

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 470**

51 Int. Cl.:

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2010 PCT/US2010/055997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11057250**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2010 E 10829274 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2499494**

54 Título: **Reactivos y métodos para detectar glóbulos blancos asociados a HPN de tipo II y su identificación como factores de riesgo para trastornos trombóticos**

30 Prioridad:

09.11.2009 US 280897 P

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

19.07.2017

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.. (100.0%)
352 Knotter Drive
Cheshire, CT 06410, US**

72 Inventor/es:

**MOVALIA, MAYUR;
ILLINGWORTH, ANDREA;
FAAS MCKNIGHT, SUSAN y
ROTHER, RUSSELL, P.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 625 470 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

Reactivos y métodos para detectar glóbulos blancos asociados a HPN de tipo II y su identificación como factores de riesgo para trastornos tromboticos

5

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/280.897, presentada el 9 de noviembre de 2009 y titulada "Reactivos y métodos para detectar células asociadas a HPN de tipo II".

10

Listado secuencial

La presente solicitud contiene un listado secuencial que se ha presentado a través de la EFS-Web y se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 5 de noviembre de 2010, es designada ALXN150WO1.txt, y tiene un tamaño de 26.000 bytes.

15

Campo técnico

20

El campo de la invención es la medicina, la inmunología, la biología molecular, y la química proteica.

Antecedentes

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad rara, debilitante que se caracteriza por, entre otras cosas, hematopoyesis anormal, hemólisis intravascular mediada por el complemento, y una propensión a la trombosis. Véanse, por ejemplo, Rosse y Nishimura (2003) *Int J Hematol* 77(2): 121-124 y Brodsky (2008) *Blood Rev* 22(2):65-74. La HPN es causada por una mutación somática en el gen en el grupo de complementación del glicano fosfatidilinositol de clase A (PIGA) ligado al cromosoma X, que codifica una enzima que es necesaria para la etapa inicial de la biosíntesis de un anclaje tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI). Véanse Miyata *et al.* (1993) *Science* 259:1318-1320 y Bessler *et al.* (1994) *EMBO J* 13:110-117. Los anclajes GPI unen un número de proteínas a la superficie de las células hematopoyéticas. Estas llamadas proteínas ancladas a GPI incluyen, entre otros, proteínas reguladoras del complemento, tales como CD55 (DAF) y CD59. En función del tipo de mutación que acontece al gen PIGA, puede producirse una pérdida parcial o completa de la biosíntesis de un anclaje tipo GPI, que corresponde a una pérdida parcial o completa en presencia de proteínas ancladas a GPI (por ejemplo, CD55 y CD59 ancladas a GPI) en la superficie celular. Véase Rosse (1997) *Medicine* 76:63-93. La ausencia parcial o completa de las proteínas reguladoras del complemento en la superficie de los glóbulos rojos (GRs) da lugar a una gran sensibilidad de estas células para la lisis mediada por el complemento y los síntomas asociados a HPN en los pacientes afectados. Véanse Nicholson-Weller *et al.* (1983) *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 80:5066-5070 y Yamashina *et al.* (1990) *N Engl J Med* 323:1184-1189.

25

30

35

40

Tradicionalmente, el diagnóstico de HPN y la supervisión de los pacientes con HPN conllevan el análisis de la expresión de CD55 y CD59 en la superficie de los GRs y los granulocitos utilizando citometría de flujo. Sutherland *et al.* (2009) *Am J Clin Pathol* 132:564-572. Los métodos de diagnóstico desarrollados más recientemente para HPN han empleado una forma no lítica, recombinante de la proteína bacteriana aerolisina, que se une a los anclajes tipo GPI en la superficie de las células hematopoyéticas. Véase la patente de Estados Unidos n.º 6.593.095, otorgada a Buckley y Brodsky. Los métodos tanto tradicionales como nuevos han permitido a los profesionales sanitarios clasificar los GRs o los glóbulos blancos de pacientes con HPN en uno de los tres grupos: células de *tipo I* que tienen una expresión de las proteínas ancladas a GPI en la superficie celular normal o casi normal; células de HPN de *tipo III*, que tienen una expresión de las proteínas ancladas a GPI en la superficie celular inexistente o completamente ausente; y células de HPN de *tipo II* que tienen un nivel intermedio de la expresión de las proteínas ancladas a GPI en la superficie celular. Brodsky *et al.* (2000) *Am J Clin Pathol* 114:459-466. La caracterización de las células de tipo II entre los linajes de glóbulos blancos no se ha realizado debido a la dificultad de distinguir estas células de los glóbulos blancos de tipo I normal.

