



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 606**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06077208 .4**  
96 Fecha de presentación : **15.04.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1797893**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Anticuerpos contra conjugados de fosforilcolina.**

30 Prioridad: **15.04.2004 US 521384 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.04.2011**

73 Titular/es: **ATHERA BIOTECHNOLOGIES AB.**  
**Fogdevreten 2B**  
**17177 Stockholm, SE**

72 Inventor/es: **De Faire, Ulf y**  
**Frostegard, Johan**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

**ES 2 357 606 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

## CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere al campo de tratamiento de aterosclerosis y de enfermedades cardiovasculares isquémicas.

## 5 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

10 La aterosclerosis es una enfermedad crónica que causa un engrosamiento de la capa más interna (la íntima) de las arterias de tamaño medio y grande. Ello hace que el flujo de sangre disminuya y pueda causar isquemia y la destrucción de tejido en órganos irrigados por los vasos afectados. La aterosclerosis es la mayor causa de enfermedad cardiovascular incluyendo infarto de miocardio, ataque de apoplejía y enfermedad arterial periférica. Es la mayor causa de mortandad en el mundo occidental y se predice que puede llegar a liderar la causa de muerte en el mundo entero dentro de dos décadas.

15 La enfermedad se inicializa por acumulación de lipoproteínas; primariamente lipoproteína de baja densidad (LDL), en la matriz extracelular del vaso. Estas partículas LDL se agregan y se someten a una modificación oxidativa. LDL oxidada es proinflamatoria, tóxica y causa daño vascular. Aterosclerosis representa en muchos aspectos, una respuesta a este daño incluyendo inflamación y fibrosis.

20 En 1989 Palinski y colegas identificaron anticuerpos circulantes contra LDL oxidadas en humanos. Esta observación sugirió que la aterosclerosis puede ser una enfermedad autoinmune causada por reacciones inmunes contra lipoproteínas oxidadas. En este momento, varios laboratorios empezaron la búsqueda de asociaciones entre títulos de anticuerpo contra LDL oxidadas y enfermedad cardiovascular. Sin embargo, la imagen que surgió de estos estudios fue nada clara. Existían anticuerpos contra un gran número de diferentes epitopos en LDL oxidadas, pero la estructura de estos epitopos era desconocida. El término "anticuerpos LDL oxidadas" se refería así a una mezcla desconocida de diferentes anticuerpos en lugar de un anticuerpo específico.

25 Está bien establecido que hay una inflamación en curso en las lesiones de aterosclerosis, caracterizada por la activación de células inmunocompetentes y la producción de citoquinas inflamatorias. Factores de riesgo establecidos como hipertensión, lípidos en sangre, diabetes y fumar es probable que promuevan esta reacción inflamatoria, pero el mecanismo por el cual esto ocurre no está bien caracterizado y existen posibilidades diferentes que no se excluyen mutuamente. Varios autoantígenos diferentes que pueden provocar esta reactividad inmune han sido propuestos, incluyendo lipoproteína oxidada de baja densidad (oxLDL) y proteínas de choque térmico (HSP)<sup>2,3</sup>. Los datos disponibles en el papel de reacciones inmunes en aterosclerosis indican una relación compleja. Un ejemplo de esto es la inmunización en modelos animales para influenciar la aterogénesis. Cuando HSP es utilizado, la aterosclerosis aumenta pero disminuye cuando oxLDL es el antígeno<sup>4,5</sup>.

35 El papel de aOxLDL en enfermedad en humanos parece ser complejo. En humanos, ha sido previamente demostrado que aOxLDL es superior en controles de salud que en hombres próximos a la hipertensión, un ejemplo de enfermedad<sup>6</sup> cardiovascular temprana. Adicionalmente, una correlación inversa existe entre los niveles de OxLDL en plasma y títulos<sup>28</sup> de aOxLDL. Esto puede sugerir que los niveles altos de aOxLDL juegan un papel en la regulación de los niveles de OxLDL en plasma, aunque la regulación de los niveles de OxLDL en plasma también son afectados por otros factores, quizá debido a una respuesta inmune compleja que envuelve un rango de anticuerpos cuando OxLDL es usado como antígeno. Por otro lado, muchos autores han informado que aOxLDL se elevan en enfermedades cardiovasculares en humanos (CVD), especialmente en las últimas etapas<sup>2,3,9,10</sup>. Un ejemplo es el lupus eritematoso sistémico (SLE) y la enfermedad autoinmune asociada con un alto riesgo de CVD. Pacientes-SLE con un historial de CVD tuvieron elevados niveles<sup>11</sup> aOxLDL. Estos resultados, hasta cierto punto contradictorios pueden depender de diferentes métodos y etapas de LDL-oxidación, dando diferencias en el rendimiento en la antigenicidad. Es también probable que la etapa de la enfermedad y el perfil de factor riesgo estén relacionados con los niveles de anticuerpo. Elevados niveles de aOxLDL han sido encontrados en pacientes con aterosclerosis avanzada y son predictivos en la progresión aterosclerosis carótida<sup>28</sup>.

50 La lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) tiene ella misma propiedades proinflamatorias incluyendo la activación de células T<sup>12, 13</sup>, monocitos/macrófagos y células endoteliales<sup>14-16</sup>. OxLDL promueve también la inflamación en las células competentes inmunes de las lesiones ateroscleróticas<sup>17</sup>. Sin embargo, debería remarcarse que oxLDL puede disminuir las reacciones inflamatorias agudas y por ejemplo, promover una o más inflamación crónica de bajo grado como se ve en la aterosclerosis<sup>18</sup>. Es interesante resaltar que muchos efectos biológicos de oxLDL son causados por factores de activación en placa (PAF)-similar a lípidos en oxLDL<sup>19-21</sup>.

Fosforilcolina (PC) es un componente principal no sólo en los fosfolípidos inflamatorios similares al factor de activación en placa-PAF (donde es fundamental para la interacción con el PAF-receptor) y en

oxLDL, pero también como componentes inmunogénicos de muchas bacterias incluyendo *S. Pneumoniae*<sup>22</sup>. Además, PC se expresa por células<sup>2,23</sup> apoptóticas.

En US5455032, los conjugados de fosfocolina han sido utilizados en vacunas para inducir inmunoprotección contra infecciones de muchas bacterias como *Streptococcus pneumoniae*. En un reciente estudio<sup>24</sup> por Binder et al en vacuna de pneumococcus en ratones, se muestra que la vacuna disminuyó la formación de lesión aterosclerótica. Se ha encontrado que muchos autoanticuerpos de OxLDL derivados de los ratones ateroscleróticos comparten la identidad estructural con anticuerpos que protegen contra patógenos infecciosos comunes, incluyendo *Streptococcus pneumoniae*. El estudio, en ratones, no en humanos, no da una información específica sobre la especificidad, o que anticuerpos anti-fosforilcolina IgM son significativamente más importantes que los correspondientes anticuerpos IgG como un factor de protección en aterosclerosis. Además, los conjugados de fosforilcolina no han sido utilizados en la vacuna de pneumococcus.

En otro estudio fue mostrado<sup>25</sup> que los niveles de anticuerpo antifosforilcolina son elevados en humanos con enfermedades periodontales. La conclusión es que fosforilcolina es un importante antígeno oral asociado con organismos en la flora periodontal y que el anticuerpo anti-PC es elevado como consecuencia de la enfermedad periodontal. Ninguna información es dada en referencia a los anticuerpos y la protección posible de o progresión de la aterosclerosis.

Una pareja de documentos (p.e, WO2002080954, WO0168119 y WO941445432) relacionados con el tratamiento de inmunización de aterosclerosis han sido publicados pero cada uno está basado en el uso de fragmentos de péptidos de apolipoproteína B, anticuerpos de cadena alfa/beta de receptores de células T o vacuna basada en esteroles. Métodos para detectar la placa aterosclerótica (WO9908109 y WO013207033) utilizando anticuerpos monoclonales para la oxidación de epítomos específicos en lipoproteína han sido descritos. Estos son diferentes del método propuesto en esta invención donde un conjugado de fosforilcolina es usado para detectar anticuerpos, p.e, anticuerpos IgM o IgG, en muestras sujeto.

Inmunización activa con epítomos de OxLDL, tal como MDA-LDL, o con un patógeno natural, *S. pneumoniae*, se encontrado que es ateroprotectiva en ratones modelos de aterosclerosis, pero las respuestas proaterogénicas via respuestas adaptativas Th1 son también provocadas<sup>27</sup>. Los niveles de E06, un anticuerpo que se une a PC, son elevados pero no dan evidencia de su actual papel en la inmunidad innata ateroprotectora.

Se ha mostrado que anticuerpos elevados contra haptenos PC unen los diferentes antígenos PC encontrados dentro de un rango de contextos biológicos diferentes, tales como en membranas de células apoptóticas, patógenos y/o lesiones ateroscleróticas<sup>29</sup>. Métodos para la producción de anticuerpos anti PC han sido descritos pero no para el uso en el tratamiento de aterosclerosis<sup>30, 31</sup>.

