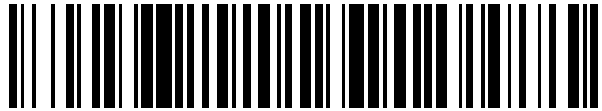


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 571**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2006 E 06838022 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1955078**

54 Título: **Ensayos de agregación plaquetaria**

30 Prioridad:

17.11.2005 US 737488 P
15.06.2006 US 804843 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2013

73 Titular/es:

BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE, MA 02142, US

72 Inventor/es:

HSU, YEN-MING y
SU, LIHE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 425 571 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

Ensayos de agregación plaquetaria

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en parte, a métodos para determinar la agregación plaquetaria, a métodos para determinar la propensión a la coagulación por administración de un anticuerpo anti-CD40L y a kits relacionados con dicho anticuerpo.

Antecedentes de la invención

10 Se han observado complicaciones tromboembólicas (abreviadamente en lo sucesivo TEC, por la expresión inglesa *Tromboembolic Complications*) en algunas pruebas clínicas del anticuerpo anti-CD40L (CD40L es la abreviatura del ligando de CD40, también conocido como CD154), en particular, el anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD40L. Sabiendo que es expresado por los linfocitos T activados, se demostró también que el CD40L, estaba presente en la superficie de las plaquetas humanas activadas y puede desempeñar un papel en la activación celular endotelial *in vitro* (Henn et al., *Nature*, 1998, 391, 591-594). Sin embargo, está todavía sin definir el papel de la vía CD40/CD40L en la regulación de la coagulación *in vivo* al nivel de la interacción plaquetas/células endoteliales.

15 El CD40L es una proteína de membrana de tipo II para la que se describió primeramente que se expresaba en linfocitos T activados. La interacción de CD40L con su receptor, CD40, es crítica para la diferenciación y proliferación de los linfocitos B y el cambio de isotipo de inmunoglobulinas (Ig) inducido por linfocitos T auxiliares (Foy et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 1996, 14, 591-617; y van Kooten et al., *J. Leukoc. Biol.*, 2000, 67, 2-17). La implicación de la vía CD40/CD40L en la interacción de plaquetas con células endoteliales ha sido descrita recientemente (Henn et al., *Nature*, 1998, 391, 591-594). En condiciones normales, el CD40L es almacenado en las plaquetas. Por activación, el CD40L se transloca a la superficie de las plaquetas acompañado por la aparición en la superficie de CD63, selectina P y otras diversas proteínas, así como la liberación de mediadores solubles desde los gránulos intra-plaquetarios (Murano G. *Basic Concepts of Hemostasis and Thrombosis*, 1980, Boca Raton, FL, CRC Press, Inc.). Por tanto, el CD40L puede desempeñar un papel en la actividad procoagulante.

25 Se han encontrado niveles elevados de CD40L soluble (sCD40L) en la sangre de pacientes que padecen lupus (Kato et al., *J.Clin. Invest.*, 1999, 104, 947-955; y Vakkalanka et al., *Arthritis Rheum.*, 1999, 42, 871-881). El factor reumatoide (abreviadamente en lo sucesivo RF, por la expresión inglesa *Rheumoid Factor*), un auto-anticuerpo para la porción Fc de Ig, se detecta frecuentemente en los sueros de pacientes con trastornos autoinmunitarios (Mageded et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, 815, 296-311). Adicionalmente, la administración del anticuerpo anti-CD40L podría dar como resultado la producción de anticuerpos dirigidos contra el anticuerpo anti-CD40L.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona métodos *in vitro* para ensayar la agregación plaquetaria, que comprenden poner en contacto las plaquetas con un agente activador de plaquetas, poner en contacto las plaquetas activadas con un anticuerpo anti-CD40L y poner en contacto las plaquetas activadas con un agente de reticulación, en donde la agregación se cuantifica por sedimentación de las plaquetas. El anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación no son un complejo inmunitario preformado. El agente activador de las plaquetas se selecciona de adenosina-difosfato (ADP), colágeno, trombina, tromboxano, elastasa de neutrófilos, selectina P y convulxina. Las plaquetas se pueden obtener de plasma rico en plaquetas (PRP). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40L es hu5c8. El agente de reticulación se selecciona de CD40L soluble (sCD40L), anticuerpo anti-IgG humana, anticuerpo anti-HFc, RF, célula accesoria positiva al receptor de Fc, proteína A soluble y receptor de Fc humano soluble, La relación entre anticuerpo anti-CD40L y sCD40L, puede ser de 1:1000 a 1000:1, de 1:500 a 500:1 o 3:2.

45 La presente invención también proporciona métodos *in vitro* para determinar si un ser humano es propenso a la coagulación por administración de un anticuerpo anti-CD40L, que comprenden poner en contacto plaquetas retiradas de un ser humano con un agente activador de plaquetas, poner en contacto las plaquetas activadas con el anticuerpo anti-CD40L, poner en contacto las plaquetas activadas con un agente de reticulación y determinar la presencia o ausencia de agregación plaquetaria, en donde una agregación plaquetaria de 70% o mayor es indicativa de propensión a la coagulación. El anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación no son un complejo inmunitario preformado. El agente activador de plaquetas se selecciona de ADP, colágeno, trombina, tromboxano, elastasa de neutrófilos, selectina P y convulxina. Las plaquetas se pueden obtener de plasma rica en plaquetas (PRP). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40L es hu5c8. El agente de reticulación se selecciona de sCD40L, anticuerpo anti-IgG humana, anticuerpo anti-HFc, RF, célula accesoria positiva al receptor de Fc, proteína A soluble y receptor Fc humano soluble, La relación entre anticuerpo anti-CD40L y sCD40L, puede ser de 1:1000 a 1000:1, de 1:500 a 500:1 o 3:2.

55 La presente invención también proporciona kits que comprenden un agente activador de plaquetas, un agente de reticulación, y un anticuerpo anti-CD40L. El agente activador de plaquetas se selecciona de ADP, colágeno, trombina, tromboxano, elastasa de neutrófilos, selectina P y convulxina. El anticuerpo anti-CD40L puede ser hu5c8. El agente de reticulación se selecciona de sCD40L, anticuerpo anti-IgG humana, anticuerpo anti-HFc, RF, célula acce-

soria positiva al receptor de Fc, proteína A soluble y receptor de Fc humano soluble, El kit puede comprender además al menos uno de una aguja, un recipiente para alojar sangre, un recipiente para alojar componentes de ensayo e instrucciones. En algunas realizaciones, el recipiente para alojar los componentes de ensayo es una cubeta.