45

50

55

Sumario

La divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento por parte de los inventores en que los pacientes que tienen una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II de al menos 1,2 % o una población de glóbulos rojos de HPN de tipo II de al menos 0,02 % son más propensos a tener trombocitopenia en comparación con los pacientes que no tienen poblaciones celulares de HPN de tipo II o que tienen poblaciones celulares de HPN de tipo II que son más pequeñas a 1,2 % o 0,02 % de glóbulos blancos y rojos, respectivamente. Los pacientes con trombocitopenia resultante de la destrucción de plaquetas son mucho más propensos a desarrollar trombosis, y entre los pacientes con HPN, la trombosis es la principal causa de muerte. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para predecir si un paciente aquejado de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, el método comprende:

60

65

la determinación del porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II sobre los granulocitos totales en una muestra de sangre entera procedente de un paciente; y
 la predicción para saber si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, en el que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis si el porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II es superior o igual a 1,2 %.

Se describen métodos para determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombocitopenia y/o trombosis basándose en la población relativa de células de HPN de tipo II del paciente. Se vio facilitada la identificación del nexo entre las células de HPN de tipo II y la trombocitopenia, en parte, por el desarrollo de métodos mejorados para detectar las células de HPN de tipo II.

Se describen reactivos y métodos útiles para la detección de células de HPN de tipo II (por ejemplo, glóbulos blancos de tipo II y/o glóbulos rojos de tipo II), por ejemplo, en muestras biológicas procedentes de pacientes. La divulgación también describe métodos para diagnosticar y tratar a los pacientes basados en la presencia o cantidad de células de HPN de tipo II del paciente. Por ejemplo, la divulgación presenta un método para determinar el riesgo de trombocitopenia en un paciente basado en el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II detectados en una muestra biológica procedente de un paciente sospechoso de tener HPN. Los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria tienen una serie de ventajas sobre los métodos de la técnica anterior. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria pueden separar de forma más efectiva glóbulos blancos de HPN de tipo II de las células de tipo I, lo que permite una medición más exacta y precisa del porcentaje de células de tipo II en una muestra biológica, así como una evaluación más precisa del tamaño total del clon de HPN, que comprende tanto las células de tipo II como de tipo III. Además, los métodos de diagnóstico de HPN que dependen de la expresión de GPI en los GRs de tipo II pueden ser poco fiables debido a un alto recambio de glóbulos rojos (vida inherente más corta de los GRs de HPN de tipo III debido a la elevada sensibilidad a la lisis mediada por el complemento) y las frecuentes transfusiones de GRs que reciben los pacientes con HPN. Por lo tanto, los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria no solo permiten que un profesional sanitario habilitado cuantifique con exactitud y precisión el porcentaje de glóbulos blancos de tipo II en una muestra biológica, y, por consecuencia, el tamaño total anormal del clon en la muestra, sino que los métodos también son más fiables que los métodos anteriores que se basaron en la detección de poblaciones relativamente inestables de GRs de HPN de tipo II.

La divulgación presenta un método para predecir si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis. El método incluye determinar si un paciente corre un mayor riesgo de trombosis basado en el porcentaje de células de HPN de tipo II sobre el número total de células del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente del paciente, que indica que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis.

La divulgación presenta un método para predecir si un paciente tiene posibilidad de ser trombocitopénico. El método incluye determinar si un paciente tiene posibilidad de ser trombocitopénico basado en el porcentaje de células de HPN de tipo II (por ejemplo, glóbulos rojos de tipo II y/o glóbulos blancos de tipo II) sobre el número total de células del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente del paciente, que indica que el paciente tiene posibilidad de ser trombocitopénico.

La divulgación presenta un método para determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis. El método incluye proporcionar (o recibir) información sobre el porcentaje de células de HPN de tipo II sobre las células totales del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente de un paciente; y determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, en el que el porcentaje de células de HPN de tipo II sobre el número total de células del mismo tipo histológico en la muestra biológica indica que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis.

La divulgación presenta un método para predecir si un paciente corre el riesgo de desarrollar trombosis, cuyo método incluye determinar el porcentaje de células de HPN de tipo II en una muestra biológica procedente de un paciente; y proporcionar una predicción para saber si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, en el que el porcentaje de células de HPN de tipo II sobre el número total de células del mismo tipo histológico en la muestra biológica indica que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis.

