizaciones, los sustratos sólidos son placas de pocillos de microtitulación, portaobjetos (por ejemplo, portaobjetos de vidrio), chips (por ejemplo, chips de proteínas, chips biodetectores, tales como chips Biacore), cartuchos microfluídicos, cubetas, esferas (por ejemplo, esferas magnéticas, esferas xMAP®) o resinas.
- 10 En algunas realizaciones, los kits de esta descripción incluyen una placa de microtitulación. En algunas realizaciones, la placa de microtitulación es una placa de 96 pocillos, una placa de 384 pocillos, o una placa de 1536 pocillos. En algunas realizaciones, la placa de microtitulación incluye una proteína de esta descripción inmovilizada en uno o más pocillos de la placa de microtitulación. En algunas realizaciones, la placa de microtitulación es una placa Nunc Maxisorp® (por ejemplo, Fisher Scientific, Hampton, NH, n.º de catálogo 430341).
- 15 En algunas realizaciones, los kits de esta descripción incluyen una cubeta. En algunas realizaciones, la cubeta es una cubeta BIOFLASH™ (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA).

En algunas realizaciones, los kits de esta descripción incluyen esferas o microesferas (por ejemplo, esferas xMAP® (Luminex; Austin, TX)). En algunas realizaciones, las esferas tienen un código de color.

- En algunas realizaciones, los kits de esta descripción incluyen uno o más artículos adicionales. En algunas realizaciones, el artículo es una copa de muestras (por ejemplo, una copa de muestras de 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, o 50 ml) o un tapón de rosca. En algunas realizaciones, la copa de muestras es un tubo Falcon™ (BD Biosciences, San José, CA) o similares. En algunas realizaciones, la copa de muestras es una copa de muestras BIO-FLASH™ (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA). En algunas realizaciones, el tapón de rosca es un tapón de rosca BIO-FLASH™ (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA).
- 25 En algunas realizaciones, el kit incluye además instrucciones para usar los componentes del kit para detectar anticuerpos anti-CarP en una muestra procedente del sujeto.

- Los kits de esta descripción pueden adaptarse para tecnologías de ensayo específicas. En algunas realizaciones, los kits son kits de ELISA, kits de transferencia por puntos, kits de inmunoensayo de quimioluminiscencia ("chemiluminescence immunoassay", CIA) o kits de múltiplex. En algunas realizaciones, los kits de ELISA incluyen un tampón de lavado, un diluyente de la muestra, un conjugado de anticuerpo secundario-enzima, un reactivo de detección y una disolución de detención. En algunas realizaciones, los kits de transferencia por puntos incluyen un tampón de lavado, un diluyente de la muestra, un conjugado de anticuerpo secundario-enzima, un reactivo de detección y una disolución de detención. En algunas realizaciones, el kit de CIA incluye un tampón de lavado, un diluyente de la muestra, un trazador (por ejemplo, conjugado de isoluminol) y un activador (por ejemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En algunas realizaciones, el kit de múltiplex incluye un tampón de lavado, un diluyente de la muestra y un conjugado de anticuerpo secundario-enzima. En algunas realizaciones, los kits se adaptan a la plataforma Luminex e incluyen, por ejemplo, esferas xMAP®.
- 30 En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para diagnosticar la AR en un paciente, para diferenciar subpoblaciones de pacientes con AR (por ejemplo, para diferenciar pacientes ACPA/anti-CarP+ de pacientes ACPA/anti-CarP-), para pronosticar el avance de la enfermedad en pacientes con AR (por ejemplo, para predecir un avance de la enfermedad más grave en pacientes ACPA/anti-CarP+ con relación a pacientes ACPA/anti-CarP-, o para predecir el desarrollo de síntomas clínicos en pacientes con artralgia), para controlar la eficacia de tratamientos de la AR o para predecir los resultados de los tratamientos. En algunas realizaciones, los tratamientos de la AR incluyen tratamientos con fármacos. En algunas realizaciones, los tratamientos con fármacos incluyen tratamientos con prednisona, meloxicamo, celebrex, mobic, naproxeno, remicada IV, plaquenil, metotrexato, diclofenaco, metilprednisolona, enbrel, indometacina, ibuprofeno, cenalog, etodolaco, nabumetona, humira, aleva, minociclina, orencia, rituxano, o cualquier fármaco para la AR aprobado por FDA o EMA, incluyendo los fármacos experimentales para la AR en desarrollo clínico. En algunas realizaciones, los kits se emplean como diagnóstico de acompañamiento para tratamientos de la AR. En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para seleccionar tratamientos de la AR específicos de paciente.
- 35 En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para diagnosticar la AR en un paciente, para diferenciar subpoblaciones de pacientes con AR (por ejemplo, para diferenciar pacientes ACPA/anti-CarP+ de pacientes ACPA/anti-CarP-), para pronosticar el avance de la enfermedad en pacientes con AR (por ejemplo, para predecir un avance de la enfermedad más grave en pacientes ACPA/anti-CarP+ con relación a pacientes ACPA/anti-CarP-, o para predecir el desarrollo de síntomas clínicos en pacientes con artralgia), para controlar la eficacia de tratamientos de la AR o para predecir los resultados de los tratamientos. En algunas realizaciones, los tratamientos de la AR incluyen tratamientos con fármacos. En algunas realizaciones, los tratamientos con fármacos incluyen tratamientos con prednisona, meloxicamo, celebrex, mobic, naproxeno, remicada IV, plaquenil, metotrexato, diclofenaco, metilprednisolona, enbrel, indometacina, ibuprofeno, cenalog, etodolaco, nabumetona, humira, aleva, minociclina, orencia, rituxano, o cualquier fármaco para la AR aprobado por FDA o EMA, incluyendo los fármacos experimentales para la AR en desarrollo clínico. En algunas realizaciones, los kits se emplean como diagnóstico de acompañamiento para tratamientos de la AR. En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para seleccionar tratamientos de la AR específicos de paciente.
- 40 En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para diagnosticar la AR en un paciente, para diferenciar subpoblaciones de pacientes con AR (por ejemplo, para diferenciar pacientes ACPA/anti-CarP+ de pacientes ACPA/anti-CarP-), para pronosticar el avance de la enfermedad en pacientes con AR (por ejemplo, para predecir un avance de la enfermedad más grave en pacientes ACPA/anti-CarP+ con relación a pacientes ACPA/anti-CarP-, o para predecir el desarrollo de síntomas clínicos en pacientes con artralgia), para controlar la eficacia de tratamientos de la AR o para predecir los resultados de los tratamientos. En algunas realizaciones, los tratamientos de la AR incluyen tratamientos con fármacos. En algunas realizaciones, los tratamientos con fármacos incluyen tratamientos con prednisona, meloxicamo, celebrex, mobic, naproxeno, remicada IV, plaquenil, metotrexato, diclofenaco, metilprednisolona, enbrel, indometacina, ibuprofeno, cenalog, etodolaco, nabumetona, humira, aleva, minociclina, orencia, rituxano, o cualquier fármaco para la AR aprobado por FDA o EMA, incluyendo los fármacos experimentales para la AR en desarrollo clínico. En algunas realizaciones, los kits se emplean como diagnóstico de acompañamiento para tratamientos de la AR. En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para seleccionar tratamientos de la AR específicos de paciente.
- 45 En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para diagnosticar la AR en un paciente, para diferenciar subpoblaciones de pacientes con AR (por ejemplo, para diferenciar pacientes ACPA/anti-CarP+ de pacientes ACPA/anti-CarP-), para pronosticar el avance de la enfermedad en pacientes con AR (por ejemplo, para predecir un avance de la enfermedad más grave en pacientes ACPA/anti-CarP+ con relación a pacientes ACPA/anti-CarP-, o para predecir el desarrollo de síntomas clínicos en pacientes con artralgia), para controlar la eficacia de tratamientos de la AR o para predecir los resultados de los tratamientos. En algunas realizaciones, los tratamientos de la AR incluyen tratamientos con fármacos. En algunas realizaciones, los tratamientos con fármacos incluyen tratamientos con prednisona, meloxicamo, celebrex, mobic, naproxeno, remicada IV, plaquenil, metotrexato, diclofenaco, metilprednisolona, enbrel, indometacina, ibuprofeno, cenalog, etodolaco, nabumetona, humira, aleva, minociclina, orencia, rituxano, o cualquier fármaco para la AR aprobado por FDA o EMA, incluyendo los fármacos experimentales para la AR en desarrollo clínico. En algunas realizaciones, los kits se emplean como diagnóstico de acompañamiento para tratamientos de la AR. En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para seleccionar tratamientos de la AR específicos de paciente.
- 50 En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para diagnosticar la AR en un paciente, para diferenciar subpoblaciones de pacientes con AR (por ejemplo, para diferenciar pacientes ACPA/anti-CarP+ de pacientes ACPA/anti-CarP-), para pronosticar el avance de la enfermedad en pacientes con AR (por ejemplo, para predecir un avance de la enfermedad más grave en pacientes ACPA/anti-CarP+ con relación a pacientes ACPA/anti-CarP-, o para predecir el desarrollo de síntomas clínicos en pacientes con artralgia), para controlar la eficacia de tratamientos de la AR o para predecir los resultados de los tratamientos. En algunas realizaciones, los tratamientos de la AR incluyen tratamientos con fármacos. En algunas realizaciones, los tratamientos con fármacos incluyen tratamientos con prednisona, meloxicamo, celebrex, mobic, naproxeno, remicada IV, plaquenil, metotrexato, diclofenaco, metilprednisolona, enbrel, indometacina, ibuprofeno, cenalog, etodolaco, nabumetona, humira, aleva, minociclina, orencia, rituxano, o cualquier fármaco para la AR aprobado por FDA o EMA, incluyendo los fármacos experimentales para la AR en desarrollo clínico. En algunas realizaciones, los kits se emplean como diagnóstico de acompañamiento para tratamientos de la AR. En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para seleccionar tratamientos de la AR específicos de paciente.
- 55 En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para diagnosticar la AR en un paciente, para diferenciar subpoblaciones de pacientes con AR (por ejemplo, para diferenciar pacientes ACPA/anti-CarP+ de pacientes ACPA/anti-CarP-), para pronosticar el avance de la enfermedad en pacientes con AR (por ejemplo, para predecir un avance de la enfermedad más grave en pacientes ACPA/anti-CarP+ con relación a pacientes ACPA/anti-CarP-, o para predecir el desarrollo de síntomas clínicos en pacientes con artralgia), para controlar la eficacia de tratamientos de la AR o para predecir los resultados de los tratamientos. En algunas realizaciones, los tratamientos de la AR incluyen tratamientos con fármacos. En algunas realizaciones, los tratamientos con fármacos incluyen tratamientos con prednisona, meloxicamo, celebrex, mobic, naproxeno, remicada IV, plaquenil, metotrexato, diclofenaco, metilprednisolona, enbrel, indometacina, ibuprofeno, cenalog, etodolaco, nabumetona, humira, aleva, minociclina, orencia, rituxano, o cualquier fármaco para la AR aprobado por FDA o EMA, incluyendo los fármacos experimentales para la AR en desarrollo clínico. En algunas realizaciones, los kits se emplean como diagnóstico de acompañamiento para tratamientos de la AR. En algunas realizaciones, los kits de esta descripción se usan para seleccionar tratamientos de la AR específicos de paciente.