La presente invención y sus realizaciones se exponen en las reivindicaciones anexas.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los trazados producidos por el aparato perfilador de agregación plaquetaria BioData de 4 canales que representan los porcentajes de luz transmitida a través de las muestras en comparación con el control de PRP. Los trazados se terminan cuatro minutos después de la adición de cantidades sub-óptimas de ADP, y el valor final se considera que es el porcentaje de plaquetas agregadas. Se lleva a cabo una titulación con ADP para determinar la concentración sub-óptima de ADP para cada muestra de PRP.

La Figura 2 muestra que las plaquetas activadas expresan CD40L en la superficie. Se incubaron plaquetas humanas con o sin ADP 10 μM durante 1, 10, 20, 40 o 60 minutos. Como el CD40L en la superficie de las plaquetas es capaz de interactuar con el anticuerpo anti-CD40L biotinilado, se cuantificó por transferencia Western el aumento de la activación inducida del CD40L en la superficie de las plaquetas para el anticuerpo anti-CD40L biotinilado asociado con las plaquetas activadas.

La Figura 3 muestra que la agregación plaquetaria es afectada por los complejos de anticuerpo anti-CD40L y sCD40L. El PRP se obtuvo de diez donantes sanos. El anticuerpo anti-CD40L y sCD40L se mezclaron al menos 20 minutos antes de la adición al PRP. Se realizó una titulación para cada donante para determinar una concentración de ADP que producía la agregación sub-óptima. La agregación se indujo usando la concentración sub-óptima de ADP. Cada punto indica el resultado de una persona.

La Figura 4 muestra que la agregación plaquetaria es potenciada específicamente por complejos del anticuerpo anti-CD40L y sCD40L recombinante. El PRP se obtuvo de un individuo sano. La agregación se indujo con ADP 0,75 μM , que se determinó que era la sub-óptima para este donante. El anticuerpos anti-CD40L, hIgG, y anticuerpo el anti-CD40L aglicosilado se evaluaron a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sCD40L a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El anticuerpo anti-CD40L o hIgG se mezclaron con sCD40L recombinante durante no menos de 20 minutos antes de la adición a la cubeta que contenía PRP. Las barras representan los valores medios y las desviaciones típicas de dos puntos de datos.

Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona métodos *in vitro* de ensayo de agregación plaquetaria, métodos para determinar si un ser humano es propenso a la coagulación por administración de un resto de unión a CD40L y a kits que se pueden utilizar en estos métodos.

En algunas realizaciones, las plaquetas se obtienen de un mamífero, tal como un ser humano. Las plaquetas pueden estar presentes en el PRP obtenido de un ser humano. Adicionalmente, las plaquetas pueden ser aisladas del PRP si así se desea. Las plaquetas o el PRP se pueden obtener de un ser humano antes de la administración de un resto de unión a CD40L, es decir, un anticuerpo anti-CD40L, para determinar, por ejemplo, si el ser humano está en riesgo de coagulación o agregación plaquetaria por administración del resto de unión a CD40L. La sangre se puede obtener de seres humanos por técnicas ampliamente conocidas. El PRP se puede separar de los componentes celulares mediante técnicas de separación comúnmente usadas, que incluyen, por ejemplo, centrifugación y similares. Una preparación típica de plaquetas se describe en el Ejemplo 2 más adelante. La purificación en columna de filtración en gel de Sepharose está descrita por Fine et al., *Am. J. Pathol.*, 1976, 84,11-24, y en el Ejemplo 3 más adelante.

Las plaquetas o el PRP se ponen en contacto con un agente activador de plaquetas. Como se usa en esta memoria, la frase "agente activador de plaquetas" significa ADP, colágeno, trombina, tromboxano (por ejemplo, TxA2), elastasa de neutrófilos humanos (abreviadamente en lo sucesivo HNE por la expresión inglesa *Human Neutrophil Elastase*), selectina P o convulxina que se pueden usar para activar sub-óptimamente una plaqueta. Se desea la activación subóptima de las plaquetas con el fin poder discernir la agregación causada por el resto de unión a CD40L. Por ejemplo, las plaquetas se pueden poner en contacto con una cantidad de un agente activador de plaquetas para inducir un cantidad umbral o sub-óptima de agregación plaquetaria. Esta cantidad de agregación plaquetaria debe ser inferior a la cantidad de agregación inducida por el resto de unión a CD40L y puede variar desde una agregación de 0% hasta una agregación inferior a 70% o cualquiera de sus sub-intervalos.

Como se usa en la presente memoria, la frase "resto de unión a CD40L" es un anticuerpo anti-CD40L. Como se usa en la presente memoria, la frase "anticuerpo anti-CD40L" significa cualquier anticuerpo o sus fragmentos o mutantes, que sea capaz de unirse a CD40L y/o a sCD40L y que también sea capaz de interactuar funcionalmente con el receptor de Fc. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40L comprende una región Fc completamente intacta. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD40L comprende una región Fc completamente intacta pero modificada, en la que la modificación no interfiere con la unión y/o señalización del receptor de Fc. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD40L comprende una región Fc mutante y/o acortada, en donde la mutación y/o el acortamiento no interfieren con la unión y/o la señalización del receptor de Fc. Los anticuerpos anti-CD40L son bien

conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el hu5c8. Anticuerpos anti-CD40L adicionales incluyen, aunque sin limitación M90, M91, M92, IDEC 131, y anti-CD154 de AnCell (también conocido como 24-31), así como los que se describen en Gray et al., *Seminars in Immunol*, 1994, 6, 303-310 y Noelle, *Immunity*, 1996, 4, 415-419. Además, CD40-Fc es un reactivo capaz de reticulación con CD40L.

5 Las plaquetas también se ponen en contacto con un agente de reticulación. Como se usa en la presente memoria la frase "agente de reticulación" significa sCD40L, anticuerpos anti IgG humana, anticuerpo anti-hFc, RF, células accesorias positivas para el receptor de Fc, proteína A soluble o los receptores de Fc humanos solubles (tales como FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn) que se pueden usar para reticular los restos de unión a CD40L. La relación entre el resto de unión a CD40L y sCD40L, por ejemplo, es de 1:1000 a 1000:1, de 500:1 a 1:500, de 1:100 a 100:1, de 1:10 a 10:01 o 3:02.