Las células de HPN de tipo II pueden ser glóbulos blancos (por ejemplo, granulocitos o monocitos). Alternativamente, las células de HPN de tipo II pueden ser glóbulos rojos.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la combinación de un porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II que es superior o igual a 1,2 % y un porcentaje de glóbulos rojos de HPN de tipo II que es superior o igual a 0,02 % es predictivo de si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis o es probable que sea trombocitopénico.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, el paciente puede correr un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico) cuando el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II sea de al menos 1,2 % (por ejemplo, al menos 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25,

30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65,3, o 70 o más). En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, el paciente puede correr un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico) cuando el porcentaje de glóbulos rojos de HPN de tipo II sea de al menos 0,02 % (por ejemplo, al menos 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 71, 71,3, o 75 o más).

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II que está comprendida entre 1,2 % y 65 %, inclusive de 1,2 % y 65 %, puede indicar que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico). Una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II que es superior o igual al 5 % puede indicar que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico). Una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II que es superior o igual al 10 %, 20 %, o incluso 50 %, puede indicar que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico).

Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede incluir además la obtención de la muestra biológica procedente del paciente. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre entera.

La divulgación presenta un método para predecir si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico). El método incluye la determinación del porcentaje de glóbulos blancos de tipo II sobre los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico en una muestra biológica procedente de un paciente; y la predicción para saber si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, en el que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico) si el porcentaje de glóbulos blancos de tipo II es superior o igual a 1,2 % (por ejemplo, superior o igual a 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65,3, o 70 o más).

La divulgación presenta un método para predecir si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico). El método incluye la determinación del porcentaje de glóbulos rojos de tipo II sobre los glóbulos rojos totales del mismo tipo histológico en una muestra biológica procedente de un paciente; y la predicción para saber si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico), en el que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis (y/o es probable que sea trombocitopénico) si el porcentaje de glóbulos rojos de tipo II es superior o igual a 0,02 % (por ejemplo, superior o igual a 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 71, 71,3, o 75 o más).

La divulgación presenta un método para seleccionar una terapia para un paciente, cuyo método incluye la selección de una terapia anti-trombótica o de una terapia anti-trombocitopénica o las dos para un paciente determinado por tener una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II superior o igual a 1,2 % (por ejemplo, superior o igual a 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65,3, o 70 o más) y/o una población de glóbulos rojos de HPN de tipo II superior o igual a 0,02 % (por ejemplo, superior o igual a 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 71, 71,3, o 75 o más).

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para seleccionar una terapia para un paciente aquejado de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), el método comprende: (a) la determinación del porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II sobre los granulocitos totales en una muestra de sangre entera del paciente según el método de la invención y (b) la selección de una terapia anti-trombótica o de una terapia anti-trombocitopénica o las dos para un paciente determinado por tener un porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II superior o igual a 1,2 %.

La divulgación presenta un método para tratar un paciente. El método incluye administrar a un paciente en necesidad del mismo una terapia anti-trombótica o una terapia anti-trombocitopénica o las dos si el paciente es determinado por tener una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II superior o igual a 1,2 % (por ejemplo, superior o igual a 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65,3, o 70 o más) y/o una población de glóbulos rojos de HPN de tipo II superior o igual a 0,02 % (por ejemplo, superior o igual a 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 71, 71,3, o 75 o más).

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la terapia anti-trombocitopénica puede ser, por ejemplo, una transfusión de plaquetas.

5 La divulgación presenta un método basado en ordenador para determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, cuyo método incluye la recepción de datos que incluyen un perfil médico de un paciente con HPN, el perfil que comprende la información sobre el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II sobre los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente del paciente; y el procesamiento de al menos parte de los datos que contienen la información para determinar si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, en el que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis si el porcentaje de glóbulos blancos de tipo II es superior o igual a 1,2 % (por ejemplo, superior o igual a 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65,3, o 70 o más).

10 La divulgación presenta un método basado en ordenador para determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, cuyo método incluye la recepción de datos que incluyen un perfil médico de un paciente con HPN, el perfil que comprende la información sobre el porcentaje de glóbulos rojos de HPN de tipo II sobre los glóbulos rojos totales del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente del paciente; y el procesamiento de al menos parte de los datos que contienen la información para determinar si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, en el que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis si el porcentaje de glóbulos rojos de tipo II es superior o igual a 0,02 % (por ejemplo, superior o igual a 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 71, 71,3, o 75 o más).

20 La divulgación presenta un método basado en ordenador para determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, cuyo método incluye proporcionar información sobre el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II sobre los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente del paciente; introducir la información en un ordenador; y calcular un parámetro que indica si el paciente corre un mayor riesgo de trombosis utilizando el ordenador y la información de entrada, en el que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis si el porcentaje de glóbulos blancos de tipo II es superior o igual a 1,2 % (por ejemplo, superior o igual a 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65,3, o 70 o más).