En algunas realizaciones, los kits incluyen un envase que tiene una etiqueta que indica que el kit se usa para el diagnóstico, el pronóstico o el control de la AR o de un subtipo de AR. Los subtipos de AR pueden definirse, por ejemplo, según los síntomas clínicos de la enfermedad, o la presencia o la ausencia de biomarcadores genómicos o

proteómicos conocidos en la técnica (por ejemplo, ACPA). En algunas realizaciones, la etiqueta está aprobada por una agencia reguladora gubernamental. En algunas realizaciones, la etiqueta está aprobada por the United States Food and Drug Administration (FDA), the European Medicines Agency (EMA), the China Food and Drug Administration (CFDA) o the Japanese Ministry of Health Labor and Welfare (MHLW). Las etiquetas aprobadas por la FDA pueden incluir la notificación de un uso aprobado por la FDA e instrucciones para ello. En algunas realizaciones, los kits se etiquetan para un uso solo en investigación ("Research Use Only", RUO; o "Investigational Use Only", IUO). En algunas realizaciones, los kits se etiquetan para un uso en el diagnóstico *in vitro* ("In vitro Diagnostic Use", IVD). En algunas realizaciones, los kits se etiquetan según el título 21, Code of Federal Regulations, sección 809, subparte B (21 CFR 809, subparte B). En algunas realizaciones, las etiquetas de RUO, IUO, o IVD de los kits describen el uso de los kits para el diagnóstico de la AR. En algunas realizaciones, las etiquetas de RUO, IUO, o IVD de los kits describen el uso de los kits para el diagnóstico de un subtipo de AR. En algunas realizaciones, las etiquetas de RUO, IUO, o IVD de los kits describen el uso de los kits para el pronóstico de la AR. En algunas realizaciones, los kits se etiquetan como dispositivos de diagnóstico acompañantes a IVD. En algunas realizaciones, los kits se etiquetan como dispositivos de diagnóstico acompañantes a IVD para un uso con un fármaco para la AR, tal como prednisona, meloxicamo, celebrex, mobic, naproxeno, remicada IV, plaquenil, metotrexato, diclofenaco, metilprednisolona, enbrel, indometacina, ibuprofeno, cenalog, etodolaco, nabumetona, humira, aleva, minociclina, orenzia, rituxano, o cualquier fármaco para la AR aprobado por FDA, incluyendo los fármacos experimentales para la AR en desarrollo clínico.

En la presente se proporcionan métodos para detectar anticuerpos anti-proteína carbamilada (anti-CarP) en un sujeto, que incluyen: a) poner en contacto una muestra procedente del sujeto con un polipéptido purificado que incluye una alfa-1-antitripsina humana carbamilada *in vitro* (hA1AT), o uno de sus fragmentos, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP y el polipéptido purificado; y b) detectar la presencia o la ausencia de un complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en la muestra.

En algunas realizaciones, la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido se detecta mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo inmunoabsorbente fluorescente (FIA), un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CIA), un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo multiplicado por enzimas, un radioinmunoensayo en fase sólida (SPROA), un ensayo de polarización de fluorescencia (FP), un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia de resolución en el tiempo (TR-FRET), un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (SPR), y un ensayo de transferencia por puntos ("Dot-Blot").

En algunas realizaciones, el ELISA es un ELISA de "sándwich". En algunas realizaciones, el ELISA de "sándwich" incluye la etapa inicial de inmovilizar un polipéptido purificado de esta descripción sobre un soporte sólido (por ejemplo, sobre la pared de un pocillo de una placa de microtitulación o de una cubeta). En algunas realizaciones, el contacto de la muestra procedente del sujeto con el polipéptido purificado de esta descripción incluye exponer la muestra al polipéptido purificado inmovilizado.

En algunas realizaciones, el ELISA es un ELISA directo. En algunas realizaciones, el ELISA directo incluye la etapa inicial de inmovilizar los anticuerpos anti-CarP en la muestra sobre un soporte sólido (por ejemplo, sobre la pared de un pocillo de una placa de microtitulación o de una cubeta). En algunas realizaciones, el contacto de la muestra procedente del sujeto con el polipéptido purificado de esta descripción incluye exponer al polipéptido purificado de esta descripción a los anticuerpos anti-CarP inmovilizados.

En algunas realizaciones, la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido se detecta al mismo tiempo que la presencia o la ausencia de otro analito (por ejemplo, otro biomarcador o marcador de enfermedad) en un ensayo de múltiplex. En algunas realizaciones, la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido se detecta al mismo tiempo que la presencia o la ausencia de un complejo de ACPA-ACP en un ensayo de múltiplex.

Los métodos y los protocolos para realizar inmunoensayos y ensayos de interacción de proteínas biofísicos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Wild D., *The Immunoassay Handbook*, Elsevier Science, 4ª edición (2013); Fu H., *Protein-Protein Interactions*, Humana Press, 4ª edición (2004).

En algunas realizaciones, los métodos para detectar anticuerpos anti-CarP se realizan según el siguiente protocolo. En primer lugar, un polipéptido carbamilado *in vitro* purificado de esta descripción (Car-A1AT) y un control negativo de A1AT no carbamilado se diluyen en tampón de revestimiento para preparar disoluciones 10 µg/ml de Car-A1AT y A1AT. Se dispensan 50 µl de la disolución de Car-A1AT en pocillos de control positivo y pocillos de ensayo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se dispensan 50 µl de la disolución de A1AT en los pocillos de control negativo en la misma placa de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación y las disoluciones de polipéptido se incuban durante la noche a 4 °C. Después, se añaden 100 µl de tampón de bloqueo a los pocillos de control positivo, de control negativo y de ensayo de la placa de microtitulación, y la placa se incuba durante 6 horas más a 4 °C. Al final del periodo de incubación, la placa se lava tres veces con tampón de lavado. Las muestras de ensayo de suero (que tienen un contenido desconocido en anticuerpos anti-CarP) se diluyen en 50 veces en tampón de dilución; se preparan patrones de control positivo usando muestras de suero que se sabe que contienen anticuerpos anti-CarP (por ejemplo, como patrones de concentración única o series de dilución) y se preparan

- muestras de control negativo usando solo tampones de dilución o muestras de suero que se sabe que no contienen anticuerpos anti-CarP. Después de retirar el tampón de lavado de la placa de microtitulación, se añaden 50 µl de las muestras de ensayo, las muestras de control positivo y las muestras de control negativo a los pocillos de ensayo, de control negativo y de control positivo en la placa de microtitulación, respectivamente. Después, la placa de microtitulación se incuba durante la noche a 4 °C en hielo. Al día siguiente, la placa de microtitulación se lava tres veces con tampón de lavado. Se diluye anti-IgG humana de conejo-HRP 1:5.000 en tampón de dilución y se añaden 50 µl del conjugado de anticuerpo a cada pocillo de la placa de microtitulación después de retirar el tampón de lavado. Después de 3,5 horas de incubación a 4 °C en hielo, la placa de microtitulación se lava tres veces más con tampón de lavado. Se prepara una disolución de sustrato de detección añadiendo 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 ml de disolución ABTS (concentración según las instrucciones del fabricante). Se añaden 50 µl de la disolución de sustrato de detección a cada pocillo de la placa de microtitulación después de retirar el tampón de lavado. Después la placa de microtitulación se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5-5 min y se lee en un lector de ELISA. Las señales de absorbancia relativa para los pocillos de control negativo (por ejemplo, promedio o mediana de las señales) se restan de las señales obtenidas para el pocillo de ensayo y los pocillos de control positivo. Las muestras de suero de ensayo que producen unas señales de absorbancia significativas por encima del fondo (por ejemplo, 2 desviaciones estándar ("standard deviations", STD) por encima de las señales del pocillo de control negativo) se consideran positivas a anticuerpos anti-CarP. Los anticuerpos anti-CarP pueden cuantificarse en muestras positivas a anticuerpos anti-CarP comparando las señales de absorbancia relativa de los pocillos de ensayo con las señales de absorbancia observadas para las células de control positivo.
- En algunas realizaciones, los métodos de esta descripción se realizan, al menos en parte, usando uno o más sistemas de ensayo automáticos. En algunas realizaciones, el sistema de ensayo automático incluye, por ejemplo, un sistema de ensayo automático BIO-FLASH™, BEST 2000™, DS2™, ELx50 WASHER, ELx800 WASHER, ELx800 READER, y Autoblot S20™ (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA).
- En algunas realizaciones, los métodos para detectar un anticuerpo anti-CarP incluyen además la etapa inicial de preparar un polipéptido purificado de esta descripción. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una proteína recombinante preparada a partir de ADNc. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es una A1AT, o uno de sus fragmentos, preparado a partir de sangre, plasma, suero, fluido sinovial u otro tejido o fluido corporal.
- En algunas realizaciones, el polipéptido purificado que incluye la A1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, se prepara (a) purificando un polipéptido que incluye una A1AT, o uno de sus fragmentos, y (b) carbamylando *in vitro* la A1AT, o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado se prepara en primer lugar purificando el polipéptido, mientras la A1AT está en un estado no carbamylado, y después carbamylando *in vitro* la A1AT, o uno de sus fragmentos, en el polipéptido purificado. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado se prepara en primer lugar carbamylando *in vitro* la A1AT, o uno de sus fragmentos, mientras el polipéptido se encuentra en un estado no purificado, por ejemplo, en una mezcla biológica (por ejemplo, un lisado celular o una muestra de sangre, suero o plasma), y después purificando el polipéptido que incluye la A1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos.
- En algunas realizaciones, la A1AT, o uno de sus fragmentos, incluye uno o más sitios de unión al anticuerpo anti-CarP, cada uno de los cuales puede estar independientemente en un estado carbamylado o en un estado no carbamylado, y en las que los anticuerpos anti-CarP procedentes de sujetos humanos se unen a los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en sus estados carbamylados, pero no en sus estados no carbamylados, para formar complejos de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP.
- En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP son reconocidos por un anticuerpo anti-CarP de una manera independiente de la secuencia de aminoácidos. Los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP reconocidos de una manera independiente de la secuencia incluyen una resto lisina carbamylado (K(Car); homocitrulina), y ningún otro resto adicional. En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP son reconocidos por un anticuerpo anti-CarP de una manera específica de secuencia. Los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP reconocidos de una manera específica de secuencia incluyen una resto lisina carbamylado (K(Car); homocitrulina), y uno o más restos adicionales de la A1AT, o unos de sus fragmentos. Dichos uno o más restos adicionales de la A1AT, o uno de sus fragmentos, pueden formar parte de un epitopo lineal o un epitopo no lineal. Dichos uno o más restos adicionales de la A1AT, o uno de sus fragmentos, pueden incluir, por ejemplo, un resto adicional, dos restos adicionales, dos o más restos adicionales, tres o más restos adicionales, cuatro o más restos adicionales, cinco o más restos adicionales, seis o más restos adicionales, siete o más restos adicionales, ocho o más restos adicionales, nueve o más restos adicionales, 10 o más restos adicionales, 12 o más restos adicionales, 14 o más restos adicionales, 16 o más restos adicionales, 18 o más restos adicionales, o 20 o más restos adicionales.
- En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP se unen a los anticuerpos anti-CarP en su estado carbamylado, pero no en su estado no carbamylado. En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP se unen a los anticuerpos anti-CarP con afinidad mayor en su estado carbamylado que en su estado no carbamylado. En algunas realizaciones, los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP se unen a anticuerpos anti-CarP con una afinidad de unión más de 2 veces, más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 8 veces, más de 10 veces, más de 15 veces, más de 20 veces, más de 25 veces, más de 50 veces, más de 100 veces, más de 300 veces, más de 1.000 veces, más de 3.000 veces, más de 10.000 veces, más de 30.000 veces, o

más de 100.000 veces mayor en su estado carbamylado que en su estado no carbamylado. La mayor afinidad de unión se pone de manifiesto, por ejemplo, por unas constantes de disociación menores ( $K_D$ ) para el complejo de anticuerpo anti-CarP-Car-A1AT o por unas constantes de asociación mayores ( $K_A$ ) por los respectivos anticuerpos anti-CarP y Car-A1AT. En algunas realizaciones, las constantes de disociación ( $K_D$ ) para los complejos de anticuerpo anti-CarP-Car-A1AT son menores que 1 mM, menores que 300 nM, menores que 100 nM, menores que 30 nM, menores que 10 nM, menores que 3 nM, menores que 1 nM, menores que 300 pM, menores que 100 pM, menores que 30 pM, menores que 10 pM, menores que 3 pM, o menores que 1 pM. Los métodos para medir las afinidades de unión de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-CarP) a antígenos (por ejemplo, Car-A1AT) son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, calorimetría de titulación isotérmica ("isothermal titration calorimetry", ITC) y resonancia de plasmón de superficie (SPR).