## RESUMEN DE LA INVENCION

La invención trata del uso de composiciones farmacéuticas que comprende una preparación de anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, con especificidad a un conjugado de fosforilcolina, y el uso de estas composiciones en el tratamiento o prevención de aterosclerosis, por ejemplo en el tratamiento, prevención o reducción o progresión posterior de aterosclerosis. Además, la invención también trata del uso de la preparación de dicho anticuerpo, por ejemplo anticuerpo monoclonal para producir una composición farmacéutica opcionalmente con un adyuvante.

Un primer aspecto de la invención proporciona el uso de una composición farmacéutica que comprende una preparación de anticuerpo, con especificidad a un conjugado fosforilcolina, en la realización de un medicamento para inmunización y tratamiento de humanos contra aterosclerosis o una enfermedad aterosclerótica relacionada. El medicamento está destinado para proporcionar inmunización teniendo propiedades inmunogénicas o terapéuticas contra aterosclerosis.

En una realización, la preparación de anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal.

Por conjugado fosforilcolina se entiende una fracción de fosforilcolina ligada a un portador, preferiblemente vía un espaciador. El elemento estructural de fosforilcolina puede comprender un derivado de fosforilcolina. Ejemplos de adecuados conjugados fosforilcolina están descritos en US 5,455,032 como se cita arriba. Por ejemplo, US 5,455,032 proporciona conjugados fosforilcolina en que la fracción de fosforilcolina está ligada por una cadena lineal alquil y un enlace amida a una variedad de portadores inmunológicos. El conjugado fosforilcolina puede por ejemplo ser una albúmina de suero humano (HSA)- o hemocianina de lapa californiana (KLH)- conjugado fosforilcolina o una albúmina de suero bovino (BSA)-fosforilcolina conjugado (por ejemplo como se describió en los ejemplos). PC-BSA (Fosforilcolina-Albúmina Suero Bovina) puede ser comprado de Biosearch Technologies, INC (Ca, USA). HSA-BSA- puede ser conjugado por un procedimiento químico, por ejemplo el siguiente procedimiento:

O-(4-aminofenil fosforil)-colina (I) puede ser preparada de O-(4-nitrofenil-fosforil)-colina (Sigma N 5879) en rendimiento cuantitativo por reducción con gas hidrógeno a 1 atm con 10% de paladio con carbón vegetal como catalizador de acuerdo al procedimiento descrito por Chesebro, B. en *Biochemistry* 11, (1972) 766.

- 5 (I) puede estar acoplado a HSA por medio de EDC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carboimida) en buffer MES pH 4, de acuerdo al procedimiento descrito por Padilla, N.D. et al in *J.Immun.. Methods* 293 (2004) 1-11. El conjugado HSA puede ser aislado por diálisis contra el buffer salino a pH 7.4.

El portador puede ser, por ejemplo, una proteína, lípido o polímero. El portador puede ser perlas de latex, por ejemplo como se describe en los ejemplos.

El medicamento puede estar destinado para administrarse por inyección.

- 10 Un segundo aspecto de la invención proporciona el uso de una preparación de anticuerpo con especificidad a un conjugado de fosforilcolina, en la realización de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un humano que está sufriendo de aterosclerosis o frente al riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular isquémica. En una fabricación, la preparación de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

## 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los ejemplos descritos debajo son proporcionados sólo con el propósito de ilustrar la presente invención.

- 20 Un ejemplo de un método para determinar la presencia o ausencia (o nivel) de anticuerpos IgM contra fosforilcolina que está relacionada con un aumento o disminución de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares isquémicas es descrito. Otros métodos conocidos en la técnica pueden ser también utilizados. Métodos similares pueden ser utilizados para determinar la presencia o ausencia (o nivel) de anticuerpos IgG contra fosforilcolina.

### Métodos para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgM contra fosforilcolina

- 25 Los anticuerpos IgM de PC-BSA fueron determinados por un método de ensayo inmunosorbente ligado a enzima. Una placa de microtitulación fue cubierta con PC-BSA (10 µg/ml; por ejemplo de Biosearch Technologies, INC (Ca, USA) en fosfato salino buffer (PBS). Después de los lavados con PBS, las placas fueron bloqueadas con una solución de 2% de BSA. Las muestras de suero fueron diluidas (1:30) en 0.2% BSA-PBS. Las placas fueron incubadas durante la noche a 40°C y lavadas. Se añadió fosfatasa alcalina conjugado de cabra anti-humano IgM (diluida 1:7000 en una muestra buffer) a 100 µl/pocillo e incubado a 40°C durante la noche. Después de los lavados, el color se obtuvo mediante la adición de sustrato fosfatasa alcalina e incubando las placas durante 60 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro a 405 nm.

- 35 Diferentes portadores y espaciadores de fosforilcolina fueron probados. Los portadores ejemplificados no están limitados a estos. Otros portadores tales como proteínas, lípidos o polímeros, tales como perlas de látex que son conocidas en la técnica, pueden ser utilizados. Los portadores son discutidos en US 5,455,032, como se describió arriba.

- 40 Los anticuerpos IgM o IgG detectados por tales métodos pueden unirse a la fosforilcolina (PC) presente en PC- conteniendo componentes en los que PC está expuesto, por ejemplo en lisofosfatidilcolina (lisoPC, vea por ejemplo, Kim et al, *J Exp Med.* 2002 Sep 2;196(5):655-65). Así, un método de invención puede detectar anticuerpos IgM o IgG que se unen a la lisofosfatidilcolina.

### Síntesis de conjugado fosforilcolina y preparación de una composición farmacéutica.

- 45 Perlas de látex (0.20 µm o 0.81 µm) fueron suspendidos en PBS y mezclados durante la noche con una solución de 10 µl/ml de fosforilcolina-BSA. Las perlas fueron lavadas varias veces con una solución buffer y de saturación de 10 µg/ml de BSA. Después de otros lavados repetidos, las perlas fueron suspendidas a una concentración adecuada en un buffer adecuado y almacenadas hasta su uso.

- 50 Fosforilcolina con un lazo de unión puede ser conjugada a KLH (hemocianina de lapa californiana) vía grupo diazofenil. Más preferiblemente un p-nitrofenil-6-(O-fosfocolina)hidroxihexanoato derivado de PC puede ser sintetizado de acuerdo a Chesebro, B. and Metzger, H. (1972) *Biochem.* 11:776. P-Nitrofenil-6-(O-fosfocolina) hidroxihexanoato fue disuelto en acetonitrilo seco (100 mg/ml) justo antes de añadirlo en el KLH. Derivados y KLH fueron mezclados durante la noche a 4°C y luego dializados para eliminar los espaciadores no unidos y p-nitrofenilato, que es el grupo que sale.

Una inyección de solución de conjugado fosforilcolina preparada, suspendida en un buffer adecuado, puede ser directamente utilizada para inmunización.

Inmunización con un conjugado fosforilcolina.

Un alto título de anticuerpos IgM que reconocen fosforilcolina, fue determinado en el plasma de ratones BALB/c después de la inmunización con 200 µg [p-nitrofenil-6-(O-fosforilcolina) hidroxihexanoato-KLH] utilizando el método de ensayo inmune sugerido.

5 Anticuerpos monoclonales contra conjugado fosforilcolina.

Anticuerpos pueden ser producidos utilizando método estándar conocido en la técnica. Vea por ejemplo "Briles DE, Forman C, Hudak S, Claflin JL. Anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idotype are optimally protective against Streptococcus pneumoniae. J Exp Med. 982;156:1177-85" or "T15 PC binding monoclonal antibodies retain specificity when they switch from IgM to IgG. , Spira, Gad; Aguila, Hector L.; Scharff, Matthew D. Fac. Med., Technion-Israel Inst. Technol., Haifa, Israel. Journal of Immunology (1988), 140(8), 2675-80.

Otros anticuerpos contra un conjugado fosforilcolina pueden ser preparados utilizando métodos bien conocidos por los entendidos en la técnica. Por ejemplo, puede ser preparada una subfracción con una actividad aPC de una preparación de inmunoglobulina humana, por ejemplo como se describe abajo, por ejemplo por purificación por afinidad utilizando conjugado fosforilcolina. Preparaciones inmunoglobulinas intravenosas (p.e, Baxter y otros) es una preparación altamente purificada de IgG comercialmente disponible y es usada en el tratamiento de pacientes que no tienen, o tienen pocos niveles de producción de anticuerpos. Preparaciones de inmunoglobulina incluyen aquellas que están disponibles por los fabricantes: Baxter (US) eg Gammagard®, Isiven (Antimo Naples, Italy), Omrix (Tel-Hashomer, Israel), Miles (Biological Products Division, West Haven, CT), Sclavo (Lucca, Italy), Sandoz (Novartis, Basel, Switzerland) eg Sandoglobulin®, Biotest Diagnostic Corporation (Deville, NJ). Examples of immunoglobulin preparations are Gammagard S/D®, Gammar IV®, Gammar-P IV®, Gammimune N®, Iveegam®, Panglobulin®, Polygam S/D®

Sandoglobulin®, Venoglobulin®. Preparaciones de inmunoglobulina contienen típicamente algunos IgM como también IgG. Cantidades trazas de IgM están presente en Gammagard®. Pentaglobin (Biotest) es una preparación enriquecida IgM que ha sido utilizada para tratamientos de SARS. La subfracción con actividad aPC puede comprender ambas IgG y IgM, o puede ser seleccionada para comprender principalmente IgG (por ejemplo mediante el comienzo con la preparación IgG-rica tal como Gammagard® y/o mediante selección de IgG); o principalmente IgM (por ejemplo mediante comienzo con una preparación IgM-rica tal como Pentaglobin y/o por selección de IgM).