25 La divulgación presenta un método basado en ordenador para determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, cuyo método incluye proporcionar información sobre el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II sobre los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente del paciente; introducir la información en un ordenador; y calcular un parámetro que indica si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis utilizando el ordenador y la información de entrada, en el que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis si el porcentaje de glóbulos blancos de tipo II es superior o igual a 0,02 % (por ejemplo, superior o igual a 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 71, 71,3, o 75 o más).

30 Cualquiera de los métodos basados en ordenador descritos en la presente memoria puede incluir además el almacenamiento del parámetro en un medio legible por ordenador y/o la salida del parámetro.

35 En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede incluir la etapa de supervisión del paciente con respecto al desarrollo de al menos un síntoma de trombosis si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis. Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede incluir la administración al paciente de una terapia anti-trombótica si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis. La terapia anti-trombótica puede ser, por ejemplo, un anticoagulante o un agente trombolítico. El anticoagulante puede ser, por ejemplo, coumadina, heparina o derivados de los mismos. El agente trombolítico puede ser, por ejemplo, un activador del plasminógeno tisular, estreptoquinasa, o un activador del plasminógeno de tipo uroquinasa.

40 En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, una forma de variante no lítica de proteína aerolisina se puede utilizar para determinar el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II en la muestra biológica.

45 Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede incluir el registro del porcentaje determinado de las células de HPN de tipo II en la muestra biológica.

50 Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede incluir el registro de la predicción para saber si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis o si el paciente no corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis. El registro puede realizarse en un medio legible por ordenador. El registro también puede estar, por ejemplo, en un medio tangible (por ejemplo, archivo físico o gráfica de un paciente).

La divulgación presenta un método para clasificar glóbulos blancos. El método pone en contacto una pluralidad de glóbulos blancos con un reactivo que se une a: (i) GPI o (ii) una proteína anclada a GPI; y clasifica uno o más de los glóbulos blancos como células de HPN de tipo II basándose en la cantidad de reactivo unido a las células.

5 La divulgación presenta un método para clasificar glóbulos blancos, cuyo método incluye poner en contacto una pluralidad de glóbulos blancos con un reactivo que se une a: (i) GPI o (ii) una proteína anclada a GPI; interrogar al menos una parte de los glóbulos blancos en contacto con el reactivo basándose en la cantidad de reactivo unido a las células; y clasificar una o más de las células interrogadas como células de HPN de tipo II.

10 La divulgación presenta un método para distinguir entre diferentes poblaciones de glóbulos blancos. El método incluye poner en contacto una pluralidad de glóbulos blancos con un reactivo que se une a: (i) GPI o (ii) una proteína anclada a GPI; y distinguir al menos una parte de los glóbulos blancos de otros glóbulos blancos de la pluralidad basándose en la cantidad de reactivo unido a las células, en el que los glóbulos blancos de HPN de tipo II, si están presentes, se distinguen lo suficiente de los glóbulos blancos de tipo I y de las células de HPN de tipo III del mismo tipo histológico (mismo linaje) para permitir que el porcentaje de los glóbulos blancos de HPN de tipo II sobre los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico en la pluralidad se determine. El método también puede incluir la determinación del porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II.

20 La divulgación presenta un método para determinar el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II en una muestra, cuyo método incluye interrogar una pluralidad de glóbulos blancos en contacto con un reactivo basándose en la cantidad de reactivo unido a las células, en el que el reactivo se une a: (i) GPI o (ii) una proteína anclada a GPI, en el que la interrogación distingue suficientemente los glóbulos blancos de HPN de tipo II, si están presentes, de los glóbulos blancos de tipo I y las células de HPN de tipo III del mismo tipo histológico para permitir que el porcentaje de los glóbulos blancos de HPN de tipo II sobre los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico en la pluralidad se determine; y determinar el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la pluralidad de glóbulos blancos puede ponerse en contacto con un reactivo que se une a GPI y un reactivo que se une a una proteína ligada a GPI.

30 En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la distinción o interrogación de los glóbulos blancos (y/o la determinación del porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II) incluye una citometría de flujo.

35 En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la pluralidad de glóbulos blancos a interrogar se puede obtener de un paciente que tiene, que se sospecha que tiene, o que corre el riesgo de desarrollar HPN. El paciente puede ser uno para el que un porcentaje de glóbulos rojos de HPN de tipo II se ha determinado previamente, pero era sospechoso y/o no concluyente.