Los complejos de anticuerpos anti-CarP y un polipéptido purificado con la A1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, tienen una estequiometría de uno a uno o más anticuerpos anti-CarP. En algunas realizaciones, los complejos tienen un anticuerpo anti-CarP por polipéptido purificado. En algunas realizaciones, los complejos tienen dos anticuerpos anti-CarP por polipéptido purificado. En algunas realizaciones, los complejos tienen más de dos anticuerpos anti-CarP por polipéptido purificado. Los métodos para medir las estequiometrías de unión de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-CarP) a antígenos (por ejemplo, Car-A1AT) son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y ultracentrifugación.

En algunas realizaciones, los complejos de anticuerpos anti-CarP y un polipéptido purificado con la A1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, son una pluralidad de complejos con idéntica estequiometría. Por ejemplo, todos los complejos en la pluralidad de complejos tienen un anticuerpo anti-CarP por polipéptido purificado. En algunas realizaciones, los complejos de anticuerpos anti-CarP y un polipéptido purificado con la A1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, son una pluralidad de complejos con estequiometrías diferentes. Por ejemplo, algunos complejos en la pluralidad de complejos pueden tener un anticuerpo anti-CarP por polipéptido purificado, y otros complejos en la pluralidad de complejos pueden tener más de un anticuerpo anti-CarP por polipéptido purificado.

En algunas realizaciones, los complejos de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP se forman en disolución. En algunas realizaciones, los complejos de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP se forman sobre una superficie sólida. En algunas realizaciones, los complejos de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP se forman inmovilizando en primer lugar el polipéptido purificado sobre la superficie, y después poniendo en contacto los anticuerpos anti-CarP en disolución con el polipéptido purificado inmovilizado. En algunas realizaciones, los complejos de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP se forman inmovilizando en primer lugar los anticuerpos anti-CarP sobre la superficie, y después poniendo en contacto el polipéptido purificado en disolución con los anticuerpos anti-CarP inmovilizados.

En algunas realizaciones, los métodos para detectar anticuerpos anti-CarP incluyen además revestir el polipéptido purificado sobre una superficie o un soporte sólido.

En algunas realizaciones, el sujeto es sospechoso de padecer AR.

En algunas realizaciones, los métodos para detectar anticuerpos anti-CarP incluyen además obtener una muestra del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra es una pluralidad de muestras. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de fluido sinovial u otra muestra de tejido o fluido corporal.

En algunas realizaciones, se obtiene una pluralidad de muestras a lo largo de un periodo de tiempo. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo es más de 12 horas, más de 1 día, más de 2 días, más de 3 días, más de 4 días, más de 5 días, más de 6 días, más de 7 días, más de 10 días, más de 14 días, más de 3 semanas, más de 1 mes, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 4 meses, más de 5 meses, más de 6 meses, más de 9 meses, más de 12 meses, más de 18 meses, más de 24 meses, más de 30 meses, más de 3 años, más de 4 años, o más de 5 años.

En algunas realizaciones, una o más muestras se obtienen antes de que el sujeto reciba un tratamiento de la AR (por ejemplo, un régimen de fármacos para tratar o prevenir la AR). En algunas realizaciones, una o más muestras se obtienen después de que el sujeto reciba un tratamiento de la AR o durante el curso de un periodo de tratamiento de la AR en desarrollo.

En algunas realizaciones, un polipéptido purificado de esta descripción se inmoviliza sobre una superficie. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado se reviste sobre una superficie de una placa de microtitulación (por ejemplo, una placa de 96 pocillos, una placa de 384 pocillos, o una placa de 1536 pocillos), un portaobjetos (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) o una cubeta. En algunas realizaciones, la proteína purificada se reviste sobre la superficie como un polipéptido no plegado. En algunas realizaciones, la proteína purificada se reviste sobre la superficie en su forma nativa. En algunas realizaciones, el revestimiento del polipéptido purificado sobre la superficie incluye la adsorción física del polipéptido a la superficie. En algunas realizaciones, el revestimiento del polipéptido purificado sobre la superficie incluye una unión covalente del polipéptido a la superficie.

- 5 En la presente se proporcionan métodos para diagnosticar la AR en un sujeto sospechoso de padecer AR, que incluyen: a) poner en contacto una muestra procedente del sujeto con un polipéptido purificado que incluye una A1AT carbamílada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP de la muestra y el polipéptido purificado; y b) detectar la presencia o la ausencia de un complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado, en los que la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en la muestra indica que el sujeto padece AR.
- 10 En algunas realizaciones, la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado incluye determinar los niveles de un anticuerpo anti-CarP en la muestra. Los métodos para determinar los niveles de anticuerpo anti-CarP en una muestra (por ejemplo, en mg/ml o nM/ml) pueden determinarse por medio de cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, ELISA).
- 15 En algunas realizaciones, unos niveles mayores de un anticuerpo anti-CarP en la muestra indican un curso más grave del futuro avance de la enfermedad en un paciente con AR que unos niveles menores del anticuerpo anti-CarP. En algunas realizaciones, unos niveles mayores de un anticuerpo anti-CarP en la muestra indican una erosión de las articulaciones más grave que unos niveles menores del anticuerpo anti-CarP.
- 20 La gravedad del avance de la enfermedad, por ejemplo, con respecto a la gravedad de los síntomas clínicos, tales como dolor de articulaciones o erosión de articulaciones, puede ser determinada por los expertos en la técnica, tales como un médico (por ejemplo, un médico de medicina general o un reumatólogo).
- 25 En la presente se proporcionan métodos para determinar la prognosis de la artritis reumatoide (RA) en un sujeto humano, que incluyen a) poner en contacto una muestra procedente del sujeto con un polipéptido purificado que incluye una hA1AT carbamílada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP de la muestra y el polipéptido purificado; y b) detectar la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado, en los que la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en la muestra indica el curso del avance de la AR en el sujeto humano.
- 30 En algunas realizaciones, el sujeto humano es un sujeto asintomático sospechoso de estar en riesgo de desarrollar AR. En algunas realizaciones, la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en la muestra indica que el paciente tiene un riesgo mayor de desarrollar AR que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado.
- 35 En algunas realizaciones, el ser humano es un paciente con AR que presenta un síntoma clínico de la AR. En algunas realizaciones, la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en la muestra predice un curso clínico más grave del avance de la enfermedad de la AR que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado.
- 40 En algunas realizaciones, la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en la muestra incluye determinar los niveles de un anticuerpo anti-CarP en la muestra. En algunas realizaciones, unos niveles mayores del anticuerpo anti-CarP indican un riesgo mayor de que un paciente asintomático desarrolle AR que unos niveles menores del anticuerpo anti-CarP. En algunas realizaciones, unos niveles mayores de un anticuerpo anti-CarP indican un curso más grave del futuro avance de la enfermedad en un paciente con AR que unos niveles menores del anticuerpo anti-CarP. En algunas realizaciones, unos niveles mayores del anticuerpo anti-CarP indican una aparición más rápida de la AR que unos niveles menores del anticuerpo anti-CarP.
- 45 En algunas realizaciones, la presencia de un anticuerpo anti-CarP en una muestra procedente de un sujeto sospechoso de estar en riesgo de desarrollar AR indica que el sujeto es un paciente con artralgia. En algunas realizaciones, la presencia del anticuerpo anti-CarP indica que un paciente con artralgia tiene una probabilidad aproximadamente 10%-20% mayor de desarrollar AR dentro del siguiente 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o 5 años después de detectar la presencia de anticuerpos anti-CarP que un paciente con artralgia que no presenta anticuerpos anti-CarP. En algunas realizaciones, la presencia del anticuerpo anti-CarP indica que el paciente con artralgia tiene una probabilidad  $\geq 50\%$  de desarrollar AR dentro del siguiente 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o 5 años después de detectar la presencia del anticuerpo anti-CarP que un paciente con artralgia que no presenta el anticuerpo anti-CarP.
- 50 En algunas realizaciones, el sujeto humano es un paciente con artralgia. En algunas realizaciones, la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en el paciente con artralgia indica un riesgo mayor en aproximadamente 10-20% de que el paciente con artralgia desarrolle AR dentro de cinco años desde la determinación de la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado.
- 55 En algunas realizaciones, los métodos de esta descripción incluyen además detectar la presencia o la ausencia de un anticuerpo ACPA en la muestra procedente del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra es negativa para anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPA).
- En algunas realizaciones, la presencia de anticuerpos anti-CarP en ausencia de anticuerpos ACPA predice un curso

clínico más grave del avance de la enfermedad (por ejemplo, asociado con unos daños más graves en las articulaciones o unos daños radiológicos más graves) que la ausencia de anticuerpos anti-CarP y anticuerpos ACPA. Los ensayos para detectar y cuantificar anticuerpos ACPA son conocidos en la técnica (por ejemplo, ACPA-ELISA).

5 En algunas realizaciones, la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado incluye establecer un nivel del anticuerpo anti-CarP en la muestra. Los niveles de anticuerpos anti-CarP pueden expresarse, por ejemplo, como concentraciones de anticuerpos anti-CarP en la muestra (por ejemplo, en [mg/ml] o [nM]).

10 En algunas realizaciones, la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido incluye comparar el nivel del anticuerpo anti-CarP en una muestra procedente de un sujeto con un nivel control del anticuerpo anti-CarP en una muestra procedente de un individuo control sano, en la que si el nivel del anticuerpo anti-CarP en la muestra procedente del sujeto es mayor que el nivel control, esto indica que el sujeto padece artritis reumatoide (AR).

15 En algunas realizaciones, la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido incluye comparar el nivel del anticuerpo anti-CarP en una muestra procedente de un sujeto con un nivel control del anticuerpo anti-CarP en una muestra procedente de un individuo control sano, en la que si el nivel del anticuerpo anti-CarP en la muestra procedente del sujeto es mayor que el nivel control, esto indica que el sujeto está en riesgo de desarrollar AR en el futuro.