Al poner en contacto las plaquetas con un agente activador de plaquetas, el resto de unión a CD40L y un agente de reticulación, la sedimentación de las plaquetas es indicativa de la agregación plaquetaria. La falta de sedimentación de plaquetas es indicativa de una falta de agregación plaquetaria. En algunas realizaciones, se puede utilizar un control negativo, o blanco, para establecer una cantidad de línea base o umbral de agregación plaquetaria. Se puede analizar una muestra de ensayo que contiene plaquetas, agente activador de plaquetas, resto de unión a CD40L y agente de reticulación para determinar la cantidad de agregación plaquetaria, y compararla con la agregación plaquetaria en la línea base. Cualquier diferencia en la cantidad de agregación plaquetaria entre la muestra de ensayo y el control negativo puede ser indicativa de agregación plaquetaria en la muestra de ensayo. El ensayo puede llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado para alojar los componentes del ensayo, tales como, por ejemplo, un tubo de ensayo, un tubo de microcentrífuga o una cubeta.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona métodos para determinar si un ser humano es propenso a la coagulación por administración de un resto de unión a CD40L. Como se ha establecido anteriormente, se han observado complicaciones tromboembólicas, incluyendo la coagulación, por administración de un anticuerpo anti-CD40L a un ser humano. Por lo tanto, en algunos casos, es deseable determinar si un ser humano que tenga previsto recibir un anticuerpo anti-CD40, o cualquier otro resto de unión a CD40L, es propenso a desarrollar esas complicaciones tras el tratamiento.

La agregación plaquetaria, y su presencia o ausencia, se pueden determinar por numerosos medios conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la sedimentación de plaquetas, que es una indicación de la agregación plaquetaria, puede ser monitorizada como se describe en los Ejemplos más adelante. La cantidad de agregación plaquetaria puede variar de una muestra a otra dependiendo, por ejemplo, del resto de unión a CD40L y de las plaquetas propiamente dichas. Cuando la cantidad de agregación plaquetaria es 70% o mayor, o 75% o mayor, u 80% o mayor, u 85% o mayor, o 90% o mayor o 95% o mayor, es indicativa de propensión a la coagulación y/o complicaciones tromboembólicas. Un ser humano, que tiene previsto recibir tratamiento con un anticuerpo anti-CD40L, por ejemplo, y que da positivo en los ensayos (es decir, tiene una agregación plaquetaria mayor que 70% en el método de ensayo descrito en la presente memoria (es decir, el ser humano es propenso a la coagulación) puede considerar regímenes terapéuticos alternativos. En efecto, los profesionales sanitarios pueden ofrecer terapias alternativas tras recibir un resultado particular en los ensayos descritos en la presente memoria.

Con el fin de que la invención descrita en esta memoria puede ser entendida de manera más eficaz, se proporcionan a continuación ejemplos. Se debe entender que estos ejemplos son solamente para fines ilustrativos y que de ninguna manera deben interpretarse como limitativos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Reactivos

Se prepararon el anticuerpo anti-CD40L de calidad investigación, sCD40L recombinante y la proteína de fusión CD40-IgG1-Fc (CD40-Fc) recombinante soluble en laboratorios de Biogen (Ferrant et al., *Mol. Immunol.*, 2002, 39, 77-84). La IgG humana de control era una IgG1 kappa humana adquirida a Protos Immunoresearch (San Francisco, CA). El anticuerpo para la región Fc de la IgG humana (anti-hFc) era un anti-IgG Fc humana, de ratón purificada por afinidad (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Rb779 es un antisuero de conejo generado contra un péptido derivado del extremo C-terminal de CD40L (Garber et al., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 33545-33550).

Ejemplo 2: Preparación de plasma rico en plaquetas (PRP) y recuperación de plaquetas

50 Todas las plaquetas usadas en los experimentos de agregación plaquetaria *in vitro* se aislaron de voluntarios humanos sanos a los que se les negó la ingestión de aspirina o compuestos que contuvieran aspirina durante 10 días. Los ensayos de agregación se realizaron en PRP. Se recogieron aproximadamente 50 mL de sangre completa en partes alícuotas en tubos *Vacutainer* de 4,5 ml que contenían 0,5 ml de citrato de sodio al 3,8%. El PRP se preparó centrifugando la sangre anticoagulada a 200 g durante 10 minutos y recogiendo el líquido sobrenadante.

Ejemplo 3: Transferencia Western

La transferencia Western para CD40L se realizó en las plaquetas purificadas preparadas como sigue. Se recogió en

partes alícuotas un total de 50 mL de sangre completa en tubos *Vacutainer* de 4,5 mL que contenían 0,5 mL de citrato de sodio al 3,8%. El PRP se preparó centrifugando la sangre durante 20 minutos a 180 g. El líquido sobrenadante de PRP recogido se cargó en una columna de filtración en gel CL2B con Sepharose (Pharmacia, Peapack, New Jersey), previamente equilibrada con dos volúmenes de columna de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las plaquetas se eluyeron y lavaron con PBS. Se realizó una transferencia Western para cuantificar la cantidad de CD40L presente en las plaquetas. Brevemente, las plaquetas se trataron con tampón de muestra Laemmli y las proteínas se resolvieron por electroforesis a través de un gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida en gradiente (Laemmli, *Nature*, 1970, 227, 680-685). Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa (Towbin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1979, 76, 4350-4354) y la membrana se transfirió con Rb779, un antisuero de conejo producido contra un péptido derivado del extremo C-terminal de la proteína CD40L humana (Garber et al., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 33545-33550). El anticuerpo unido se detectó por un antisuero anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (HRP). Las diluciones en serie de sCD40L recombinante se evaluaron en paralelo con las muestras de proteína derivadas de las plaquetas. La cantidad de CD40L en las muestras de plaquetas se estimó por comparación con el patrón de sCD40L recombinante.

Las plaquetas se incubaron con un anticuerpo anti-CD40L conjugado con biotina para determinar si CD40L estaba presente en la superficie de las plaquetas. El PRP se incubó con o sin ADP 10 µM durante 1, 10, 20, 40 o 60 minutos y después se incubó con anticuerpo anti-CD40L conjugado con biotina. El anticuerpo no unido se eliminó de las plaquetas por lavado con PBS. La cantidad de anticuerpo anti-CD40L unido a las plaquetas se determinó por transferencia Western utilizando estreptavidina conjugada con HRP. La unión específica del anticuerpo anti-CD40L conjugado con biotina a las plaquetas fue verificada por pre-incubación del anticuerpo con sCD40L recombinante.