40 Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede incluir además el registro del porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II. El registro puede realizarse en un medio legible por ordenador o en un medio tangible (por ejemplo, una gráfica o registro del paciente).

45 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, el reactivo puede unirse a una fracción de GPI humano. El reactivo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o una proteína aerolisina. La proteína aerolisina puede ser, por ejemplo, una forma de variante de proteína aerolisina que es no lítica o es sustancialmente no lítica en comparación con la forma de tipo natural de la proteína. La proteína aerolisina no lítica o sustancialmente no lítica puede comprender la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 2 o 7, en el que la treonina en la posición 253 está sustituida con una cisteína y la alanina en la posición 300 está sustituida con una cisteína.

50 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, el reactivo puede unirse a una proteína anclada a GPI. Por ejemplo, el reactivo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a una proteína anclada a GPI. La proteína anclada a GPI puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, 5' nucleotidasa acetilcolinesterasa, dipeptidasa, LFA-3, NCAM, PH-20, CD55, CD59, Thy-1, Qa-2, CD14, CD33, CD16 (el receptor Fc_γ III), antígeno carcinoembrionario (ACE), CD24, CD66b, CD87, CD48, CD52, o cualquier otra proteína anclada a GPI que se conoce en la técnica y/o se expone en la presente memoria.

Un paciente determinado por tener una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II superior o igual a 1,2 % o una población de glóbulos rojos de HPN de tipo II superior o igual a 0,02 % puede ser diagnosticado de HPN.

60 Un paciente diagnosticado de HPN o un paciente diagnosticado previamente de HPN que está determinado por tener una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II superior o igual a 1,2 % o una población de glóbulos rojos de HPN de tipo II que es superior o igual a 0,02 % puede ser prescrito y/o tratado con un inhibidor del complemento, tal como, pero no limitado a, eculizumab.

65 La divulgación presenta un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a una fracción de GPI humano. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo

recombinante, un diacuerpo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo humano no inmunizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fv, un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab', y un fragmento F(ab')₂.

5 Salvo que se haya definido lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. En caso de conflicto, el presente documento, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Los métodos y materiales preferentes se describen en lo sucesivo, aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria también se pueden utilizar en la práctica o ensayo de los métodos y composiciones divulgados actualmente.

10
15 Otras características y ventajas de la presente divulgación, por ejemplo, los métodos para determinar el riesgo de desarrollar trombocitopenia o trombosis en un sujeto, resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, los ejemplos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

20 La Fig. 1 es un gráfico de puntos de dos colores que representa una población de granulocitos de sangre periférica humana que se incubaron con una solución que contenía tanto una variante no lítica de aerolisina conjugada con Alexa Fluor® 488 como un anticuerpo que se une a CD24 conjugado con ficoeritrina (FE). La aerolisina no lítica se une específicamente al anclaje de tipo GPI, y por lo tanto, las células que expresan cualquiera de las proteínas ancladas a GPI se marcan con esta proteína fluorescente. CD24 es una proteína ligada a GPI expresada en los granulocitos, por lo que las células que expresan CD24 se unirán por tanto al anticuerpo anti-CD24 como a la aerolisina no lítica. El eje X representa la intensidad log de la señal detectable producida a partir del conjugado de aerolisina unido a las células y el eje Y representa la intensidad log de la señal detectable producida a partir del conjugado de anticuerpo anti-CD24 unido a las células. Se revelan tres poblaciones de granulocitos por este análisis: células de tipo III, que carecen de las proteínas ligadas a GPI y por consiguiente aparecen sin marcar con el anticuerpo anti-CD24 y con la aerolisina no lítica; granulocitos de tipo I, que expresan altos niveles de proteínas ligadas a GPI en relación con las células deficientes de anclajes de tipo GPI; y granulocitos de tipo II, que expresan niveles intermedios de proteínas ligadas a GPI y por consiguiente se marcan tanto con anti-CD24 y aerolisina no lítica en niveles inferiores a los apreciados en los granulocitos (tipo I) normales.

35 La Fig. 2 es un diagrama de dispersión que representa el recuento de plaquetas absoluto frente al porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II en la sangre de pacientes con HPN. El eje Y representa el recuento de plaquetas en 1 µl de sangre del paciente ($\times 10^3$) y el eje X representa el porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II en la población total de granulocitos. La mitad izquierda del gráfico es una distribución de los recuentos de plaquetas observados entre los pacientes con HPN (N=141) que no tienen poblaciones de granulocitos de HPN de tipo II detectables. La mitad derecha del gráfico es una distribución de los recuentos de plaquetas observados entre pacientes con HPN (N=19) que tienen poblaciones de granulocitos de HPN de tipo II detectables.