20 En algunas realizaciones, la detección de un nivel mayor de anticuerpo anti-CarP (por ejemplo, con relación al promedio o la mediana del nivel de anticuerpo anti-CarP observado en una población de sujetos sanos) indica que el sujeto está en riesgo de desarrollar síntomas clínicos de la AR (por ejemplo, dolor de articulaciones, inflamación sistémica de articulaciones sinoviales) dentro de menos de 3 meses, menos de 6 meses, menos de 9 meses, menos de 12 meses, menos de 18 meses, menos de 2 años, menos de 3 años, menos de 4 años, menos de 5 años, menos de 6 años, menos de 7 años, menos de 8 años, menos de 9 años, menos de 10 años, menos de 12 años, menos de 14 años, o menos de 16 años desde la determinación del mayor nivel de anticuerpo anti-CarP.

25 En algunas realizaciones, la detección de un nivel mayor de anticuerpo anti-CarP indica que el sujeto tiene una probabilidad mayor que 5%, mayor que 10%, mayor que 15%, mayor que 20%, mayor que 25%, mayor que 30%, mayor que 35%, mayor que 40%, mayor que 45%, mayor que 50%, mayor que 60%, mayor que 70%, o mayor que 80%, o mayor que 90% de desarrollar síntomas clínicos de AR dentro de 5 años después de la determinación del nivel mayor del anticuerpo anti-CarP que un grupo control de sujetos que no presentan niveles mayores de anticuerpo anti-CarP. En algunas realizaciones, la detección de un nivel mayor de anticuerpo anti-CarP indica que el sujeto tiene una probabilidad mayor de más de 2 veces, más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 6 veces, más de 7 veces, más de 8 veces, más de 9 veces, o más de 10 veces de desarrollar síntomas clínicos de la AR dentro de 5 años después de la determinación del nivel mayor del anticuerpo anti-CarP que un grupo control de sujetos que no presentan el nivel mayor de anticuerpo anti-CarP.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP en los individuos control está ausente. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP se considera ausente en una muestra si no puede detectarse un nivel de anticuerpo anti-CarP por encima del ruido del respectivo ensayo usado para determinar el nivel de anticuerpo anti-CarP. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP se considera presente en una muestra si puede detectarse el nivel del anticuerpo anti-CarP por encima del ruido del respectivo ensayo usado para determinar el nivel de anticuerpo anti-CarP. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP se considera presente en una muestra de ensayo si la señal de la muestra de ensayo en el ensayo de detección del anticuerpo anti-CarP es al menos dos desviaciones estándar (2xSTD) mayor que el ruido de fondo (por ejemplo, el promedio o la mediana de la señal para muestras de control negativo). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CarP se considera presente en la muestra si el nivel de anticuerpo anti-CarP excede a un nivel umbral predeterminado. El nivel umbral de anti-CarP puede ser determinado por los expertos en la técnica, por ejemplo, un médico clínico, basándose en una diversidad de factores, tales como los objetivos específicos de un ensayo clínico o la importancia médica (por ejemplo, de diagnóstico o de pronóstico) de un nivel concreto de anticuerpo anti-CarP o los resultados de otro ensayo de diagnóstico para la AR que no implica la detección del nivel de anticuerpo anti-CarP.

50 En la presente se proporcionan métodos para determinar o controlar la eficacia de un tratamiento de la AR en un paciente con AR, que incluyen: a) poner en contacto dos o más muestras obtenidas del paciente en un primer momento y en un posterior momento a lo largo del curso del tratamiento de la AR con un polipéptido purificado que incluye una A1AT carbamilada *in vitro* (por ejemplo, hA1AT o bA1AT), o uno de sus fragmentos, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP de las dos o más muestras y el polipéptido purificado; b) determinar el nivel del anticuerpo anti-CarP para cada una de dichas dos o más muestras; y c) comparar el nivel del anticuerpo anti-CarP entre dichas dos o más muestras, en los que un nivel disminuido del anticuerpo anti-CarP en una o más muestras obtenidas en un momento posterior con relación al nivel de anticuerpo anti-CarP obtenido en el primer momento indica que el tratamiento de la AR es eficaz, y un nivel estable o aumentado del anticuerpo anti-CarP indica que el tratamiento de la AR no es eficaz.

En algunas realizaciones, una o más muestras se obtienen al principio del curso del tratamiento de la AR, y una o

más muestras se obtienen en momentos posteriores a lo largo del curso del tratamiento de la AR.

En algunas realizaciones, los momentos posteriores son 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 25 o más, o 30 o más momentos.

5 En algunas realizaciones, los tratamientos de la AR incluyen tratamientos con fármacos. En algunas realizaciones, los tratamientos con fármacos incluyen un tratamiento con prednisona, meloxicamo, celebrex, mobic, naproxeno, remicada IV, plaquenil, metotrexato, diclofenaco, metilprednisolona, enbrel, indometacina, ibuprofeno, cenalog, etodolaco, nabumetona, humira, aleva, minociclina, orenca, rituxano u otros fármacos para la AR aprobados por FDA o EMA, incluyendo los fármacos experimentales para la AR en desarrollo clínico. En algunas realizaciones, los tratamientos de la AR incluyen tratamientos con una combinación de dos o más fármacos para la AR.

10 En algunas realizaciones, los métodos incluyen además ajustar el tratamiento de la AR si se determina que el tratamiento no es eficaz. El ajuste del tratamiento de la AR puede incluir, por ejemplo, ajustar la dosis de un tratamiento con fármacos, aumentar la frecuencia de un tratamiento con fármacos, tratar con un fármaco diferente o una combinación de fármacos diferente, y terminar el tratamiento de la AR.

15 En algunas realizaciones, los métodos incluyen además repetir el tratamiento de la AR si se determina que el tratamiento es eficaz.

20 En algunas realizaciones, los métodos de esta descripción incluyen además administrar un tratamiento de la AR a un paciente con AR o a un sujeto en riesgo de desarrollar AR. El tratamiento de la AR puede administrarse una o más veces (por ejemplo, 1 o más veces, 2 o más veces, 3 o más veces, 4 o más veces, 5 o más veces, 6 o más veces, 7 o más veces, 8 o más veces, 9 o más veces, 10 o más veces, 15 o más veces, 20 o más veces, 25 o más veces, 50 o más veces, 100 o más veces, 150 o más veces, 200 o más veces, 300 o más veces, 400 o más veces, o 500 o más veces). En algunas realizaciones, el tratamiento de la AR se administra a lo largo de un periodo de tiempo (por ejemplo, 1 día o más, 1 semana o más, 2 semanas o más, 1 mes o más, 2 meses o más, 3 meses o más, 6 meses o más, 9 meses o más, 12 meses o más, 18 meses o más, 2 años o más, o 3 años o más). En algunas realizaciones, el tratamiento de la AR se administra una vez diaria, dos veces diarias o tres veces diarias.

25 En algunas realizaciones, el tratamiento de la AR se administra una vez semanal, una vez cada dos semanas o una vez mensual.

30 En la presente se describen métodos para seleccionar un sujeto para un tratamiento de la AR, que incluyen: a) detectar la presencia o la ausencia de un anticuerpo anti-CarP en una muestra procedente del sujeto según un método de esta descripción; b) opcionalmente detectar la presencia o la ausencia de uno o más biomarcadores de la AR adicionales en la muestra; y c) seleccionar el sujeto para el tratamiento de la AR basándose en la presencia o la ausencia del anticuerpo anti-CarP y, opcionalmente, basándose en la presencia o la ausencia de dichos uno o más biomarcadores de la AR adicionales.

35 Los biomarcadores de la AR adicionales pueden incluir cualquier biomarcador de la AR conocido en la técnica. En algunos casos, los biomarcadores de la AR adicionales incluyen autoantígenos específicos de la AR. En algunos casos, los biomarcadores de la AR adicionales incluyen ACPA, Ra33 (hnRNP A2), fibrinógeno, fibronectina, alfa-enolasa, colágeno de tipo II, proteína de unión a inmunoglobulina ("immunoglobulin binding protein", BiP), anexina, péptido citrulinado vírico ("viral citrullinated peptide", VCP) derivado de la proteína codificada por el virus de Epstein Barr (EBNA-2), y anticuerpos dirigidos a la peptidil arginina desiminasa de tipo 4 (PAD4) y a B-RAF. Los métodos para detectar la presencia o la ausencia de biomarcadores de la AR adicionales son conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISA, análisis de la transferencia Western y similares).

40

La relación de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en la presente incluye las definiciones de esa variable como cualquier elemento individual o combinación (o subcombinación) de elementos listados. La relación de una realización en la presente incluye esa realización como cualquier realización individual o en combinación con cualquier otra realización, o sus porciones.

45 Se proporcionan los siguientes ejemplos como ilustración, no como limitación.

Ejemplo de referencia I: Identificación de Car-AIAT bovina como un importante antígeno de Car-FCS reconocido por anticuerpos anti-CarP de pacientes con artritis reumatoide

50 Este ejemplo ilustra la identificación de la  $\alpha(1)$ -antitripsina bovina (Car-AIAT o Ca-A1AT) como diana inmunológica en el suero de ternero fetal carbamilado (Car-FCS o Ca-FCS) de anticuerpos antiproteína carbamilada (anti-CarP) que se encuentran en el suero de pacientes con artritis reumatoide (AR) humanos.

55 El Car-FCS se produce haciendo reaccionar FCS con cianato de potasio. Brevemente, se preparó una disolución 2 M de cianato de potasio (KOCN, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; n.º de catálogo 215074-500G) en PBS. La disolución de KOCN 2 M después se mezcló con FCS (Bodenco, Alkmaar, Países Bajos) en una proporción 1:1 en volumen/volumen. La disolución mixta de FCS-KOCN se incubó durante la noche a 37 °C para producir Car-FCS. Después del periodo de incubación, la disolución de Car-FCS se dializó contra PBS (2 l) durante 48 hr, durante las cuales el PBS se refrescó 5 veces.

Después Car-FCS se sometió a un fraccionamiento con HPLC en una columna de intercambio iónico. Se analizó el contenido en proteínas de las fracciones de la HPLC en geles de SDS-PAGE, y se ensayó la inmunoreactividad de las fracciones de HPLC de Car-FCS mediante ELISA. Véanse, por ejemplo, las figuras 2 y 3A.

5 Los ELISA se realizaron como sigue. Brevemente, se revistieron FCS no modificado y Car-FCS durante la noche sobre placas NUNC MAXISORP® (Thermo Scientific, Waltham, MA). Después del lavado y del bloqueo, los pocillos se incubaron con muestras de suero obtenidas de pacientes humanos con AR y voluntarios sanos. Se detectó la IgG humana unida usando anticuerpos anti-IgG humana de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca), seguidos de anticuerpos anti-IgG de conejo de cabra marcados con HPR (Dako, Glostrup, Dinamarca). Después de otras etapas de lavado, se midió la actividad de la enzima HPR usando un sustrato de ABTS (Pierce, Rockford, IL). Se eligió el valor de corte para una respuesta positiva como el promedio más dos veces la desviación estándar ("standard deviation", SD) de la reactividad anti-CarP específica de controles sanos.