Una preparación de anticuerpo con especificidad hacia conjugado fosforilcolina une a un conjugado fosforilcolina y puede unir a la fosforilcolina (PC) presente en PC conteniendo compuestos en que PC está expuesta, por ejemplo en lisofosfatidilcolina (lisoPC; vea, por ejemplo, Kim et al, J Exp Med. 2002 Sep 2;196(5):655-65). Así, una preparación de anticuerpo con especificidad a un conjugado fosforilcolina puede unir a la lisofosfatidilcolina.

Niveles de inmunoglobulina IgM en sujetos ateroscleróticos

Los niveles de anticuerpo IgM contra fosforilcolina en sujetos con hipertensión (presión diastólica >95 mmHg) fueron determinados al inicio y después de 4 años en un estudio de correlación de factores de riesgo para aterosclerosis. Los resultados están resumidos debajo.

Las placas carótidas fueron detectadas en 77 sujetos (35%) al inscribirse y en 84 sujetos (38%) a los 4 años de seguimiento. Fueron objeto de estudio un total de 218 humanos. Aumentos de espesor íntima-media (IMT) durante el seguimiento fueron menos llamativo en sujetos que tienen elevados niveles de suero de IgM a PC (percentil 75 o 90) en el momento de inscripción. Hay una diferencia significativa entre los valores medios en niveles de anticuerpo IgM anti-fosforilcolina entre los individuos con IMT alto y IMT bajo (638.8±219.6 vs 734.8±266.9. p=0.004).

Las relaciones entre anticuerpos IgM y PC y cambios en IMT fueron independientes de la edad, hábitos de fumar, tratamiento con atenolol o lacidipina y lípidos en la sangre. Anticuerpos IgM fueron independientes de los valores de IgG.

Como se describe aquí, en una realización no reivindicada, un conjugado fosforilcolina puede ser utilizado para la preparación de una composición farmacéutica para ser utilizada en el tratamiento o prevención de aterosclerosis. El conjugado puede ser fosforilcolina unida a una proteína o a un polímero. La composición farmacéutica es preferiblemente dada por inyección.

El método propuesto de inmunización activa modulará el título de anticuerpo que de hecho tendrá un efecto positivo en el desarrollo de la aterosclerosis.

La presente invención proporciona el uso de una preparación de anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, que reconoce a un conjugado fosforilcolina para la preparación de una

composición farmacéutica para ser utilizada en el tratamiento o prevención de aterosclerosis. El anticuerpo monoclonal puede ser producido utilizando métodos conocidos en la técnica.

5 Un método posterior no reivindicado descrito aquí es un método de diagnóstico de presencia o ausencia de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos IgM o IgG, hacia fosforilcolina que es un factor relacionado con el alto riesgo o no de desarrollar enfermedades cardiovasculares isquémicas, utilizando un conjugado fosforilcolina. Un método preferido es un ensayo inmune. El método puede ser usado en la evaluación del riesgo del paciente de desarrollo progreso de una enfermedad cardiovascular isquémica.

Figuras:

10 **Figura 1a:** Inhibición de anticuerpo (IgM) unido a placas ELISA recubiertas con PC albúmina mediante  $\beta$ 2GPI, PS y CL. Inhibición mediante diferentes antígenos de unión a PC albúmina-placas recubiertas. En orden de investigar la especificidad de aPC, ensayos de competencia fueron desarrollados como se describe en la sección Experimental. Los resultados están presentados como media  $\pm$ SD.

15 **Figura 1b:** Inhibición de anticuerpo (IgG) unido a placas ELISA recubiertas con PC albúmina mediante  $\beta$ 2GPI, PS y CL. Inhibición mediante diferentes antígenos de unión a PC albúmina-placas recubiertas. En orden de investigar la especificidad de aPC, ensayos de competencia fueron desarrollados como se describe en la sección Experimental. Los resultados están presentados como media  $\pm$ SD.

20 **Figura 2a:** Inhibición de anticuerpo (IgM) unido a placas ELISA recubiertas con PC albúmina mediante oxLDL y MDA-LDL. Inhibición mediante diferentes antígenos de unión a PC albúmina-placas recubiertas. En orden de investigar la especificidad de aPC, ensayos de competencia fueron desarrollados como se describe en la sección Experimental. Los resultados están presentados como media  $\pm$ SD.

**Figura 2b:** Inhibición de anticuerpo (IgG) unido a placas ELISA recubiertas con PC albúmina mediante oxLDL y MDA-LDL. Inhibición mediante diferentes antígenos de unión a PC albúmina-placas recubiertas. En orden de investigar la especificidad de aPC, ensayos de competencia fueron desarrollados como se describe en la sección Experimental. Los resultados están presentados como media  $\pm$ SD.

25 **Figura 3: efecto en el consumo de oxLDL en macrófagos mediante aPC extraídos de IGIV**

Experimentamos con dos grupos: macrófagos con oxLDL y macrófagos con oxLDL-preincubación con aPC extraídos de IVIG.

Macrófago+ -oxLDL (células totales 107):

Débil tinción 37/107 = 34.58%

30 Fuerte tinción 10/107 = 9.35%

Tinción total positiva 47/107 = 43.93%

Macrófago+Dil-oxLDL + aPC- grupo (156 células comprobadas):

Débil tinción 37/156 = 23.72%

Fuerte tinción 2/156 = 1.28%

35 Tinción total positiva 39/156 = 25%

**Figura 3A** muestra el teñido con Dil-clasificado oxLDL. **Figura 3B** muestra el teñido con oxLDL sin clasificar.

40 **Figura 4:** Efecto de pre-incubación de suero de título anticuerpos altos en antifosfolípidos (aPLs) con inmunoglobulina Gammargard® humana cultivada en Anexina V que une las células endoteliales umbilicales humanas (HUVECs): análisis de flujo citométrico después de 24 horas de cultivo.

IVIG preincubado con suero a	Intensidad fluorescencia media (MFI) de Anexina V vinculante
0 mg/ml	649
2.5 mg/ml	913
5 mg/ml	1269
10 mg/ml	1382

**Figura 5: efecto de aPC en inducción ICAM en células endoteliales.**

1 µg/ml de PAF fue añadido a cultivos de células endoteliales, con o sin preincubación con aPC IgM. Expresión de ICAM-1 fue ensayada con FACScan. La línea verde representa el efecto de PAF, mientras que la roja es PAF+aPC IgM y el control negro. Los datos indican claramente un eje a la izquierda del histograma cuando son añadidos aPC IgM.

**EXPERIMENTAL**Sujetos

Las muestras de suero fueron obtenidas de 226 sujetos con hipertensión establecida (presión diastólica >95 mmHg) antes de su entrada en el componente Swedish de European Lacidipine Study en Atherosclerosis (ELSA)<sup>25,26</sup>. Las muestras fueron recogidas en las siguientes 4 semanas con un periodo de lavado de no medicación para minimizar los efectos de tratamiento en los parámetros de medida. Los niveles de presión sanguínea, colesterol y triglicéridos fueron determinados como se describe previamente<sup>25,26</sup>. Ciento quince de los sujetos fueron evaluados para el tratamiento con el bloqueador-β atenolol, y 111 de estos sujetos fueron evaluados para el tratamiento con la lacidipina antagonista de calcio. El estudio fue aprobado por Ethics Committee of Karolinska Hospital y fue conducido según la declaración de Helsinki. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado.

Ultrasonido carótido.

Las determinaciones de ultrasonido carótido fueron desarrolladas y analizadas en detalle en otra parte<sup>25,26</sup>. Un total de 218 pacientes tuvieron medidas de ultrasonido válidas al comienzo y en el 4 año de seguimiento. Brevemente, las arterias carótidas derecha e izquierda fueron examinadas con el escáner Biosound 2000 ILa dúplex utilizando un transductor de matriz anular 8.0 MHz. El espesor íntima-media (I-M) fue determinado en la pared lejana cuando la distancia entre el extremo principal del eco lumen-intima y el extremo principal del eco media-adventicio. La medida obtenida como un indicador sustituto para aterosclerosis fue el cambio en la media de espesor íntima-media (IMT) de las 4 paredes extremas en las carótidas comunes distales y las bifurcaciones carótidas bilateralmente (CBMmax) a los 4 años de seguimiento. Las asociaciones entre los niveles de anticuerpo a PC en la inscripción en el estudio con un aumento o disminución de IMT a los 4 años de seguimiento fueron evaluadas.