Descripción detallada

45 La presente divulgación presenta una variedad de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas que son útiles para, entre otras cosas, determinar si un paciente tiene una población celular de HPN de tipo II y/o corre un mayor riesgo de desarrollar trombocitopenia y/o trombosis. La divulgación también presenta reactivos que se pueden utilizar en los métodos. Mientras que no pretende de manera alguna ser limitante, los reactivos a modo de ejemplo, conjugados y métodos para el uso de cualquiera de los anteriores se elaboran a continuación y se ejemplifican en los Ejemplos prácticos.

Reactivos

55 La divulgación presenta un número de reactivos que son útiles en los métodos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el reactivo se une a una fracción de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que ancla numerosas proteínas de la superficie celular a la membrana celular. Las fracciones de GPI contienen generalmente un núcleo de etanolamina-HPO₄-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcNH₂1-6myo-inositol-1HPO₄-diacil-glicerol (o alquilacilglicerol o ceramida). Véase, por ejemplo, Paulick y Bertozzi (2008) *Biochemistry* 47(27):6991-7000. Sin embargo, se ha notificado una serie de variaciones sobre esta estructura central. Por ejemplo, el núcleo de glicano puede ser modificado con cadenas laterales, tales como, pero no se limitan a, fosfoetanolamina, manosa, galactosa, ácido siálico, u otros azúcares. *Id.*

60 En algunas realizaciones, el reactivo puede ser una proteína aerolisina, por ejemplo, una proteína aerolisina no lítica. La aerolisina es una proteína citolítica de formación de canales que es expresada por las especies virulentas de *Aeromonas*, tales como, pero no se limita a, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*. La aerolisina se secreta de la célula bacteriana como un precursor de 52 kDa que se convierte en la forma activa (activada) por eliminación proteolítica de un péptido C-terminal. El precursor de aerolisina puede ser activado por proteasas del

huésped, así como las proteasas secretadas por una bacteria que expresa aerolisina. Una vez unida a una célula, la aerolisina se oligomeriza para producir canales, y en última instancia lisar, la célula (Howard y Buckley (1985) *J Bacteriol* 163:336-340).

5 Las secuencias de aminoácidos del polipéptido de aerolisina producido por cada uno de los varios miembros de la familia *Aeromonas* están altamente conservadas. En consecuencia, un polipéptido de aerolisina, como se utiliza en la presente memoria, puede proceder de cualquier especie de *Aeromonas*, tal como, pero no se limita a, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* (biotipo *sobria*), *A. veronii* (biotipo *veronii*), *A. jandaei*, *A. salmonicida* y *A. schubertii*.

10 El polipéptido de aerolisina puede proceder de *A. hydrophila* o *A. salmonicida*. El polipéptido de aerolisina puede ser una proforma que contiene un péptido señal de 24 aminoácidos. La proforma del polipéptido de aerolisina puede tener, o consistir en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 6.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido de aerolisina es una forma de la proteína en la que la secuencia de señal se ha eliminado. Por ejemplo, el polipéptido de aerolisina puede tener, o consistir en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7.

20 El polipéptido de aerolisina puede ser una forma activa de la proteína. Por ejemplo, el polipéptido de aerolisina puede tener, o consistir en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 3.

25 Como se utiliza en la presente memoria, "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y significan cualquier cadena de aminoácidos ligada al péptido, independientemente de la longitud o modificación post-traducciona. Los polipéptidos de aerolisina descritos en la presente memoria pueden contener o ser proteínas de tipo natural o pueden ser variantes de los polipéptidos de tipo natural que tienen no más de 50 (por ejemplo, no más de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50) sustituciones aminoácidas conservadoras. Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente sustituciones en los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina, y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

30 Los polipéptidos de aerolisina descritos en la presente memoria también incluyen "fragmentos de unión a GPI" de los polipéptidos, que son más cortos que los polipéptidos en proforma de longitud completa, pero retienen al menos el 10 % (por ejemplo, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o 100 % o más) de la capacidad del polipéptido activo para unirse a una fracción de GPI. Los fragmentos de unión a GPI de un polipéptido de aerolisina incluyen variantes terminales, así como variantes de delección interna de la proteína. Las variantes de delección pueden carecer de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segmentos de aminoácidos (de dos o más aminoácidos) o aminoácidos individuales no contiguos. Los fragmentos de unión a GPI pueden ser de al menos 40 (por ejemplo, al menos 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, o 325 o más) residuos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos de la SEQ ID Nos: 1-3).