15 El Car-FCS se fraccionó mediante una HPLC de intercambio iónico usando una columna MonoQ. Las fracciones de la HPLC se analizaron mediante SDS-PAGE (al 4-12%) para su contenido global en proteínas, y mediante ELISA para su contenido en proteínas carbamiladas. Las figuras 2A y B muestran ejemplos de resultados de un ensayo de fraccionamiento de Car-FCS y los posteriores análisis con SDS-PAGE y ELISA de las fracciones. La gráfica representa las señales de ELISA frente a los números de las fracciones de HPLC y superpone el cromatograma de HPLC. Las fracciones de la HPLC se sondaron para proteínas carbamiladas usando dos muestras de suero de control negativo procedentes de voluntarios sanos (Neg PMDx 1193 y PMDx1196) y cuatro muestras de suero procedentes de pacientes con AR, incluyendo dos muestras de suero que contienen anticuerpos anti-CarP y no anticuerpos antiproteína citrulinada (CarP<sup>+</sup>/ACPA<sup>-</sup>; BVx0038, BVx0077) y dos muestras de suero que contienen anticuerpos ACPA y no anticuerpos anti-CarP (CarP<sup>-</sup>/ACPA<sup>+</sup>; BVx0032, BVx0008).

25 En general, se observaron unas intensas señales de ELISA con los sueros que contenían anticuerpos anti-CarP (BVx0038, BVx0077), pero con los sueros ACPA<sup>+</sup> que carecen de anticuerpos anti-CarP. Los sueros que carecen de anticuerpos anti-CarP muestran unas señales de ELISA cercanas al fondo en todas las fracciones de la HPLC. Estos resultados demuestran la selectividad de los ACPA por proteínas citrulinadas frente a proteínas carbamiladas. A la inversa, estos resultados demuestran la interacción específica de ciertas proteínas de FCS carbamiladas con un subconjunto de autoanticuerpos procedentes de pacientes con AR que reconocen proteínas carbamiladas y no proteínas citrulinadas.

30 Un análisis de SDS-PAGE de Car-FCS fraccionado revela dos bandas de proteínas relativamente débiles en las fracciones 1G4 y 1G6 (banda 3 y 4) y unas bandas de proteínas más intensas en las fracciones posteriores. Sin embargo, se descubrió que las señales de ELISA eran mucho más intensas en las fracciones de HPLC n.<sup>os</sup> 1G4 y 1G6 que en las fracciones posteriores, en especial con el suero BVx0038 (CarP<sup>+</sup>/ACPA<sup>-</sup>). Las bandas de proteínas se sometieron a una digestión quimotriptica y a una espectrometría de masas (MS). Véanse las figuras 3A-C. Un análisis de MS identificó la banda 3 como la  $\alpha(1)$ -antitripsina bovina (A1AT). Véanse las figuras 3B y 3C.

35 En resumen, este ejemplo demuestra que la A1AT bovina carbamilada es un importante proteína carbamilada en FCS carbamilado que es reconocida por anticuerpos anti-CarP procedentes de pacientes humanos con AR.

Ejemplo II: La reactividad de los anticuerpos anti-CarP contra Car-AIAT humana se correlaciona con su reactividad contra Car-FCS

40 Este ejemplo demuestra que la reactividad de anticuerpos anti-CarP procedentes de pacientes humanos con AR contra A1AT humana carbamilada *in vitro* (Car-hA1AT) se correlaciona con la reactividad de los anticuerpos contra Car-FCS. Estos resultados sugieren que puede usarse Car-hA1AT en lugar de Car-FCS en el desarrollo de ensayos para la detección de anticuerpos anti-CarP en el suero de pacientes humanos con AR y para la evaluación de diagnóstico y de pronóstico de la enfermedad y del avance de la enfermedad de un paciente con AR.

45 La A1AT humana carbamilada *in vitro* (Car-hA1AT) se produce haciendo reaccionar hA1AT purificada (Lee Biosolutions, St. Louis, MO; n.<sup>o</sup> de catálogo 106-11) con cianato de potasio. Brevemente, se preparó una disolución 2 M de cianato de potasio (KOCN, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO; n.<sup>o</sup> de catálogo 215074-500G) en PBS. La hA1AT purificada se diluyó hasta 2 mg/ml en PBS. La disolución de KOCN 2 M después se mezcló con la hA1AT en una proporción 1:1 en volumen/volumen para producir una disolución con 1 M de KOCN y 1 mg/ml de hA1AT. Se retuvo una parte alícuota de la hA1AT no modificada como proteína de referencia. La disolución mixta de hA1AT-KOCN se incubó durante la noche a 37 °C para producir Car-hA1AT. Después del periodo de incubación, la disolución de Car-hA1AT se dializó contra PBS (2 l) durante 48 hr, durante las cuales el PBS se refrescó 5 veces.

55 Se realizó un ensayo basado en ELISA, fundamentalmente como se describe en el ejemplo 1, para comparar la reactividad de los anticuerpos anti-CarP humanos contra Car-FCS y Car-hA1AT. Se ensayaron muestras de suero de aproximadamente 30 pacientes con AR que contenían una gama de cantidades de anticuerpo anti-CarP. Los resultados de este análisis de ELISA comparativo se ilustran en las figuras 4 y 5. La figura 4 demuestra que los anticuerpos anti-CarP procedentes de pacientes con AR forman complejos con Car-AIAT de una manera dependiente de la carbamilación (tercera y cuarta columna). La figura 4 demuestra además que el reconocimiento por parte del anticuerpo anti-CarP de la Car-AIAT tiene la misma especificidad o una especificidad mayor (con

relación a A1AT, véanse la tercera y la cuarta columna) que el reconocimiento por parte del anticuerpo anti-CarP de Car-FCS (con relación a FCS, véanse la primera y la segunda columna). La figura 5 demuestra que la reactividad de los anticuerpos anti-CarP contra Car-A1AT se correlaciona con su reactividad contra Car-FCS.

5 Se realizó un análisis de característica operativa del receptor (ROC) para comparar la actuación de un ensayo ELISA basado en suero de ternero fetal carbamilado *in vitro* (Ca-FCS) y un ensayo ELISA basado en A1AT humana carbamilada *in vitro* (Ca-A1AT) con respecto a la discriminación de pacientes con AR y controles sanos. Véase la figura 6. Se descubrió que las curvas ROC obtenidas y el área bajo la curva ("area under the curve", AUC) eran similares en los ensayos basados en Ca-FCS y Ca-A1AT. Sin embargo, en el área de alta especificidad clínicamente pertinente, se descubrió que la curva ROC del ensayo basado en Ca-A1AT era superior a la curva del ensayo basado en Ca-FCS. Véase la figura 6A. A una especificidad fijada del 98,8%, se descubrió que la sensibilidad del ensayo basado en Ca-A1AT era mayor que la sensibilidad del área del ensayo basado en Ca-FCS. Véase la figura 6B. Se descubrió que la probabilidad y la oportunidad relativa eran mayores en el ensayo basado en Ca-A1AT que en el ensayo basado en Ca-FCS. Véase la figura 6C.

15 En resumen, estos resultados indican que A1AT es un antígeno de proteína carbamilada dominante presente en el FCS. Además, se demostró que la hA1AT carbamilada *in vitro* (Car-hA1AT) actúa como un antígeno de proteína purificada eficaz para el desarrollo de ensayos para la detección de anticuerpos anti-CarP y la evaluación del diagnóstico y del pronóstico de la enfermedad en pacientes con AR.

20 Aunque la descripción se ha descrito remitiéndose a las realizaciones descritas, los expertos en la técnica apreciarán con facilidad que los ejemplos y estudios específicos detallados anteriormente solo son ilustrativos de la descripción. Por consiguiente, la descripción solo se ve limitada por las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un complejo que comprende un polipéptido purificado que comprende una alfa-1-antitripsina humana (hA1AT) carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, y uno o más anticuerpos anti-CarP humanos, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT, y en el que el anticuerpo anti-CarP reconoce específicamente a hA1AT, o a uno de sus fragmentos, en su forma carbamylada, pero no en su forma no carbamylada.
- 2.- El complejo de la reivindicación 1, en el que el complejo está en disolución; o en el que el complejo está inmovilizado sobre una superficie.
- 10 3.- Un método para detectar un anticuerpo anti-CarP en un sujeto que padece artritis reumatoide (AR), en un sujeto sospechoso de padecer AR, o en un sujeto sospechoso de estar en riesgo de desarrollar AR, que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de fluido biológico procedente del sujeto con un polipéptido purificado que comprende una hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP de la muestra y el polipéptido purificado; y
- 15 (b) detectar la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado.
- 4.- El método de la reivindicación 3, en el que la hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende uno o más sitios de unión al anticuerpo anti-CarP, cada uno de los cuales puede estar independientemente en un estado carbamylado o en un estado no carbamylado, y en el que el anticuerpo anti-CarP procedente de pacientes con artritis reumatoide humanos se une a los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en sus estados carbamylados, pero
- 20 no en su estado no carbamylado, para formar complejos de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP.
- 5.- El método de la reivindicación 3, en el que:
- (a) la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado se detecta mediante un ensayo seleccionado del grupo que consiste en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo inmunoabsorbente fluorescente (FIA), un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CIA), un radioinmunoensayo (RIA),
- 25 un inmunoensayo multiplicado por enzimas, un radioinmunoensayo en fase sólida (SPROA), un ensayo de polarización de fluorescencia (FP), un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia de resolución en el tiempo (TR-FRET), un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (SPR), y un ensayo de transferencia por puntos "Dot-Blot"; o
- (b) la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado comprende
- 30 establecer un nivel del anticuerpo anti-CarP en la muestra; o
- (c) la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido comprende comparar el nivel del anticuerpo anti-CarP en la muestra procedente del sujeto con un nivel control del anticuerpo anti-CarP en una muestra procedente de un individuo control sano, en el que un aumento en el nivel de anticuerpo anti-CarP en la muestra, comparado con el nivel control, indica que el sujeto padece AR.
- 35 6.- El método de la reivindicación 3, en el que:
- (a) el método comprende además la etapa inicial de preparar el polipéptido purificado; o
- (b) el método comprende además inmovilizar el polipéptido purificado sobre una superficie; o
- (c) la muestra de fluido biológico es una muestra de sangre, suero, plasma, orina o leche.
- 7.- El método de la reivindicación 3, en el que:
- 40 (a) se sospecha que el sujeto padece artritis reumatoide (AR); o
- (b) el sujeto es negativo a anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPA).
- 8.- El método de la reivindicación 3 para diagnosticar la artritis reumatoide (AR) en un sujeto sospechoso de padecer AR, en el que la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado indica que el sujeto padece AR.
- 45 9.- El método de la reivindicación 8, en el que:
- (a) el polipéptido purificado es un polipéptido recombinante purificado codificado por ADNc; o
- (b) el polipéptido purificado comprende hA1AT, o uno de sus fragmentos, purificada a partir de sangre, suero, plasma, orina o fluido sinovial; o

(c) más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los restos lisina en la hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, está carbamylado.

10.- El método de la reivindicación 8, en el que:

- 5 (a) la hA1AT carbamylada *in vitro* comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; o
- (b) la hA1AT carbamylada *in vitro* tiene más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1; o
- (c) la hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende un fragmento de 8 o más aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1; o
- 10 (d) la hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende un fragmento de 8 o más aminoácidos contiguos con más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1; o
- (e) la hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3-32; o
- 15 (f) la hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:33-203.