Reactivos

Inmuno-placas microtítulo Polisorp F96 fueron adquiridas de Nunc (Roskilde Denmark), PC-BSA (suero albúmina fosforilcolina-bovina) fue adquirido de Bioserch Technologies, INC (USA).

Albúmina suero bovino (BSA), fosfatasa alcalino conjugado de cabra IgG(r-cadena específica) antihumana, fosfatasa alcalina conjugada de cabra IgM (u-cadena específica) anti-humana, PNPP (substrato fosfatasa alcalina), fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA). Cardiolipin (CL) fue adquirida de AVANTT (US, β<sub>2</sub>glicoproteína (β<sub>2</sub>GP1) fue obtenido de Calbiochem (US).

Los niveles totales de IgG y IgM fueron determinados por técnicas rutinarias como se describió<sup>6</sup> previamente.

CRP fue analizado en suero mediante métodos altamente sensibles utilizando inmunonefelometría de partícula mejorada (Behring Nephelometer Analyzer, BN II (Dade Behring GmbH, Marburg, Germany)) con una variación antir-ensayo <4%.

Determinación de anticuerpos contra PC, oxLDL y MDA-LDL

Anticuerpos IgG y IgM de PC-BSA fueron determinados por ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA). Suero agrupado de 17 pacientes de síndrome antifosfolípido fue utilizado como un estándar y examinado en cada placa. La meseta del anticuerpo de unión fue alcanzada con la concentración de antígeno de 10 µg/ml. La placa polisorp microtítulo F96 fue recubierta con pocillo PC-BSA (10 µg/ml) 50 µg en PBS. Las placas recubiertas fueron incubadas durante la noche a 4°C. Después de cinco lavados con PBBS, las placas fueron bloqueadas con 2% BSA-PBS durante 2h a temperatura ambiente y lavadas como se describe arriba. Las muestras fueron diluidas (1:30) en 0.2% BSA-PBS y añadidas a 50 µl/pocillo.

LDL fue aislada del plasma de los donantes sanos mediante ultra centrifugación preparativa secuencial y oxidada mediante iones cobre (OxLDL) o derivados con MDA (MDA-LDL) como se describió<sup>6</sup>.

OxLDL y MDA-LDL fueron determinados fundamentalmente por ELISA como se describió<sup>6</sup>. OxLDL o MDA-LDL fue diluida a 2 µg/ml en un buffer de recubrimiento (buffer carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9.7) y 100 µl/pocillo fue usado para recubrir las placas ELISA (Costar 2581). Las placas permanecieron a 4°C durante la noche, lavadas 4 veces con PBS, y luego se bloquearon con 20% de suero bovino adulto

en PBS (20% ABS-PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se mantuvieron incubadas con  $\mu$ l de suero, diluido 1:30 en 20% ABS-PBS a 4°C durante la noche.

5 Las placas estuvieron incubadas durante la noche a 4°C y lavadas como se describe arriba. Fosfatasa alcalina conjugada de cabra antihumana IgG (diluida 1:9000 en la muestra buffer) y fosfatasa alcalina conjugada de cabra antihumana IgM (diluida 1:7000 en la muestra buffer) fueron añadidas a 100  $\mu$ l/pocillo e incubadas a 4°C durante la noche. Después de cinco lavados, el color se desarrolló mediante la adición de substrato fosfatasa alcalina (PNPP) a 100  $\mu$ l/pocillo y se incubaron las placas durante 60 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las placas fueron examinadas en el espectrofotómetro Multiskan Plus ELISA a 405 nm. Todas las muestras fueron medidas en un ensayo simple y el coeficiente de variación estuvo por debajo de 10-15%.

#### Especificidad de anticuerpos anti-fosforilcolina-BSA

15 A fin de investigar la especificidad de anti-fosforilcolina-BSA, los ensayos de absorción fueron desarrollados mediante el uso de sueros de título alto mezclados. A una dilución dando al 50% de unión máxima a PC-BSA, los sueros de título alto mezclados fueron preincubados con una concentración diferente de PC-BSA. Después del vórtice, los tubos fueron incubados a 40°C durante la noche y centrifugados a 13000 r.p.m. durante 30 min (40°C). Los sobrenadantes fueron examinados por un anticuerpo que une a PC-BSA como se describe. El porcentaje de inhibición fue calculado como sigue:

Porcentaje de inhibición =  $(OD \text{ sin competidor} - OD \text{ con competidor} \times 100 / OD \text{ sin competidor})$ .

#### Análisis estadístico

20 Los niveles de anti-fosforilcolina fueron dicotomizados al percentil 75 y 90. La asociación entre anti-fosforilcolina (u otros anticuerpos) y la progresión de aterosclerosis durante un periodo de 4 años fueron determinadas mediante la estimación de aumento en IMT (si o no) utilizando análisis de regresión logístico y el cálculo de proporciones de fracciones (ORs) y 95% intervalo de confianza (CI), o comparación utilizando correlación Spearman como se indica. Ajustes fueron hechos para posibles factores de confusión incluyendo edad, hábitos de fumar, colesterol en suero, triglicéridos en suero y modo de tratamiento anti-hipertensivo (lacidipina, atenolol). Un valor p de dos colas <0.05 fue considerado como significativo.

#### Resultados

30 Las características básicas de sujetos en el momento de inscripción en el estudio han sido detalladas en otra parte (Pockley et al (2003) Hypertension 42, 235-238) y están presentes en la tabla 1.

35 Los estudios de competencia revelan que aPC de IgM y subclase IgG fue hecha competente mediante preincubación con PC-BSA, mientras la cardiolipina tuvo una capacidad débil y no competitiva de fosfatidilserina (Figura 1a, 1b).  $\beta$ 2-glicoproteína 1 compitió la misma extensión con IgG vinculante a PC-BSA pero no tanto como con IgM (figura 1a, 1b). PC-BSA tuvo una baja capacidad para ser competente en la unión de otros antígenos probados (datos no mostrados). OxLDL y MDA-LDL puede competir con la unión de IgM aPC a PC-BSA, y también de IGC aPC, aunque no en la misma extensión (figura 2a, 2b).

40 Incrementos en IMT en seguimiento fueron menos prevalentes en sujetos que tienen niveles de suero elevados de IgM a PC (percentil 75 o 90), oxLDL y MDA-LDL (percentil 90) a la hora de inscripción, mientras CRP no está asociado con cambios IMT (Tabla 2). El análisis de regresión logístico reveló que las relaciones entre autoanticuerpos IgM a PC oxLDL y MDA-LDL y cambios en IMT fueron independientes de la edad, hábitos de fumar, tratamiento con atenolol o lacidipina y lípidos en sangre.

45 aPC IgM: estuvieron significativamente asociados con cambios en IMT a ambos percentil 75 y 90, mientras aOxLDL y MDA-LDL de subclase IgM sólo mostraron significancia a 90 (tabla 3a-d). Anticuerpos IgM fueron también independientes de valores IgG (datos nos mostrados). Además, niveles totales de IgG y IgM no estuvieron asociados con medidas de IMT o cambios (datos no mostrados).

Autoanticuerpos IgG a PC fueron menores en tendencia en sujetos con aumentos en IMT pero esta diferencia no alcanza la significancia estadística (tabla 2).

50 Había diferencias importantes entre hombres y mujeres. aPC, aMDA-LDL, y aOxLDL de subclases IgM, fueron significativamente mayor en mujeres que en hombres ( $p$ 's<0.05). Por el contrario, las mujeres tuvieron una ocurrencia significativamente menor de placas al inicio y en el seguimiento ( $p$ <0.05).

Niveles IgM aPC correlacionados negativamente con aumento en IMT ( $Rho$  0.18,  $p=0.006$ ) en contraste a los otros dos factores de protección, HDL y HSP70 que correlacionaron con los cambios IMT como medidas continuas (datos no mostrados). Poco probable aPC IgM, aOxLDL y aMDA-LDL no alcanzaron significancia en estas determinaciones (datos no mostrados).



5 No había asociaciones significativas entre niveles niveles IgM aPC y aOCLDL IgM (Rho 0.74 p<0.001) y aMDA-LDL IgM (rho 0.51, p<0.001). Igualmente aPC correlacionada con HSP60 (Rho 0.28, p<0.001), HSP70 (Rho 0.35, p<0.001), que nosotros hemos descrito como un factor de protección nuevo para aterosclerosis humana en este cohorte (Pockley et al (2003) supra) y también con HDL (Rho 0.23, p<0.01). No había asociaciones entre aPC IgM, aOxLDL IgM o aOxLDL, MDA-LDL y LDL, CRP o triglicéridos (datos no mostrados).