Ejemplo 4: Ensayo de agregación plaquetaria

El aparato perfilador de agregación plaquetaria Biodata de 4 canales (PAP-4; Biodata Corp., Hatboro, PA) se usó para el ensayo en blanco con una cubeta que sólo contenía plasma pobre en plaquetas (PPP). Se añadió una parte alícuota de 350 µL de PRP, que contenía aproximadamente $2 \text{ a } 5 \times 10^8$ plaquetas/mL a una cubeta que contenía una barra de agitación. Se añadieron anticuerpo anti-CD40L, IgG humana, suero humano normal, CD40-Fc o anti-hFc en un volumen total de 100 µL. La cubeta cargada se colocó en la máquina y los componentes de la reacción se mezclaron antes de la adición de ADP.

La agregación se inició con la adición de una concentración sub-óptima de ADP en 50 µL (la concentración final varía para cada muestra individual). El perfilador de agregación tiene cuatro puertos, que pueden funcionar simultáneamente. Se generó un trazado de agregación para cada muestra durante cuatro minutos después de la adición de ADP. Al final del trazado, el instrumento calcula el porcentaje de agregación mediante la comparación de la transmisión de luz a través de la muestra con la transmisión de luz a través de material del ensayo en blanco PPP. Un trazado representativo de una titulación típica de ADP se muestra en la Figura 1. Se llevó a cabo una titulación al comienzo de cada experimento, y las operaciones posteriores se realizaron a una concentración de ADP sub-óptima.

Ejemplo 5: Expresión de CD40L en la superficie de plaquetas activadas

La expresión de CD40L se detectó fácilmente en lisados preparados a partir de plaquetas humanas (datos no mostrados). Para determinar si CD40L se expresa en plaquetas en reposo y/o activadas, se incubaron plaquetas con anticuerpo anti-CD40L conjugado con biotina y se determinó la presencia de CD40L en la superficie mediante la cuantificación del anticuerpo anti-CD40L biotinilado unido. La expresión de CD40L en la superficie se evaluó después de 1, 10, 20, 40 y 60 minutos de incubación con o sin ADP 10,0 µM. La expresión de CD40L en la superficie era detectable en las plaquetas activadas con ADP tan pronto como un minuto después de la activación y aumentó con el tiempo (Figura 2). La unión de anticuerpo anti-CD40L conjugado con biotina es específica para CD40L, puesto que la preincubación de anticuerpo anti-CD40L conjugado con biotina con sCD40L inhibía la unión a las plaquetas activadas (datos no mostrados). La cantidad de CD40L en la superficie detectada en plaquetas no activadas ("en reposo") también aumentó con el tiempo. Este fenómeno es probablemente atribuible al nivel basal de la activación plaquetaria en nuestras condiciones experimentales.

Sin embargo, la cantidad de CD40L en la superficie expresada en las plaquetas por tratadas con ADP fue consistentemente más alta que la de los controles no tratados equivalentes. Estos resultados son consistentes con la noción de que CD40L está normalmente secuestrado en el interior de las plaquetas y es translocado a la superficie por activación. Además, la unión del anticuerpo anti-CD40L conjugado con biotina confirma que el anticuerpo anti-CD40L reconoce las moléculas de CD40L presentes en la superficie de las plaquetas.

Ejemplo 6: Estimación de la cantidad de CD40L en el compartimento plaquetario

Puesto que CD40L expresado en la superficie de plaquetas activadas puede ser reconocido por el anticuerpo anti-CD40L, es importante estimar el tamaño de este "sumidero" potencial para el anticuerpo anti-CD40L. Usando un método de transferencia Western, se comparó la cantidad de CD40L en plaquetas con cantidades conocidas de un patrón de CD40L recombinante. Se estima que la cantidad de CD40L en un millón de plaquetas es aproximadamente 80 pg. Cada mililitro de sangre extraída recientemente contiene aproximadamente 300 millones de plaquetas y una persona normal tiene un volumen total de sangre de aproximadamente 5 L. Por cálculo, en un individuo normal

están presentes aproximadamente 120 µg de CD40L en el compartimento plaquetario.

Ejemplo 7: Efecto del anticuerpo anti-CD40L de calidad de investigación sobre la agregación plaquetaria

Para determinar si la interacción del anticuerpo anti-CD40L con CD40L expresado en plaquetas activadas influye sobre la cascada hemostática, se examinó la agregación de plaquetas de seres humanos sanos en presencia de anticuerpo anti-CD40L de calidad de investigación. El anticuerpo anti-CD40L de calidad de investigación no afectaba la agregación de plaquetas activadas con ADP en un amplio intervalo de concentraciones de ADP (Tablas 1 a 3). Las plaquetas en reposo tampoco se vieron afectadas por el anticuerpo anti-CD40L (Tablas 1 y 3-5). Como se esperaba, el anticuerpo IgG humano de control (Tabla 2 y 3) no afectaba a la agregación plaquetaria. Se evaluó CD40-Fc para determinar si la unión de una proteína receptora dímera al CD40L expresado en la superficie de plaquetas influiría sobre la agregación. El CD40-Fc no afectaba a la agregación plaquetaria (Tabla 4).

Ejemplo 8: Efecto del anticuerpo anti-CD40L reticulado sobre la agregación plaquetaria

Anticuerpo anti-CD40L reticulado por anticuerpos

Para determinar si se produce un efecto sobre la agregación cuando el anticuerpo anti-CD40L es reticulado por un anticuerpo específico para la región Fc de IgG, se trataron plaquetas activadas y en reposo con anticuerpo anti-CD40L con o sin anti-hFc como agente de reticulación. Se realizó un experimento en el que los efectos del anticuerpo anti-CD40L reticulado se titularon cruzadamente con cantidades variables de ADP y anti-hFc (Tabla 5). La reticulación del anticuerpo anti-CD40L con 20 µg/mL o 6,66 µg/mL de anti-hFc no afectó a la agregación plaquetaria (Tabla 5). Sin embargo, se observó un aumento de la agregación cuando el anticuerpo anti-CD40L se reticuló con 2,22 µg/mL de anti-hFc (Tabla 5, compárense las filas 109 y 110). No se observó dicho efecto potenciador cuando se usó para la activación una concentración menor de ADP (Tabla 5). Las plaquetas no se vieron afectadas por el anticuerpo anti-CD40L en presencia de suero humano normal, que contiene anticuerpos que no se espera que reticulen el anticuerpo anti-CD40L (Tabla 6). Estos resultados sugieren que es posible la potenciación de la agregación plaquetaria por el anticuerpo anti-CD40L reticulado por anticuerpos.