11.- El método de la reivindicación 3 para determinar la prognosis de la artritis reumatoide (AR) en un sujeto humano, en el que la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado predice el curso del avance de la AR en el sujeto humano.

20 12.- El método de la reivindicación 11, en el que:

- (a) el sujeto humano es un sujeto asintomático sospechoso de estar en riesgo de desarrollar AR; o
- (b) el sujeto es un paciente con artralgia.

13.- El método de la reivindicación 11, en el que:

- 25 (a) la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado indica que el paciente tiene un riesgo mayor de desarrollar AR que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado, y opcionalmente el sujeto humano es un paciente con AR que presenta un síntoma clínico de AR; o
- (b) la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado predice un curso clínico más grave del avance de la enfermedad de la AR que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado; o
- 30 (c) la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado en un paciente indica un riesgo mayor en aproximadamente 10-20% de que el paciente con artralgia desarrolle AR dentro de cinco años desde la determinación de la presencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado que la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado.

14.- El método de la reivindicación 11, en el que:

- (a) la muestra es negativa para anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPA); o
- 35 (b) la detección de la presencia o la ausencia del complejo de anticuerpo anti-CarP-polipéptido purificado comprende determinar un nivel del anticuerpo anti-CarP en la muestra; o
- (c) un nivel mayor del anticuerpo anti-CarP en la muestra indica un riesgo mayor de que un paciente asintomático desarrolle AR que un nivel menor del anticuerpo anti-CarP; o
- 40 (d) un nivel mayor del anticuerpo anti-CarP en la muestra predice un curso más grave del futuro avance de la enfermedad en un paciente con AR que un nivel menor del anticuerpo anti-CarP.

15.- Un método para controlar la eficacia de un tratamiento de la artritis reumatoide (AR) en un paciente con AR, que comprende:

- (a) poner en contacto dos o más muestras obtenidas del paciente en un primer momento y en un posterior momento a lo largo del curso del tratamiento de la AR con un polipéptido purificado que comprende una hA1AT carbamylada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT, para formar un complejo entre un anticuerpo anti-CarP de las dos o más muestras y el polipéptido purificado;
- 45

(b) determinar un nivel del anticuerpo anti-CarP para cada una de dichas dos o más muestras; y

(c) comparar el nivel del anticuerpo anti-CarP entre dichas dos o más muestras, en el que un nivel disminuido del anticuerpo anti-CarP en una o más muestras obtenidas en un momento posterior con relación al nivel del anticuerpo anti-CarP obtenido en el primer momento indica que el tratamiento de la AR es eficaz, y un nivel estable o aumentado del anticuerpo anti-CarP indica que el tratamiento de la AR no es eficaz.

5 16.- El método de la reivindicación 15, en el que el nivel del anticuerpo anti-CarP en las muestras obtenidas en un momento posterior disminuye en más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99%.

10 17.- Un kit para detectar un anticuerpo anti-CarP, para diagnosticar, controlar o pronosticar la artritis reumatoide (AR), o para determinar la eficacia de un tratamiento de la AR en un sujeto, que comprende un fragmento de hA1AT carbamilada *in vitro* purificado, y un agente auxiliar, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT.

18.- El kit según la reivindicación 17, en el que el polipéptido purificado está inmovilizado sobre un soporte sólido.

15 19.- El kit de la reivindicación 17 o 18, en el que el reactivo auxiliar se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo secundario, un reactivo de detección, un tampón de inmovilización, un tampón de bloqueo, un tampón de lavado y un tampón de detección; opcionalmente en el que:

(a) el anticuerpo secundario se selecciona de un anticuerpo anti-IgA humana, un anticuerpo anti-IgD humana, un anticuerpo anti-IgE humana, un anticuerpo anti-IgG humana, y un anticuerpo anti-IgM humana; o

20 (b) el reactivo de detección comprende un reactivo de detección fluorescente o un reactivo de detección luminiscente, opcionalmente en el que el reactivo de detección luminiscente comprende luminol o luciferina.

20.- El método de la reivindicación 3, 8, 11 o 15 o el kit de la reivindicación 17 o 18, en el que el anticuerpo anti-CarP es una pluralidad de anticuerpos anti-CarP.

25 21.- El método o el kit de la reivindicación 20, en el que más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los restos lisina están carbamilados en la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, de más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los polipéptidos purificados en la pluralidad de polipéptidos purificados.

30 22.- El método de la reivindicación 3, 8, 11 o 15 o el kit de la reivindicación 17 o 18, en el que la hA1AT carbamilada *in vitro*, o uno de sus fragmentos, comprende uno o más sitios de unión al anticuerpo antiproteína carbamilada (anti-CarP), y cada uno de ellos puede estar independientemente en un estado carbamilado o en un estado no carbamilado, y en el que un anticuerpo anti-CarP procedente de pacientes humanos con AR se une a los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP en su estado carbamilado, pero no en su estado no carbamilado, para formar un complejo de polipéptido purificado-anticuerpo anti-CarP; y opcionalmente, más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, o más del 90% de los sitios de unión del anticuerpo anti-CarP están en sus estados carbamilados.

35 23.- El método o el kit de la reivindicación 22, en el que el polipéptido purificado es una pluralidad de polipéptidos purificados; y opcionalmente, en el que más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, o más del 90% de los sitios de unión al anticuerpo anti-CarP están en su estado carbamilado en más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, o más del 99% de los polipéptidos purificados en la pluralidad de polipéptidos purificados.

40 24.- Un fragmento de hA1AT carbamilada *in vitro*, en el que el fragmento comprende una secuencia parcial que contiene lisina de 5 o más aminoácidos contiguos de la hA1AT.