10 Cuando el análisis de regresión logístico fue hecho por separado entre hombres y mujeres, controlando la edad, colesterol total, triglicéridos, fumar y fue estudiado el tratamiento IgM aPC que mostró efectos protectores significativos en mujeres sólo con 90 percentil (EXP (B)=0.17, 95% CI=0.05-.68; p=0.01 y en hombres con 75 percentil estudiado EXP (B)=.18, 95% CI=0.04-.74; p=0.01, respectivamente).

15 IgM a MDA-LDL u oxLDL diferente en este respecto, desde sólo valores para mujeres alcanzó significancia estadística independientemente. Así, cuando los análisis de regresión logísticos por separado fueron hechos por hombres y mujeres, controlando la edad, colesterol total, triglicéridos, fumar y tratamiento de ambos IgM a MDA-LDL y IgM a OxLDL mostró efectos protectores en mujeres (EXP (B)=.17, 95% CI=.05-.068, p=0.01 y EXP (B)=.18, 95% CI = -.04-.74, p=0.01, respectivamente), mientras que el efecto no alcanzó significancia entre hombres (EXP (B) = .60, 95% CI=.15-2.2, p=0.44, y EXP (B)=.39, 95% CI=.10-1.5, p=0.17 respectivamente), indicando que los títulos IgM altos a OxLDL y a MDA-LDL ídem ser específicamente protectores entre mujeres.

20 Tabla 1. Características básicas de grupo de estudio en la inscripción. Resultados están presentes como medias (SD) o porcentaje (%) y mg/dL para lípidos

	Total (N=226)	Atenolol (N=115)	Lacidipina (N=111)
Edad (años)	57.7 (7.8)	57.6 (7.6)	57.7 (7.9)
Sexo (% hombres)	50	46	53
BMI	26.7 (3.7)	26.3(3.3)	27.1 (3.9)
Colesterol total	232.4 (37.8)	233.5 (38.1)	231.4 (37.4)
HDL	55.6 (27.6)	56.5 (25.8)	54.7 (27.6)
LDL	149.4 (37.8)	149.7 (37.1)	149.2 (38.6)
Triglicéridos	131.6 (58.2)	128.6 (57.0)	134.7 (59.5)

Tabla 2. Predicción no ajustada de cambios en IMT con los niveles de inicio de anticuerpos IgG y IgM a la fosforilcolina (PC).

Variable	Proporción fracción 75 percentil	(95% CI) Menor	Superior	P
aPC(IgG)	.60	.32	1.1	.10
aPC(IgM)	.46	.25	.85	.01
aOxLDL (IgG)	1.2	.64	2.3	.57
aOxLDL (IgM)	.77	.41	1.4	.40
aMDA-LDL (IgG)	.80	.43	1.5	.48
aMDA-LDL (IgM)	.67	.36	1.2	.18
Proteína C-reactiva	.80	.43	1.5	.46
	90 percentil			
aPC(IgG)	.60	.25	1.4	2.4
aPC(IgM)	.36	.15	0.87	.024

aOxLDL (IgG)	.94	.38	2.31	.90
aOxLDL (IgM)	.27	.11	.69	.006
aMDA-LDL (IgG)	.63	.26	1.5	.30
aMDA-LDL (IgM)	.27	.11	.69	.006
Proteína reactiva C-	.60	.24	1.4	.24

Tabla 3a: predicción de cambios en MT durante el periodo de 4 años utilizando el 75 percentil de anticuerpo aPC IgM al inicio en sujetos con hipertensión estabilizada.

Variable en el modelo	Coeficiente (B)	Proporción fracción estimada (B)	Exp	P	95% CI	
					Menor	Superior
Fumar	-.01	.99		.95	.66	1.5
Sexo	-.05	.95		.87	.54	1.4
Colesterol total	.003	1.0		.45	.99	1.0
Triglicéridos en plasma	-.001	.99		.63	.99	1.0
Edad (años)	.01	1.0		.59	.97	1.0
Tratamiento (A/L)	-.23	.79		.40	.45	1.4
APCIgM	-1.0	37		.0027	.15	.89

- 5 Tabla 3b: predicción de cambios en IMT durante 4 años utilizando 90percentil de anticuerpos aPC IgM en sujetos con hipertensión estabilizada.

Variable en el modelo	Coeficiente (B)	Proporción fracción estimada (B)	Exp	P	95% CI	
					Menor	Superior
Fumar	-.02	.97		.90	.65	1.5
Sexo	-.005	1.0		.98	.56	1.8
Colesterol total	.003	1.0		.42	.99	1.0
Triglicéridos en plasma	-.001	.99		.67	.99	1.0
Edad (años)	.003	1.0		.87	.97	1.0
Tratamiento (A/L)	-.22	.80		.43	.46	1.4
APCIgM	-.77	.46		.017	.24	.87

Tabla 3c: Predicción de cambios de IMT durante 4 años utilizando el 90percentil con anticuerpos IgM a OxLDL y otros factores de riesgo en sujetos con hipertensión establecida.

Variable en el modelo	Coeficiente (B)	Proporción fracción estimada (B) Exp	P	95% CI	
				Menor	Superior
Fumar	-.01	.99	.95	.66	1.5
Sexo	-.001	1.1	.98	.56	1.8
Colesterol total	.001	1.0	.72	.99	1.1
Triglicéridos en plasma	-.001	1.0	.71	.99	1.0
Edad (años)	.01	1.0	.59	.97	1.0
Tratamiento (A/L)	-.28	.77	.35	.44	1.3
APCIGM	-1.3	.26	.008	.11	.72

Tabla 3d: Predicción de cambios en IMT durante 4 años utilizando el 90percentil con anticuerpos a MDA-LDL y otros factores de riesgo en sujetos con hipertensión establecida.

Variable en el modelo	Coeficiente (B)	Proporción fracción estimada (B) Exp	P	95% CI	
				Menor	Superior
Fumar	-.07	0.93	.73	.62	1.4
Sexo	-.001	.99	.99	.56	1.7
Colesterol total	0.001	1.0	.78	.99	1.0
Triglicéridos en plasma	-.001	.99	.74	.99	1.1
Edad (años)	0.01	1.0	.54	.97	1.0
Tratamiento (A/L)	-.27	.76	.34	.44	1.3
APCIGM	-1.1	.31	.01	.12	.79

#### REFERENCIAS

- 5 1. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999;145:33-43.
2. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med*. 2002;8:1218-26.
- 10 3. Frostegard J. Autoimmunity, oxidized LDL and cardiovascular disease. *Autoimmun Rev*. 2002;1:233-7.
4. Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:821-5.
- 15 5. Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, Gown AM, School B, Mikuz G, Kaufmann SH, Wick G. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:789-99.

6. Wu R, de Faire U, Lemne C, Witztum JL, Frostegard J. Autoantibodies to OxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. *Hypertension* 1999;33:53-9.
7. Hultne J, Wiklund O, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules, and phospholipase A(2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:269-74.
8. Karvonen J, PaivansaJo M, Kesaniemi YA; Horkko S. immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized lowdensity lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108:2107-12.
9. Bergmark C, Wu R, de Faire U, Lefvert AK, Swedenborg J. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:441-5.
10. Salonen JT, Ylä-Herttua S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyssönen K, Palinski W, Witztum JL. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992;339:883-887.
11. Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimbürger M, Silveira A, Hamsten A, de Faire U, Witztum JL, Frostegard J. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation.* 2001;104:1887-93.
12. Frostegard J, Wu R, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, Nilsson J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:461-7.
13. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:3893-7.
14. Berliner JA, Territo MC, Sevastian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest.* 1990;85:1260-6.
15. Frostegard J, Nilsson J, Hasgerstrand A, Hamsten A, Wigzell H, Gidlund M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:904-8.
16. Frostegard J, Haegerstrand A, Gidlund M, Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis.* 1991;90:119-26.
17. Fei GZ, Huang YH, Swedenborg J, Frostegard J. Oxidised LDL modulates immune-activation by an IL-12 dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 2003;169:77-85.
18. Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N. Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature.* 2002;419:77-81.
19. Frostegard J, Huang YH, Ronnelid J, Schafer-Elinder L. Platelet-activating factor and oxidized LDL induce immune activation by a common mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:963-8.
20. Heery JM, Kozah M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995;96:2322-30.
21. Subbanagounder G, Leitinger N, Shih PT, Faull KF, Berliner JA. Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early atherogenesis : in vitro and In vivo inhibition by WEB 2086. *Circ Res.* 1999;85:311-8.
22. Harnett W, Harnett MM. Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *Immunol Today.* 1999;20:125-9.
23. Shaw PX, Horkko S, Chang MK, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ, Witztum JL. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity [see comments]. *J Clin Invest.* 2000;105:1731-40.
24. Binder CJ, Horkko S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS, Shaw PX, Palinski W, Witztum JL, Silverman GJ. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med.* 2003;9:736-43.
25. Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancina G, Dal Palu C, Hansson L, Magnani B, Rahn KH, Reid J, Rodicio J, Safar M, Eckes L, Ravinotto R. Risk factors associated with alterations in carotid intima-

media thickness in hypertension: baseline data from the European Lacidipine Study on Atherosclerosis. J Hypertens. 1998;16:949-61.

26. Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancina G, Dal Palu C, Hansson L, Magnani B, Rahn KH, Reid JL, Rodicio J, Safar M, Eckes L, Rizzini P. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. Circulation. 2002;106:2422-7.

27. Database Dissertation Abstracts [Online] ProQuest Info&Learning;2002 Binder, Christoph Johannes: "Defining innate and adaptive immunity mechanisms in the atheroprotective effect of immunization with oxidized low-density lipoproteins" retrieved from DIALOG accession no. 0.907366. Database accession no. AADAA-13064459.

28. Tetsuo S, et al. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. Atherosclerosis. 2000;148:171-177.

29. Shaw P, et al. The autoreactivity of anti-phosphorycholine antibodies for atherosclerosis-associated neo-antigens and apoptotic cells. Journal of Immunology. 2003;170:6151-6157.

30. Kameyama K-Z, et al. Convenient plasmid vectors for construction of chimeric mouse/human antibodies. FEBS Letters. 1989;244:301-306.

31. EP 0 466 505. Fujita Health University: Takeda Shuzo Co. Ltd. 1992.

32. WO 94/14454 (Entremed, Inc) 7 July 1994.

33. WO 01/32070 (The regents of the University of California; Witztum, Joseph, Tsimikas) 10 May 2001.

20 Estudio que muestra el efecto protector de aPC

En un estudio observacional de Malmö (the Malmö Diet and Cancer Study), sobre 6000 a 30000 sujetos de la cohorte fueron inscritos por investigaciones cardiovasculares extensas, incluyendo cálculos no invasivos de aterosclerosis subclínica a través de medida de ultrasonido de las carótidas. Además, factores de riesgo cardiovasculares adicionales fueron medidos al inicio. A estos sujetos se les ha seguido durante 10 años en relación a la ocurrencia de nuevos casos de enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio, enfermedad cardíaca coronaria crónica, infarto aterotrombótico). A la hora de calcular los riesgos relativos (calculados como riesgos relativos) con 95% de intervalos de confianza, análisis anidado de casos y controles (3 controles por caso) fueron realizados para bajos niveles de anticuerpos contra fosforilcolina (aPC-IgM). Había un total de 145 casos CVD (principalmente infarto de miocardio (MI) e infarto isquémico) y 400 controles de edad y sexo. El nivel de corte para aPC fue 307 para el décimo percentil de niveles aPC. Había un total de 20 casos CVD con niveles de aPC debajo del décimo percentil (14%) y 34 controles (9%), correspondiente a riesgo relativo de 1.9 (95% CI1, 1-4,3). El número correspondiente de casos de hombres por debajo del décimo percentil de aPC fue 16 (19%) y 25 controles de pacientes por debajo de este nivel (11%), correspondiente a un riesgo relativo de 1.9 (95% CI 1, 1-3,5). El número de casos femeninos fue demasiado bajo para obtener una información sólida en riesgos relativos (vea tablas 1 y 2), Los resultados sugieren que bajos niveles aPC son protectores para la ocurrencia de enfermedad cardiovascular en sujetos sanos, y pueden actuar como marcadores de enfermedades cardiovasculares.

Tabla 1. Estadísticas descriptivas para aPC (<10 percentil)

		Sexo				Todos	
		Hombres		Mujeres			
		Caso	Control	Caso	Control	Caso	Control
Debajo 10 percentil							
No	n	68	206	57	160	125	366
	%	81	89	93	95	86	92
Si	N	16	25	4	9	20	34
	%	19	11	7	5	14	9

Tabla 2. Análisis univariable de la influencia de aPC (<10 percentil) en CVD mediante regresión logística condicional para todos los pacientes, hombres y mujeres, respectivamente.

	Variable	p-valor	Riesgo relativo	95% Riesgo relativo	Límites de confianza
Todos los pacientes	aPC	0.0308	1.939	1.063	3.536
Hombres	aPC	0.0262	2.181	1.097	4.338
Mujeres	aPC	0.6556	1.331	0.379	4.676

Efectos de aPC

5 Introducción

Mediante el uso de columnas que son preabsorbidas con PC-BSA, PC-KLH o vacuna Pneumococal (Statens Serum Institute, Denmark), extraemos anticuerpos con reactividad contra estos compuestos. Los niveles de aPC IgG son elevados en al menos los dos primeros de estos. Pequeñas cantidades de IgM pueden ser extraídas fuera de IVIG y luego llevadas a través de las columnas preabsorbidas con los antígenos anteriormente mencionados. A través de este método, podemos obtener aPC humano policlonal de subclase IgG y IgM. La medida de la proteína indica que los niveles de IgM aPC de 0.5 mg/ml puede ser extraído. Utilizando estos anticuerpos, podemos comprobar sus propiedades funcionales utilizando modelos in vitro:

Podemos preincubar las concentraciones crecientes de aPC IgM con la disminución de LDL oxidada vinculante y tomando la línea celular monocito/macrófago, TH1? Los sistemas de test con microscopía confocal y/o FACS pueden ser utilizados.

Podemos preincubar las concentraciones crecientes de aPC IgM con IgM normal como control, con PAF, inducción inhibición de lisofosfatidilcolina (LPC) de adhesión de moléculas ICAM en células endoteliales mediante estos lípidos? También otras citoquinas pueden ser examinadas utilizando kit comerciales (varias citoquinas diferentes; BioSource). Los Test pueden usarse de FACScan.

Cultivo de célula

HUVECs agrupados criopreservados en el tubo 2 fueron adquiridos de Cascade Biologics, Inc. (Portland, OR, USA). Los cultivos se mantuvieron en medio rojo-libre fenol EGMTM (Clonetics, San Diego, CA, USA), contenido 2% de suero bovino fetal y suplementos. Las células fueron incubadas en frascos de 75 cm2 (TPP, AG, Trasadingen, Switzerland) a 37°C bajo condiciones humidificadas 5% CO2.

Todos los experimentos fueron desarrollados en tubos 3 a 4. Las células fueron plantadas a 2x104 células /ml densidad en 12 placas pocillos (NUNC, Inc, Naperville, IL, USA) para el análisis citométrico de flujo. Después de las siguientes 12-24 horas para la fijación, las células estuvieron en reposo en SFM por al menos 12 horas antes del tratamiento. La línea celular monocítica THP-1 era de AT&T (USA). Las células se mantuvieron en RPMI con 10% FCS.

Preparación de aPC

La fracción total IgM o IgG fue separada de la inmunoglobulina humana agrupada disponible comercialmente (Gammagard®) a 50 mg/ml utilizando columnas HiTrap IgM o IgG (Amersham Biosciences). Anticuerpos contra fosforilcolina (PC) fueron eluidos después de la carga de la fracción IgM o IgG en columnas NHS-Sepharosa acopladas a PC conjugadas ya sea para la proteína de lapa californiana (KLH) (1 o 5 mg/ml) o albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg/ml), seguido de la columna con sólo BSA . PC-BSA (Fosforilcolina-Albúmia Suero Bovino) y PC-KLH fue adquirido de Biosearch Technologies, INC (Ca, USA). Fracciones eluidas fueron buffer-intercambiadas en columnas PD-10 y concentradas con dispositivos Milipore Centricone®. Procedimientos fueron desarrollados de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante. La concentración de IgM aPC preparada fue típicamente 50 µg/ml, y la concentración de IgG aPC fue típicamente 30 µg/ml.

Fagocito vinculante y captación de oxLDL por macrófagos THP-1 derivados

LDL Oxidada (oxLDL) es preparada como se describe por incubación de iones cobre. Primero, oxLDL es clasificado con Dil (Dil-(1,1'-dioctadecil-3,3,3',3',-tetrametilindocarbocianina perclorato; Pruebas moleculares, Inc)) y diluida en buffer Salina-EDATA a 1 mg/ml. Después, 2 ml suero deficiente en lipoproteína es añadido para 1 mg de oxLDL y luego filtrado (0.45 µm).

50ul Dil (3mg/ml) en DMSO es añadido para 1 mg oxLSL y la mezcla es incubado 15h, 37°C y luego dializado contra diversos cambios de salina-EDTA durante 6h. Después, esta mezcla es 0.45 um filtrada otra vez.

5 La captación de oxLDL es estudiada con microscopía fluorescencia/confocal. Células THP-1 como modelo para monocitos/macrófagos son cultivados durante la noche en cámara de diapositivas (medio: DNEM/10% FBS/Glu/PEST).

3 veces se lavaron con medio DMEM sin FBS.

Incubadas con oxLSL-DiO 5ug/ml (medio SFM) 6h.

Las células se lavaron con 0.2% BSA-PBS 5 veces, PBS 1 vez.

10 Tinción núcleo macrófago: las células fueron incubadas con 1ug/ml bisbenzimidida 10'y lavada con PBS 3 veces.

Fijar y montar: las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído en PBS para 30', PBS 3X, finalmente después 1 gota de gel de montaje. Las diapositivas fueron recubiertas con un cubreobjetos.