45 El fragmento de unión a GPI de un polipéptido de aerolisina puede ser inferior a 400 (por ejemplo, inferior a 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 60, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, o 40) residuos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, menos de 400 residuos de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NOs: 1-3). El fragmento de unión a GPI de un polipéptido de aerolisina puede ser de al menos 40, pero menos de 400 residuos de aminoácidos de longitud.

50 El fragmento de unión a GPI de un polipéptido de aerolisina puede incluir, o consistir en, un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: L D P D S F K H G D V T Q S D R Q L V K T V V G W A V N D S D T P Q S G Y D V T L R Y D T A T N W S K T N T Y G L S E K V T T K N K F K W P L V G E T E L S I E I A A N Q S W A S Q N G G S T T T S L S Q S V R P T V P A R S K I P V K I E L Y K A D I S Y P Y (SEQ ID NO: 4).

55 El fragmento de unión a GPI de un polipéptido de aerolisina puede incluir, o consistir en, un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: L D P D S F K H G D V T Q S D R Q L V K T V V G W A V N D S D T P Q S G Y D V T L R Y D T A T N W S K T N T Y G L S E K V T T K N K F K W P L V G E C E L S I E I A A N Q S W A S Q N G G S T T T S L S Q S V R P T V P A R S K I P V K I E L Y K C D I S Y P Y (SEQ ID NO: 5).

60 El polipéptido de aerolisina puede tener una secuencia de aminoácidos que es, o es superior al, 70 % (por ejemplo, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100) idéntica a la secuencia de aerolisina que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3, 6, o 7 (véase a continuación).

65 El porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos en una secuencia de referencia, tras alinear las

secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr un porcentaje máximo de identidad de secuencias. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencias puede lograrse de diversas formas que se encuentran en la capacidad de la técnica, por ejemplo, utilizando el software informático disponible públicamente, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los parámetros apropiados para medir la

5 alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan, se pueden determinar por métodos conocidos.

Dependiendo de la aplicación prevista, en algunas realizaciones, puede ser preferible utilizar una variante de polipéptido de aerolisina que carece de la capacidad para lisar células. Tales formas de variantes del polipéptido de aerolisina son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en Brodsky *et al.* (2000) *Am J Clin Pathol* 114:459-466. La forma de variante no lítica de aerolisina contiene, o consiste en, la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7, en el que uno o más de: la histidina en la posición 132 está sustituida con una asparagina (His132Asn); la glicina en la posición 202 es una cisteína; la treonina en la posición 253 es una cisteína y la alanina en la posición 300 es una cisteína; y la treonina en la posición 225 es una glicina.

10 Una variante no lítica de aerolisina a modo de ejemplo comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NOs: 2 o 7, en el que la treonina en la posición 253 es una cisteína y la alanina en la posición 300 es una cisteína. Como se ha descrito anteriormente, las formas de variantes retendrán la capacidad de unión a las fracciones de GPI.

20 La variante del polipéptido de aerolisina puede tener menos de 10 % (por ejemplo, menos de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1) de la capacidad del homólogo no variante del polipéptido de aerolisina para lisar células diana. La variante del polipéptido de aerolisina puede no tener una actividad citolítica detectable.

Los métodos para determinar si una variante del polipéptido de aerolisina se une a una fracción de GPI son conocidos en la materia y se ejemplifican en los ejemplos prácticos. Por ejemplo, los métodos basados en células para detectar la unión entre una variante del polipéptido de aerolisina y una fracción de GPI en una superficie celular se pueden determinar utilizando técnicas de citometría de flujo y una variante del polipéptido de aerolisina marcada de forma detectable (por ejemplo, marcado con fluoróforo). Véase, por ejemplo, Hong *et al.* (2002) *EMBO J* 21(19):5047-5056.

Del mismo modo, los métodos para detectar y/o cuantificar la actividad citolítica de un polipéptido de aerolisina o variante del mismo también son conocidos en la materia. Por ejemplo, la actividad hemolítica de una variante del polipéptido de aerolisina se puede determinar poniendo en contacto la variante del polipéptido con los eritrocitos humanos normales y midiendo la cantidad de hemoglobina liberada de los eritrocitos. Véanse, por ejemplo, Howard y Buckley (1982) *Biochemistry* 21(7):1662-1667; Avigad y Bernheimer (1976) *Infection and Immunity* 13(5):1378-1381; Garland y Buckley (1988) *Infection and Immunity* 56(5):1249-1253; y Bernheimer y Avigard (1974) *Infection and Immunity* 9:1016-1021. Una disminución en la cantidad, o ausencia de actividad citolítica por la variante en comparación con la cantidad de actividad citolítica poseída por el homólogo no variante del polipéptido, es una indicación de que la variante del polipéptido se ha reducido o la actividad citolítica es ausente.