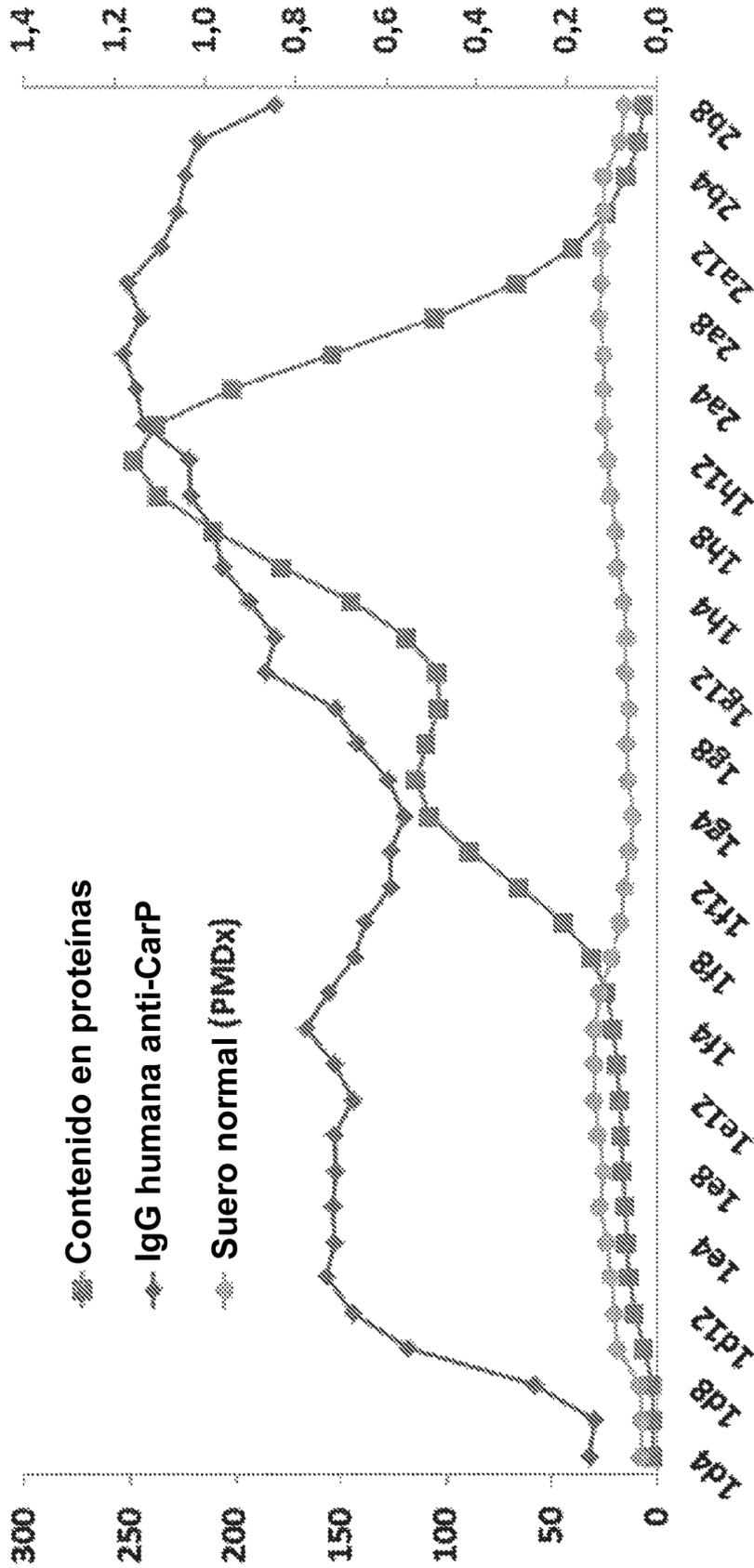


FIG. 2A

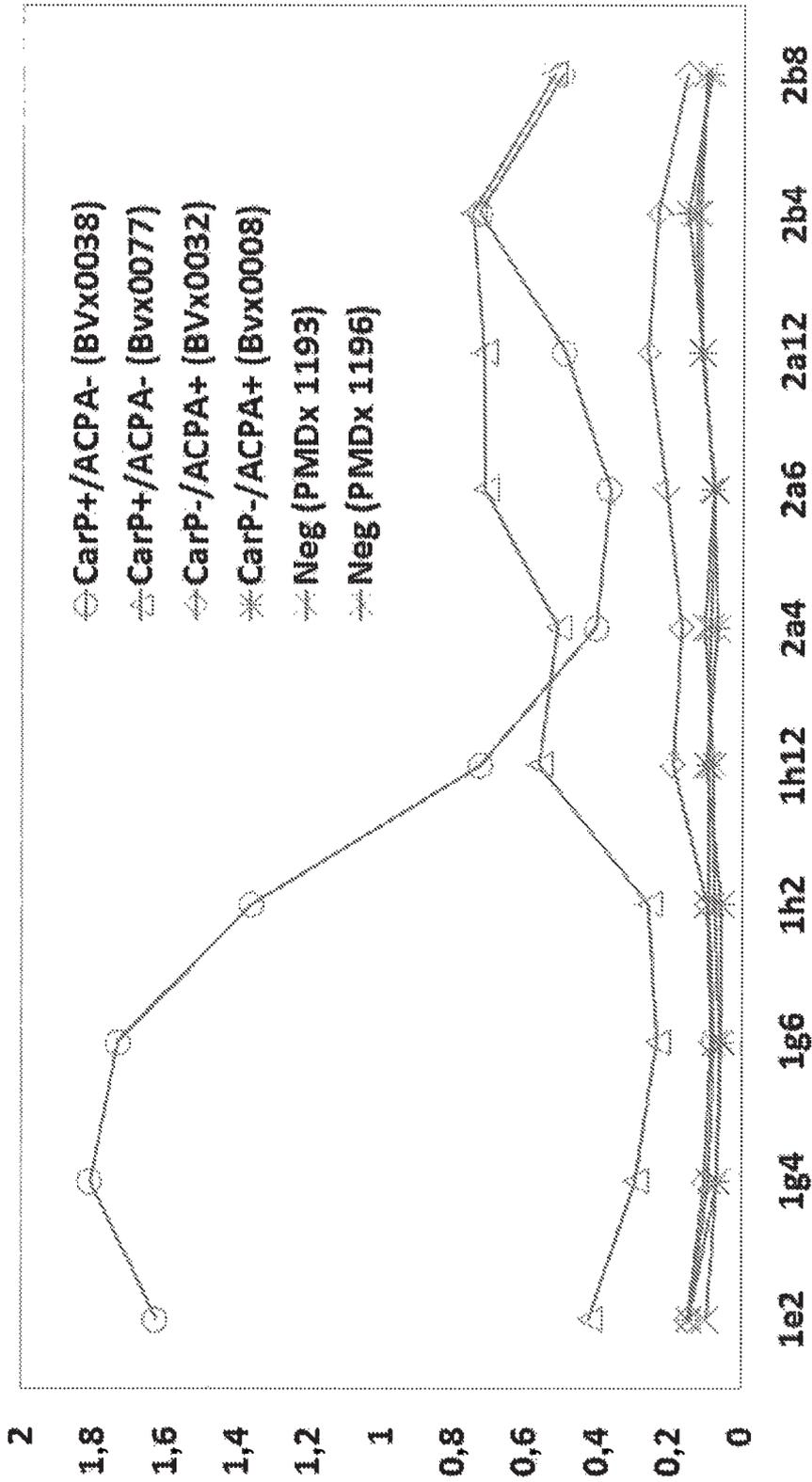


FIG. 2B

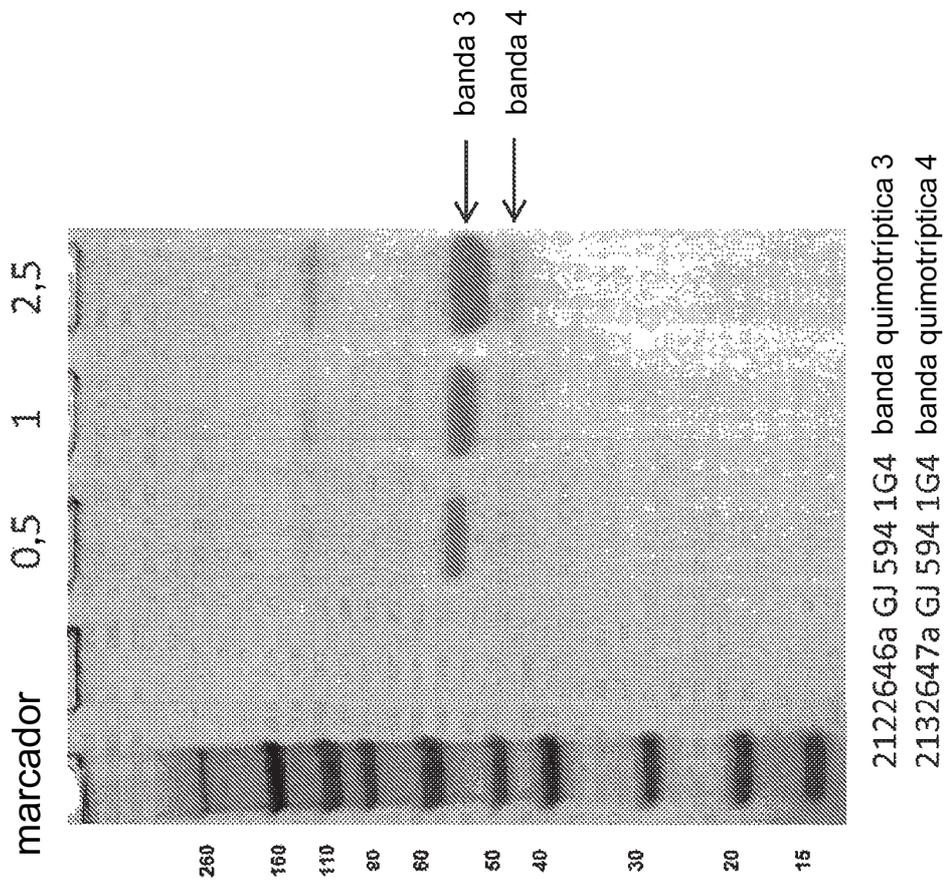


FIG. 3A

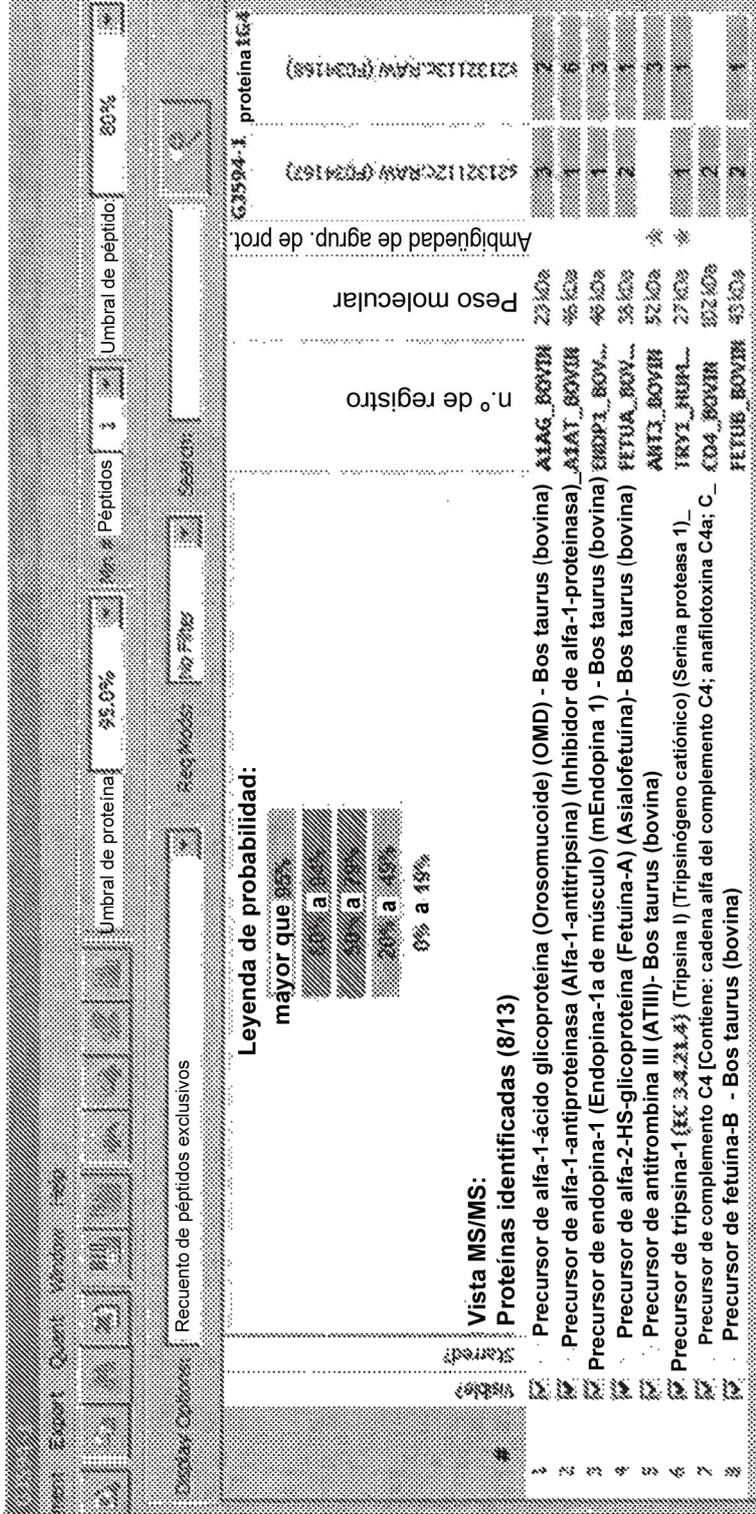


FIG. 3B

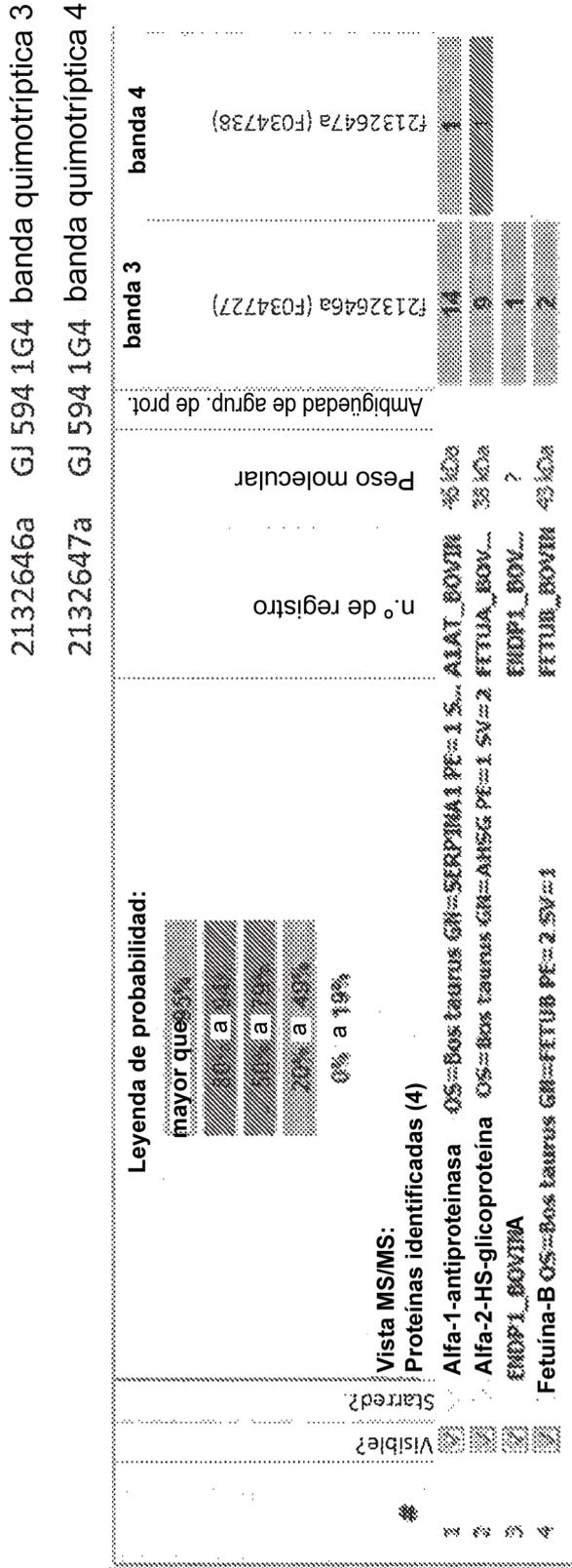