Anexina V vinculante a las células endoteliales.

15 Plasma conservado en Heparina con alta capacidad para inhibir Anexina V vinculante fue añadido a HUVECs monocapa a concentración de 10% en SFM. Después de 24 hrs las células fueron recogidas con Cell Dissociation Solution (CDS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y cuidadosamente agrupadas con sobrenadantes, para excluir la pérdida selectiva de células flotantes desprendidas, seguido de centrifugación a 1200 rpm durante 7 in. Después de la resuspensión en 100 µl de anexina V  
20 vinculante buffer (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) las muestras fueron teñidas con 2µl 5 mg/ml anexina V-FITC (Molecular Probes) e incubadas durante 15 min en hielo. Poco antes de la adquisición 1mg/ml de yoduro de propidio (PI; un colorante vital; R&DSystems Europe Ltd, Abingdon, UK) fue añadido. El análisis fue desarrollado como se describe arriba.

Análisis Estadístico

25 Las estadísticas fueron monitorizadas usando el software Stat View; SAS Institute AB, Göteborg, Suecia. Las variables continuas inclinadas fueron transformadas logarítmicamente. Grupos de estudio fueron comparados utilizando ANOVA para variables continuas y Chi cuadrado para variables categóricas. PLSD de Fischer fue utilizada como test post hoc. Los coeficientes de correlación fueron calculados utilizando la regresión simple o por correlación de rango de Spearman con una distribución no normal de variables de. El nivel de significancia fue establecido a  $p < 0.05$ .

30 Resultados

Medidas de Anexina V vinculante a células endoteliales.

35 La frecuencia de HUVECs positiva para el teñido de Anexina V fue determinada como el porcentaje de anexina V+/PI- células en un dibujo de punto bivariable o el porcentaje de células anexina V+ basadas en un histograma. Se sabe que anexina V vinculante a HUVECs en presencia de suero disminuye la vinculación y la preincubación con IVIG fue determinada. La preincubación con IVIG puede restaurar la vinculación de anexina, indicando que los anticuerpos presentes en IVIG pueden neutralizar la vinculación (fig 4).

40 0064 APC-BSA y aPC-KLH fueron ambos asociados significativamente en pacientes SLE-pacientes con un historial de CVD con Anexina V vinculante a EC ( $r=0.45$ ;  $p=0.02$  y  $r=0.42$  y  $p=0.03$  respectivamente). aPC fueron determinados como se describe arriba.

Efecto de captación de oxLDL en macrófagos mediante aPC

45 aPC de subclase IgM o IgG, extraída de IVIG como se indicó, fueron preincubados con oxLDL indicado (fig 3). Nosotros usamos un total de IgM como control para aPC IgM (macrófago+Dil-oxLDL + IgM) y el efecto en la captación de macrófago. El porcentaje total de células positivas teñidas es de 46.62%, indicando que IgM por sí no tiene los efectos inhibitorios que aPC tiene. IgM fue comprado de SIGMA, y es IgM humano purificado que es producido por precipitación y las técnicas de filtración de gel utilizando suero humano normal como material de inicio. La inmunoglobulina es determinada para que sea al menos 95% pura.

50 Efecto de aPC en inducción-ICAM en células endoteliales

PAF fue incubada con EC en las concentraciones indicadas. Como se demostró en la fig 5, este lípido puede inducir un significativo aumento en la expresión-ICAM. aPC de subclase IgM, extraída de IVIG como se indicó fueron preincubados con estos lípidos como se indicó (fig 5).

## ES 2 357 606 T3

Correlaciones entre aOC y otros marcadores de riesgo en estudio ELSA (226 individuos con hipertensión como se describió previamente).

aPC IgM fue asociado con otros dos factores de protección, HSP 70 y HDL, como indica la tabla 4. Había también una débil asociación significativa con TNF, un marcador de inflamación y citoquina proaterogénica.

TNF es una importante citoquina pro-inflamatoria y los niveles TNF negativamente asociados con niveles de aPC IgM. La asociación es débil, pero significativa. HSP 70 es un factor de protección novel recientemente descubierto por nosotros y otros. Hay una asociación claramente positiva. También HSP60, que es un factor de protección débil está asociado.

10 HDL es conocido como un colesterol “bueno”, con propiedades antiinflamatorias. Está asociado significativamente con aPC IgM.

	ANTTPCIGG	ANTPCIGM
Coeficiente de correlación ANTPCIGG ro de Spearman	1.000	0.245
Sig. 2 colas	.	0.000
N	220	220
Coeficiente de correlación ANTPCIGM	.145	1.000
Sig. 2 colas	.000	.
N	220	220
Coeficiente de correlación HDL	.008	.233
Sig. 2 colas	.906	.001
N	206	206
Coeficiente de correlación TNFA	-.012	-.136
Sig. 2 colas	.863	.044
N	220	220
Coeficiente de correlación HSP60	.138	.279
Sig. 2 colas	.047	.000
N	209	209
Coeficiente de correlación HSP70	.157	.356
Sig. 2 colas	.022	.000
N	213	213
** Correlación es significativa al nivel .01 (2 colas)		
*Correlación es significativa al nivel .05 (2 colas)		



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de una composición farmacéutica que comprende una preparación de anticuerpo, con especificidad hacia el conjugado fosforilcolina, en la fabricación de un medicamento para inmunización y tratamiento de humanos contra aterosclerosis o una enfermedad aterosclerótica relacionada.
2. Una preparación de un anticuerpo con especificidad a un conjugado fosforilcolina en el uso de inmunización y tratamiento de humanos contra aterosclerosis y una enfermedad aterosclerótica relacionada.
- 10 3. El uso de la reivindicación 1 o la preparación de anticuerpo de la reivindicación 2 donde la preparación de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. El uso de la reivindicación 1 o 3 o la preparación de anticuerpo de la reivindicación 2 o 3 donde el medicamento es para administrarse por inyección.
5. El uso o la preparación de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la fosforilcolina está unida a un portador mediante un espaciador.
- 15 6. El uso o preparación de anticuerpo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el conjugado fosforilcolina comprende fosforilcolina unida a una proteína portadora, opcionalmente vía un espaciador.
7. El uso o preparación de anticuerpo de acuerdo a la reivindicación 6, donde la proteína es KLH (hemocianina de lapa californiana) o albúmina de suero humano (HSA).
- 20 8. Uso de una preparación de anticuerpo, con especificidad a un conjugado fosforilcolina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un humano que sufre de aterosclerosis o que corre el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular isquémica.
- 25 9. Una preparación de anticuerpo con especificidad a un conjugado fosforilcolina para el uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de un humano que sufre de aterosclerosis o que corre el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular isquémica.
10. El uso de la reivindicación 8 o la preparación de anticuerpo de la reivindicación 9 donde la preparación del anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