Anticuerpo anti-CD40L reticulado por el ligando de CD40 soluble

Se evaluaron concentraciones múltiples del anticuerpo anti-CD40L y de sCD40L en el ensayo de agregación plaquetaria para determinar si el anticuerpo anti-CD40L reticulado por sCD40L potenciaría la agregación plaquetaria. Basándose en el número de sitios de unión disponibles en sCD40L y el anticuerpo anti-CD40L, el anticuerpo anti-CD40L se reticularía como máximo cuando dos moléculas de sCD40L trímero están unidas a tres moléculas del anticuerpo anti-CD40L divalente. Por cálculo, la relación en peso/peso para una reticulación máxima es teóricamente 3,75 anticuerpos anti-CD40L a 1 sCD40L. Se analizaron varias relaciones en este intervalo, y se encontró empíricamente que 233 µg/mL de anticuerpo anti-CD40L y 30 µg/mL de sCD40L era una condición de reticulación máxima del anticuerpo anti-CD40L. También se evaluaron concentraciones diez veces menores y diez veces mayores del anticuerpo anti-CD40L con 30 µg/mL de sCD40L. Este ensayo se realizó usando PRP preparado de diez donantes sanos. Curiosamente, la mejor agregación se produjo con plaquetas aisladas de algún donante sano, pero no de todos.

La agregación plaquetaria era inducida por el anticuerpo anti-CD40L reticulado al máximo por sCD40L (Figura 3). Una versión aglicosilada del anticuerpo anti-CD40L reticulado por sCD40L no potenció la agregación plaquetaria, lo que indica que el efecto depende de FcγRIIa (Figura 4). La IgG humana (hIgG) de control junto con sCD40L no tenía un efecto sobre la agregación plaquetaria (Figura 4).

Tabla 1: Efecto del anticuerpo anti-CD40L sobre plaquetas activadas con ADP

Muestra nº	BG9588	Concentración de ADP (µM)	% de Agregación
1		20,00	73
2	+	20,00	72
3		6,70	60
4	+	6,70	71
5		2,00	25
6	+	2,00	21
7		0,70	11
8	+	0,70	24
9		0,37	12
10	+	0,37	15
11		0,00	3
12	+	0,00	11

El anticuerpo anti-CD40L no induce la agregación de las plaquetas en reposo ni afecta la agregación de las plaquetas activadas con ADP. Se colocó PRP en una cubeta y se agitó con o sin 5 µg/mL de anticuerpo anti-CD40L de

calidad de investigación. Se añadió ADP hasta las concentraciones finales enumeradas. Para cada muestra se generó un trazado de la agregación de cuatro minutos y se calculó el porcentaje de agregación.

Tabla 2: Efecto del anticuerpo anti-CD40L e IgG sobre plaquetas activadas con ADP

Muestra n°	BG9588	IgG humana	ADP (µM)	% de Agregación
13			20,00	77
14		+	20,00	89
15	+		20,00	80
16			6,70	74
17		+	6,70	75
18	+		6,70	78
19			2,00	10
20		+	2,00	12
21	+		2,00	12
22			0,70	8
23		+	0,70	11
24	+		0,70	10
25			0,37	9
26		+	0,37	10
27	+		0,37	10
28			0,00	3

- 5 El anticuerpo anti-CD40L y una IgG humana de control no afectan a la agregación de plaquetas activadas con ADP. Se colocó PRP en una cubeta y se agitó con o sin 5 µg/mL de anticuerpo anti-CD40L de calidad de investigación o IgG humana. Se añadió ADP hasta la concentración final enumerada. Para cada muestra se generó un trazado de la agregación de cuatro minutos y se calculó el porcentaje de agregación.

Tabla 3: Efecto del anticuerpo anti-CD40L y la IgG sobre plaquetas activadas con ADP

Muestra n°	BG9588	IgG humana	ADP (µM)	% de Agregación
29			0,00	1
30		+	0,00	3
31	+		0,00	3
32			20,00	70
33		+	20,00	68
34	+		20,00	68
35			10,00	64
36		+	10,00	69
37	+		10,00	69
38			5,00	72
39		+	5,00	70
40	+		5,00	67
41			2,50	65
42		+	2,50	57
43	+		2,50	62
44			1,25	13
45		+	1,25	15
46	+		1,25	12
47			0,60	10
48		+	0,60	9
49	+		0,60	10
50			0,30	10
51		+	0,30	10
52	+		0,30	10

- 10 El anticuerpo anti-CD40L y una IgG humana no específica no inducen la agregación de las plaquetas en reposo ni afectan a la agregación de las plaquetas activadas con ADP. Se colocó PRP en una cubeta y se agitó con o sin 5 µg/mL de anticuerpo anti-CD40L de calidad de investigación o IgG humana. Se añadió ADP hasta la concentración final enumerada. Para cada muestra se generó un trazado de la agregación de cuatro minutos y se calculó el porcentaje de agregación.
- 15

Tabla 4: Efecto del anticuerpo anti-CD40L y CD40-Fc sobre plaquetas activadas con ADP

Muestra nº	BG9588 (µg/mL)	CD40lg (µg/mL)	ADP (µM)	% de Agregación
53			0,00	2
54	20,00		0,00	3
55	10,00		0,00	3
56	5,00		0,00	3
57	2,50		0,00	5
58	1,25		0,00	3
59		20,00	0,00	3
60		10,00	0,00	3
61		5,00	0,00	3
62		2,50	0,00	3
63		1,25	0,00	3
64		0,63	0,00	3
65			20,00	84
66			5,00	79
67		10,00	5,00	79
68			2,50	77
69		10,00	2,50	81
70			1,25	61
71		10,00	1,25	64
72			0,60	15
73		10,00	0,60	16

5 La unión del anticuerpo anti-CD40L o CD40-Fc a CD40L sobre la superficie de plaquetas activadas no afecta a la agregación plaquetaria. Se colocó PRP en una cubeta y se agitó con o sin anticuerpo anti-CD40L de calidad de investigación o CD40-Fc a las concentraciones enumeradas. Se añadió ADP hasta la concentración final enumerada. Para cada muestra se generó un trazado de la agregación de cuatro minutos y se calculó el porcentaje de agregación.