FIG. 3C

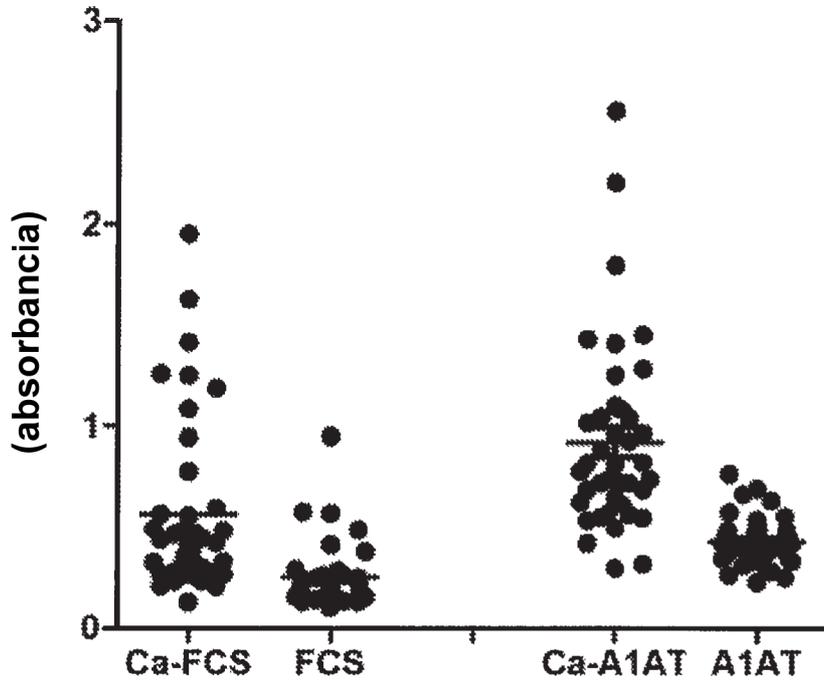


FIG. 4

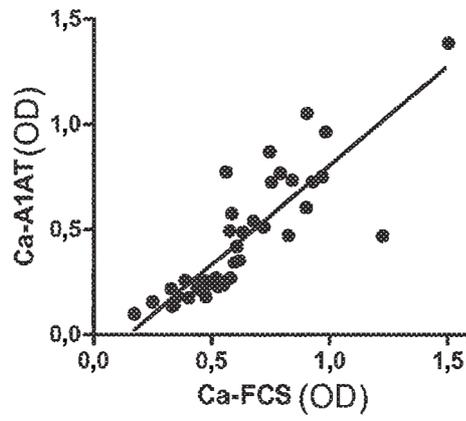


FIG. 5

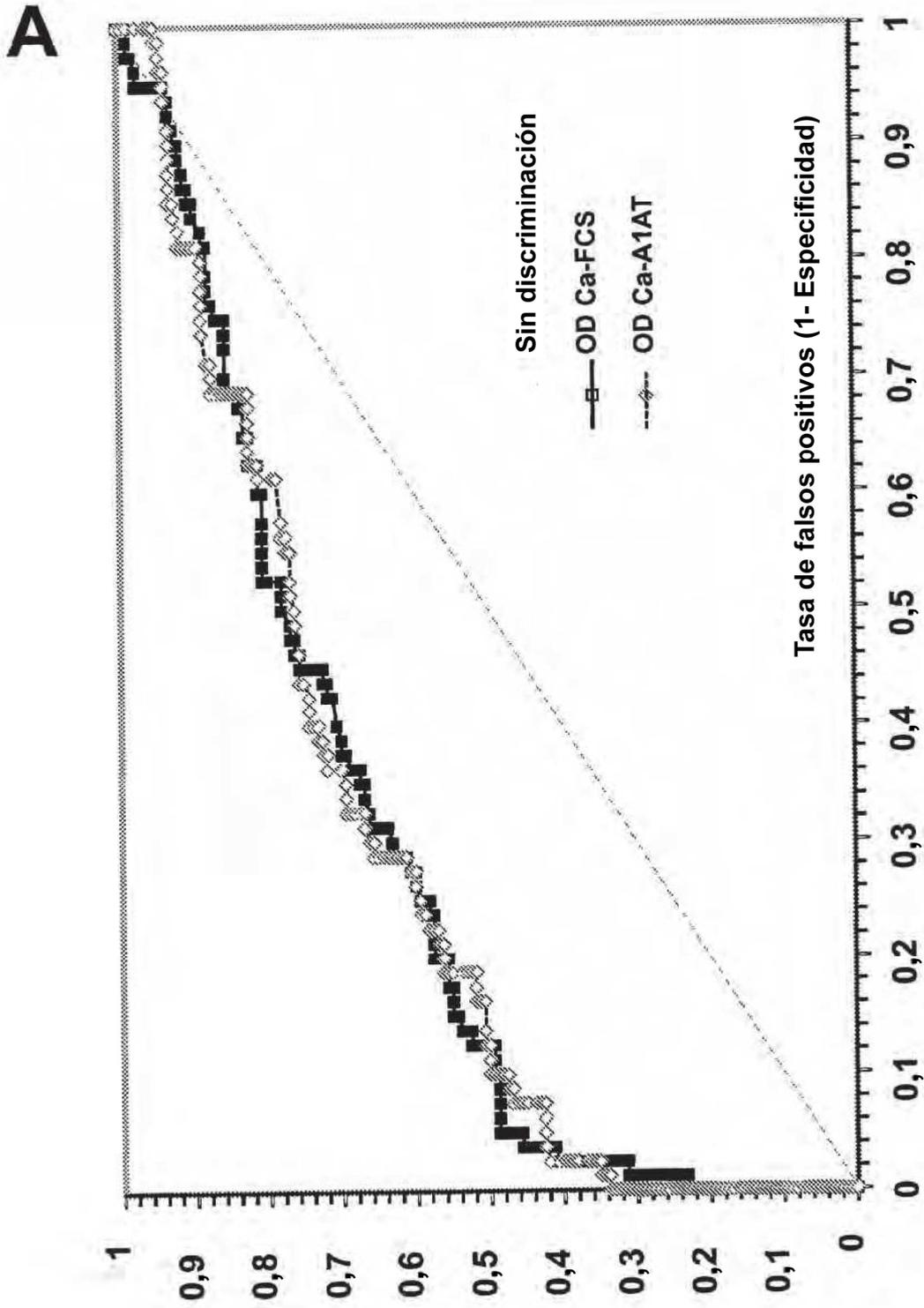


FIG. 6

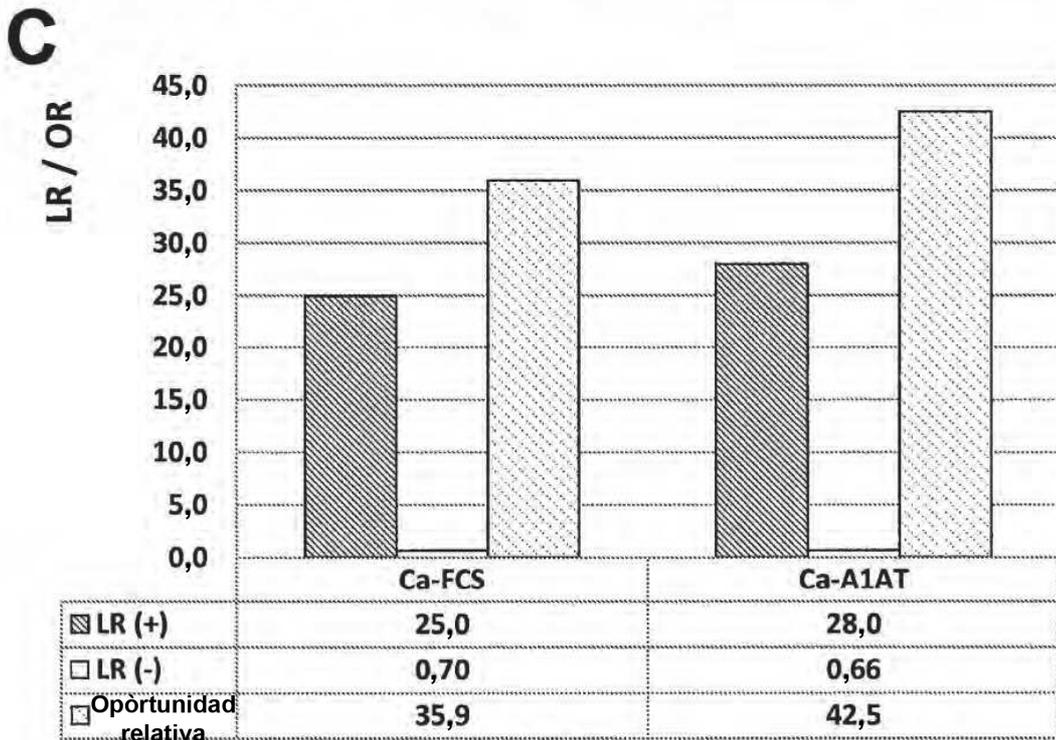
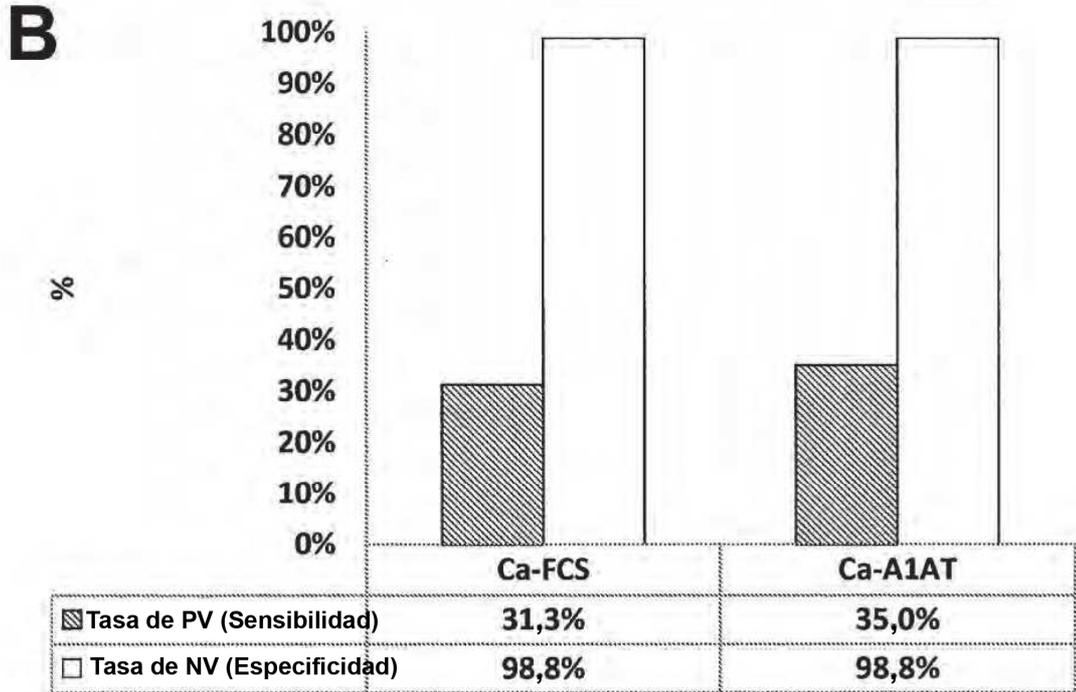


FIG. 6