FIGURA 1A

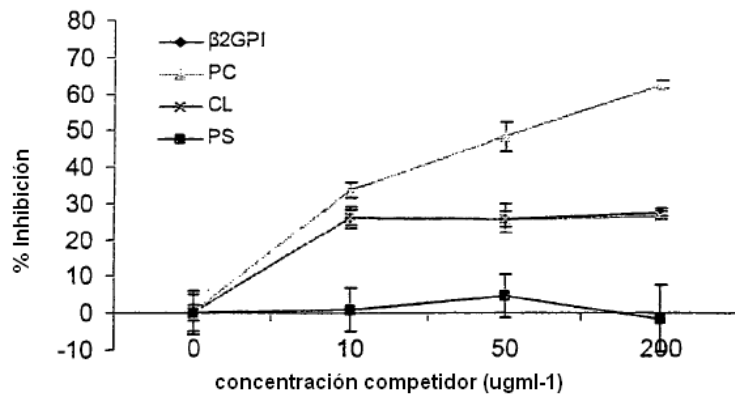


FIGURA 1B

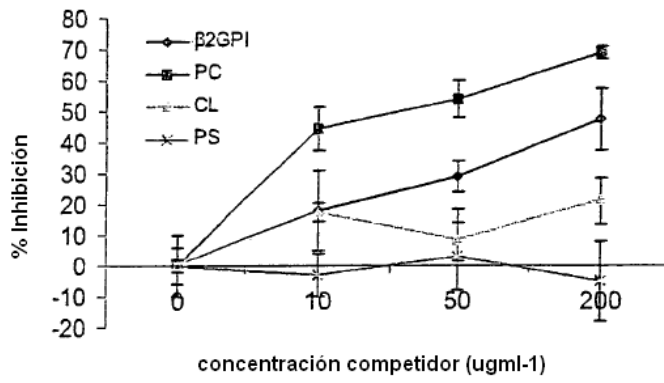


FIGURA 2A

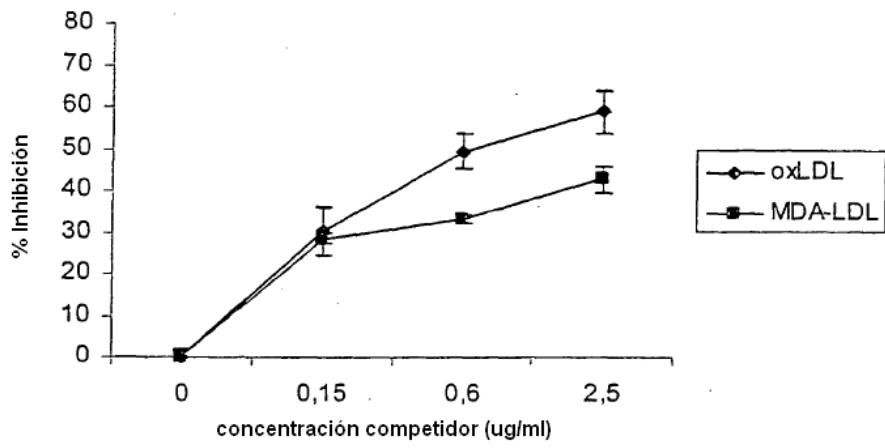


FIGURA 2B

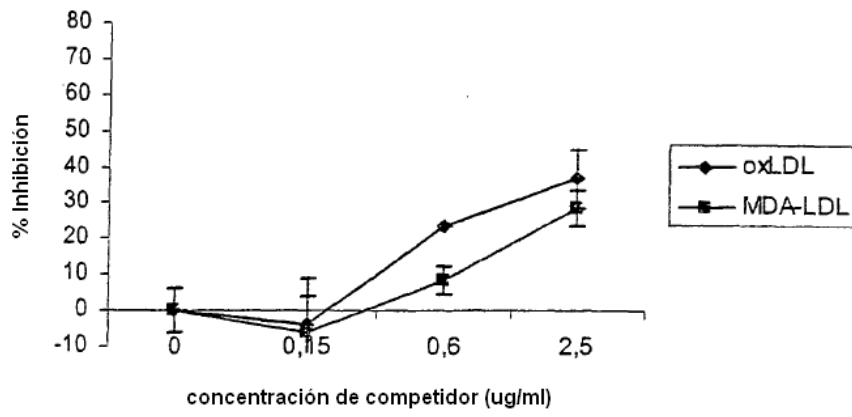


FIGURA 3A

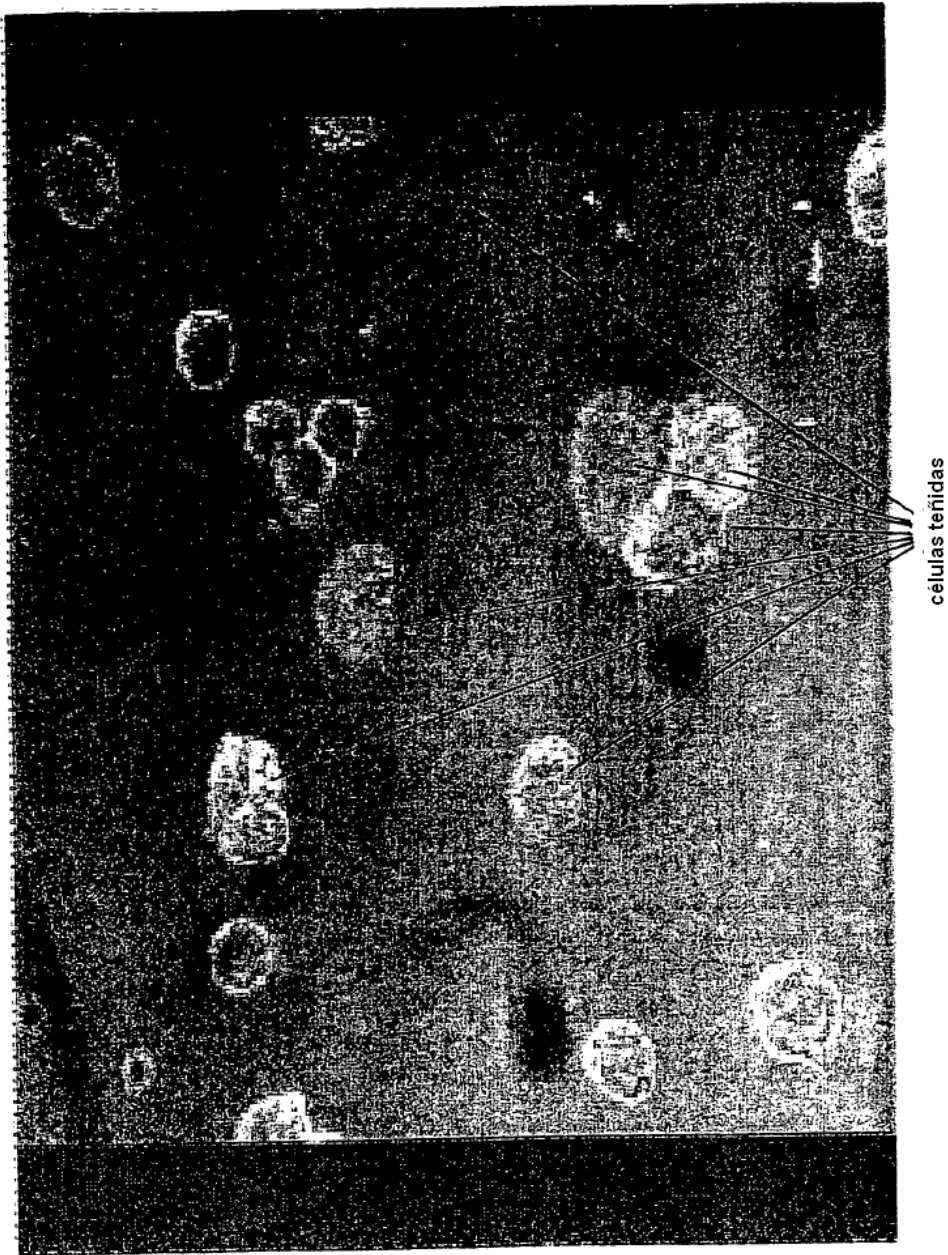


FIGURA 3B



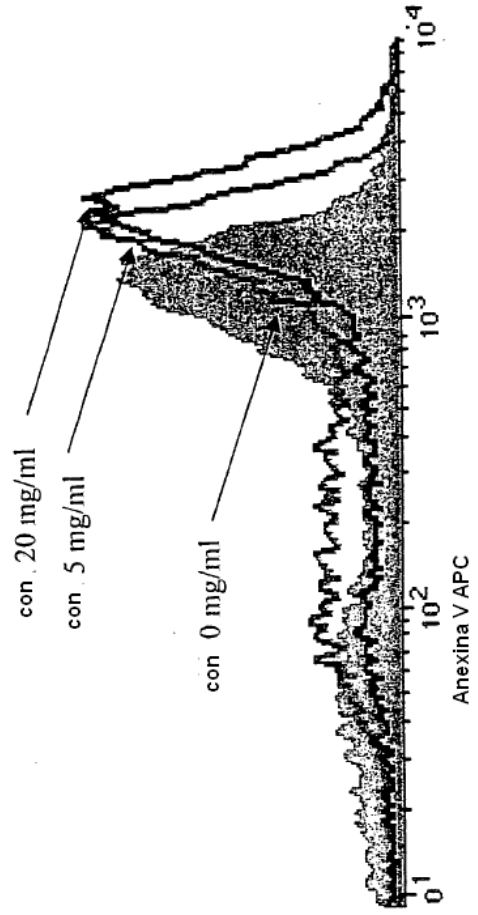
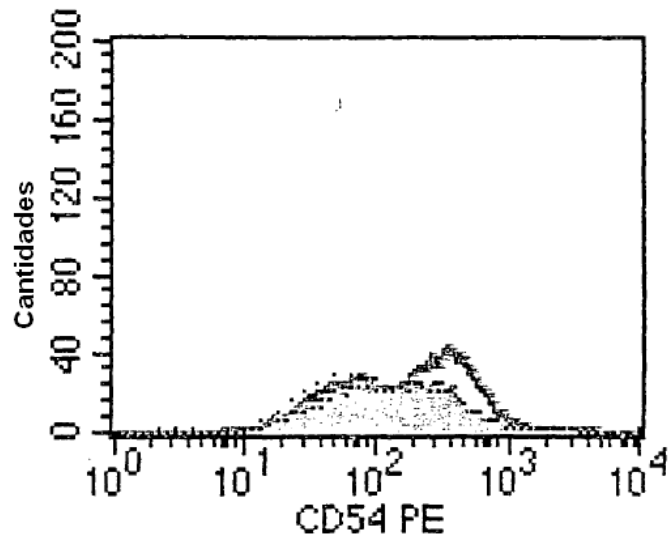


FIGURA 4



FIGURA 5



Leyenda	Nombre	Parámetro	Entrada
—	paf 1.004	FL2-H	No Entrada
.....	CM.002	FL2-H	No Entrada
-----	P1-PC IgM.015	FL2-H	No Entrada