Tabla 5: Efecto del anticuerpo anti-CD40L reticulado sobre plaquetas activadas con ADP

Muestra nº	BG9588	Anti-hFc (µg/mL)	ADP (µM)	% de Agregación
98			0,0	2
99			20,0	76
100		20,00	0,0	3
101	+		0,0	3
102	+	20,00	0,0	3
103		20,00	1,0	73
104	+	20,00	1,0	83
105	+	6,66	0,0	3
106		6,66	1,0	80
107	+	6,66	1,0	84
108	+	2,22	0,0	3
109		2,22	1,0	23
110	+	2,22	1,0	76
111	+	20,00	0,0	4
112		20,00	0,5	6
113	+	20,00	0,5	8
114	+	6,66	0,0	3
115		6,66	0,5	8
116	+	6,66	0,5	8
117	+	2,22	0,0	3
118		2,22	0,5	7
119	+	2,22	0,5	8

10 La reticulación del anticuerpo anti-CD40L unido a CD40L sobre la superficie de plaquetas activadas puede potenciar la agregación en condiciones limitadas. Se colocó PRP en una cubeta y se agitó con o sin 2 µg/mL de anticuerpo anti-CD40L de calidad de investigación y/o anti-hFc a la concentración enumerada. Se añadió ADP hasta la concentración final enumerada. Para cada muestra se generó un trazado de la agregación de cuatro minutos y se calculó el

porcentaje de agregación.

Tabla 6: Efecto del suero humano normal sobre plaquetas en reposo

Muestra nº	BG9588	Suero (µg/mL)	% de Agregación
74			2
75		1,0x	8
76		0,2x	7
77		0,04x	5
78		0,008x	5
79		0,0016x	6
80		0,0032x	6
81	+	1,0x	9
82	+	0,2x	6
83	+	0,04x	6
84	+	0,008x	7
85	+	0,0016x	6
86	+	0,0032x	6

- 5 El suero humano normal no afecta a la agregación de plaquetas en reposo. Se colocó PRP en una cubeta y se agitó con o sin 2 µg/mL de anticuerpo anti-CD40L de calidad de investigación y/o suero humano normal a las concentraciones enumeradas. Para cada muestra se generó un trazado de la agregación de cuatro minutos y se calculó el porcentaje de agregación.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para analizar la agregación plaquetaria, que comprende:
poner en contacto plaquetas con un agente activador de plaquetas seleccionado del grupo que consiste en ADP, colágeno, trombina, tromboxano, elastasa de neutrófilos, selectina P y convulxina;
- 5 poner en contacto las plaquetas activadas con un anticuerpo anti-CD40L; y
poner en contacto las plaquetas activadas con un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en sCD40L, anticuerpo anti-IgG humana, anticuerpo anti-hFc, factor reumatoide (RF), célula accesoria positiva al receptor de Fc, proteína A soluble y receptor de Fc humano soluble,
- 10 en donde el anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación no son un complejo inmunitario preformado y en donde las plaquetas sedimentadas son indicativas de la agregación de las plaquetas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el agente activador de plaquetas es ADP.
3. El método de la reivindicación 1, en donde las plaquetas se obtienen de plasma rico en plaquetas.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CD40L es hu5c8.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en donde el agente de reticulación se selecciona de sCD40L, anticuerpo anti-IgG humana y anticuerpo anti-hFc.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la relación entre el anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación es de 1:1000 a 1000:1.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la relación entre el anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación es de 1:500 a 500:1.
- 20 8. El método de la reivindicación 1, en donde la relación entre el anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación es 3:2.
9. El método de la reivindicación 1, en donde:
el agente activador de plaquetas es ADP; y
el agente de reticulación es sCD40L o anticuerpo anti-hFc.
- 25 10. Un método *in vitro* para determinar si un ser humano es propenso a la coagulación por administración de un anticuerpo anti-CD40L, que comprende:
poner en contacto plaquetas extraídas del ser humano con un agente activador de plaquetas seleccionado del grupo que consiste en ADP, colágeno, trombina, tromboxano, elastasa de neutrófilos, selectina P y convulxina;
poner en contacto las plaquetas activadas con el anticuerpo anti-CD40L; y
- 30 poner en contacto las plaquetas activadas con un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en sCD40L, anticuerpo anti-IgG humana, anticuerpo anti-hFc, factor reumatoide (RF), célula accesoria positiva al receptor de Fc, proteína A soluble y receptor de Fc humano soluble, en donde el anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación no son un complejo inmunitario preformado; y
- 35 determinar la presencia o ausencia de agregación plaquetaria, en donde una agregación plaquetaria de 70% o mayor es indicativa de la propensión a la coagulación.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el agente activador de plaquetas es ADP.
12. El método de la reivindicación 10, en donde las plaquetas se obtienen de plasma rico en plaquetas.
13. El método de la reivindicación 10, en donde el anticuerpo anti-CD40L es hu5c8.
- 40 14. El método de la reivindicación 10, en donde el agente de reticulación se selecciona de sCD40L, anticuerpo anti-IgG humana y anticuerpo anti-hFc.
15. El método de la reivindicación 10, en donde la relación entre el anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación es de 1:1000 a 1000:1.
16. El método de la reivindicación 10, en donde la relación entre el anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación es de 1:500 a 500:1.

17. El método de la reivindicación 10, en donde la relación entre el anticuerpo anti-CD40L y el agente de reticulación es 3:2.
18. El método de la reivindicación 10, en donde:
- el agente activador de plaquetas es ADP; y
- 5 el agente de reticulación es sCD40L o anticuerpo anti-hFc.
19. Un kit que comprende un agente activador de plaquetas seleccionado del grupo que consiste en ADP, colágeno, trombina, tromboxano, elastasa de neutrófilos, selectina P y convulxina; un anticuerpo anti-CD40L; y un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en sCD40L, anticuerpo anti-IgG humana, anticuerpo anti-hFc, factor reumatoide (RF), célula accesoria positiva al receptor de Fc, proteína A soluble y receptor de Fc humano soluble.
- 10 20. El kit de la reivindicación 19, en donde el agente activador de plaquetas es ADP.
21. El kit de la reivindicación 19, en donde el anticuerpo anti-CD40L es hu5c8.
22. El kit de la reivindicación 19, en donde el agente de reticulación se selecciona de sCD40L, anticuerpo anti-IgG humana y anticuerpo anti-hFc.
- 15 23. El kit de la reivindicación 19, que comprende además al menos una aguja, un recipiente para alojar sangre, un recipiente para alojar los componentes del ensayo e instrucciones.
24. El kit de la reivindicación 23, en donde el recipiente para alojar los componentes de ensayo es una cubeta.

	Pendiente	Agregación
1 4 μm ADP	43	88%
2 2 μm ADP	38	90%
3 1 μm ADP	23	58%
4 0.5 μm ADP	12	06%

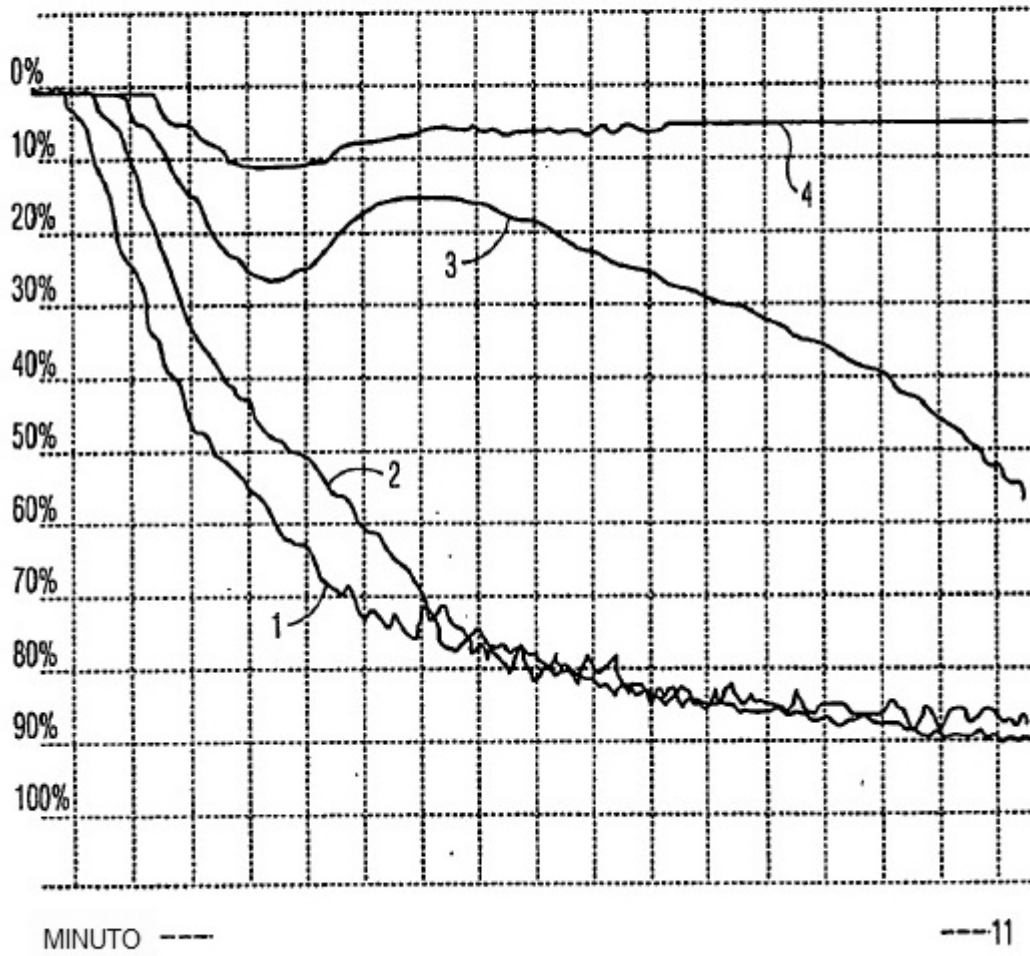


FIG. 1

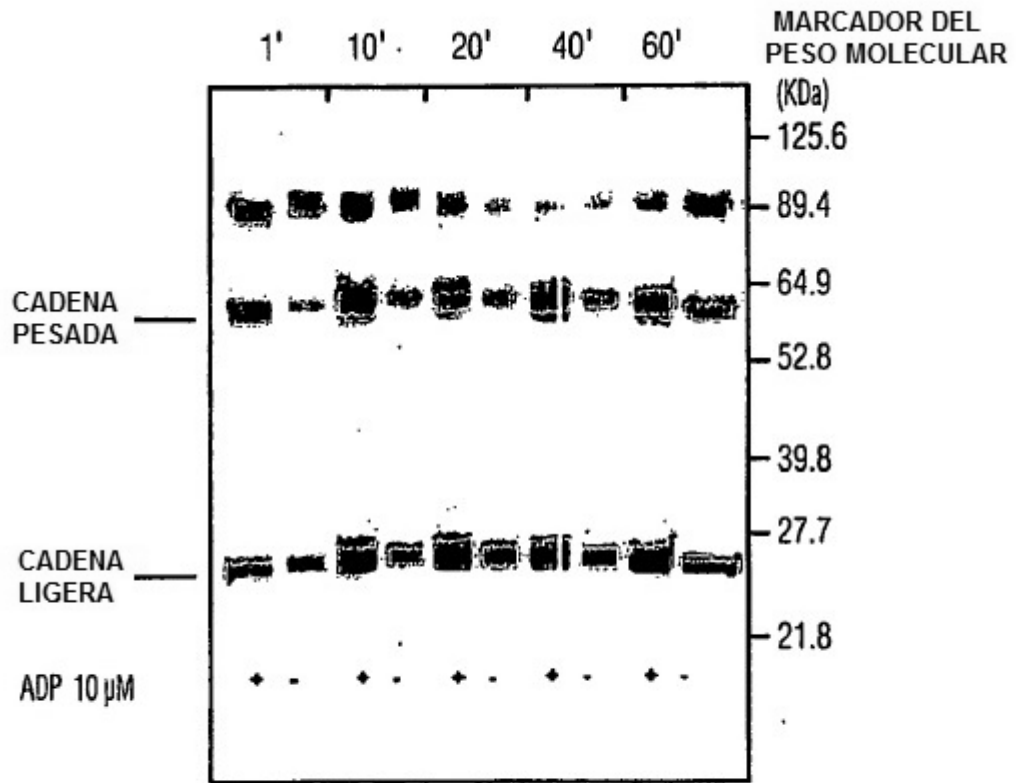


FIG. 2

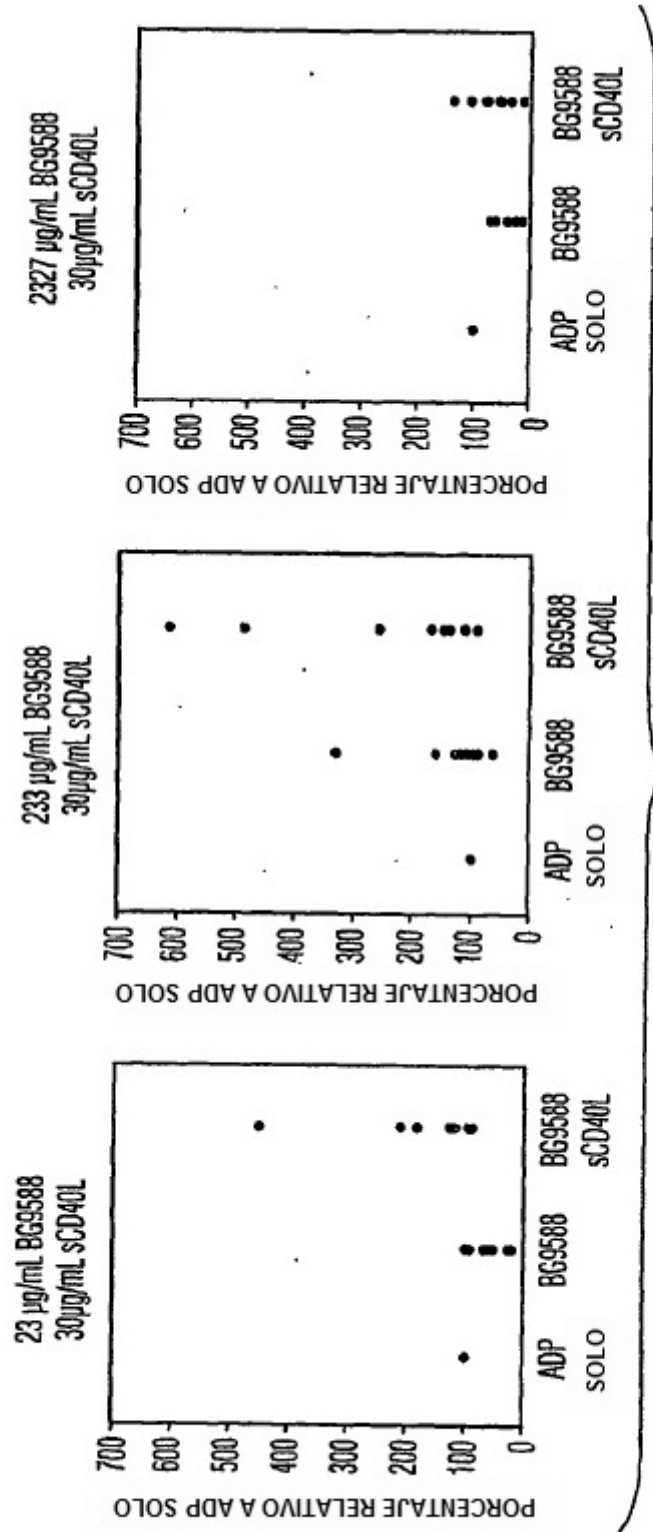


FIG. 3

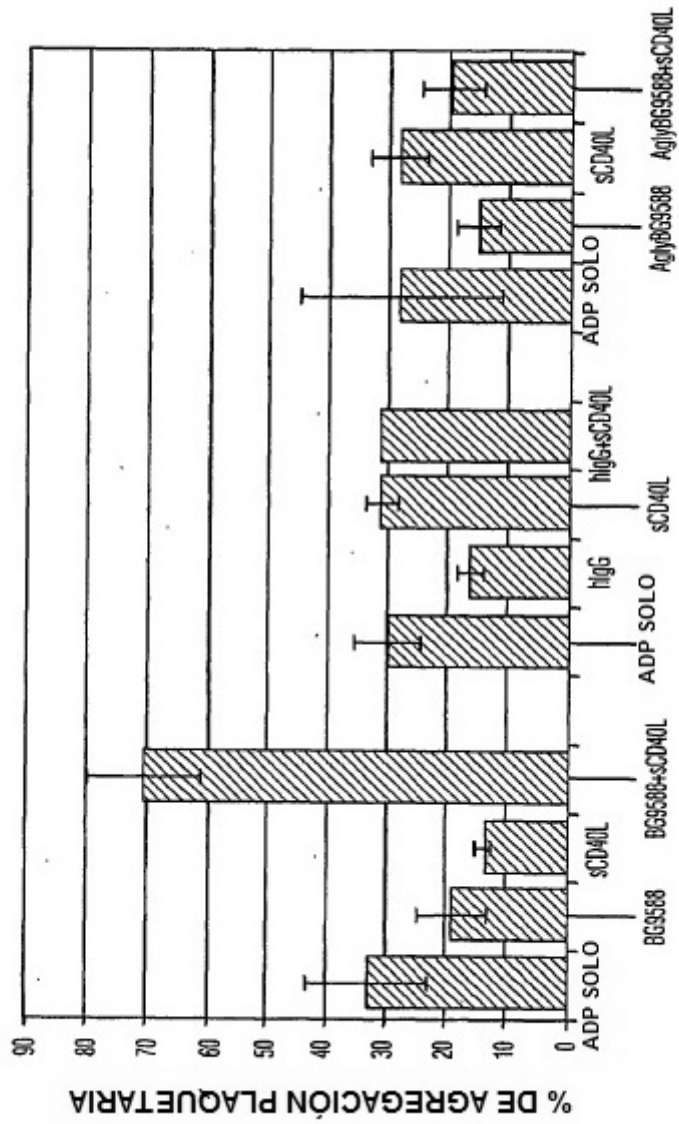


FIG. 4