Los métodos para obtener un polipéptido de aerolisina, o producir una variante del polipéptido como se describe en la presente memoria, son conocidos en la materia de la biología molecular y se ejemplifican en los Ejemplos prácticos. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York y Ausubel *et al.* (1992) "*Current Protocols in Molecular Biology*", Greene Publishing Associates. El molde de ADN que codifica un polipéptido de aerolisina puede obtenerse a partir de cualquiera de las especies de *Aeromonas* descritas en la presente memoria utilizando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989), *supra*). Por ejemplo, Howard *et al.* describen el aislamiento y la caracterización de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (Howard *et al.* (1987) *J Bacteriol* 169(6):2869-2871). Un polipéptido de aerolisina aislado de *Aeromonas salmonicida* se describe en Buckley (1990) *Biochem. Cell Biol.* 68:221-224 y Wong *et al.* (1989) *J Bacteriol.* 171:2523-2527.

Un polipéptido de aerolisina puede contener secuencias de aminoácidos irrelevantes o heterólogas internas o terminales (carboxi o amino-terminal) (por ejemplo, secuencias derivadas de otras proteínas o secuencias sintéticas que no corresponden a cualquier proteína de origen natural). Las secuencias pueden ser, por ejemplo, una etiqueta antigénica (por ejemplo, FLAG, polihistidina, hemaglutinina (HA), glutatión-S-transferasa (GST), o proteína de unión a maltosa (PUM)). Las secuencias heterólogas también pueden incluir proteínas útiles como marcadores de diagnóstico o detectables, por ejemplo, luciferasa, proteína verde fluorescente (PVF), o cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

Los polipéptidos de aerolisina a modo de ejemplo, así como métodos para preparar y purificar los polipéptidos se describen en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/200.655.

En algunas realizaciones, el reactivo puede ser un anticuerpo que se une a una fracción de GPI. Los anticuerpos que se unen a fracciones de GPI no humano se han identificado y aislado. Véase, por ejemplo, Naik *et al.* (2006) *Infection and Immunity* 74(2):1412 (aislamiento de un anticuerpo de origen natural que se une a las fracciones de

GPI de *Plasmodium falciparum*). Como se describe con detalle en la presente memoria, está dentro de la capacidad de un experto generar un anticuerpo que se una a una fracción de GPI humano.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de anticuerpo completa o intacta (por ejemplo, IgM, IgG (incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA, IgD, o IgE) o cualquier fragmento de unión al antígeno del mismo. El término anticuerpo incluye, por ejemplo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo no inmunizado, y un anticuerpo completamente humano. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen, por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab', o un fragmento F(ab')₂. Un fragmento scFv es una cadena polipeptídica sencilla que incluye tanto las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo de las cuales se deriva scFv. Además, los intracuerpos, minicuerpos, triacuerpos, y diacuerpos (véanse, por ejemplo, Todorovska *et al.* (2001) *J Immunol Methods* 248(1):47-66; Hudson y Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231(1):177-189; Poljak (1994) *Structure* 2(12):1121-1123; Rondon y Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51:257-283) están incluidos asimismo en la definición de anticuerpo y son compatibles para su uso en los métodos descritos la presente memoria. Los anticuerpos biespecíficos también son abarcados por el término "anticuerpo". Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Los métodos para generar un anticuerpo o un fragmento del mismo se discuten en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el reactivo puede unirse a una proteína anclada a GPI. Por ejemplo, el reactivo puede ser un anticuerpo que se une a una proteína anclada a GPI. El reactivo puede ser un ligando para una proteína anclada a GPI. Las proteínas ancladas a GPI son innumerables e incluyen, sin limitación, fosfatasa alcalina, 5' nucleotidasa acetilcolinesterasa, dipeptidasa, LFA-3, NCAM, PH-20, CD55, CD59, Thy-1, Qa-2, CD14, CD33, CD16 (el receptor Fc_γ III), antígeno carcinoembrionario (ACE), y CD52. Los anticuerpos que se unen a las proteínas ancladas a GPI se conocen bien en la materia y se describen, por ejemplo, en Hall y Rosse (1996) *supra*, Richards *et al.* (2008) *Cytometry B Clin Cytom* 76B(1):47-55; Richards y Barnett (2007) *Clin Lab Med* 27(3):577-590; Luzzatto *et al.* (2006) *Int J Hematol* 84(2):104-112; y Thomason *et al.* (2004) *Am J Clin Pathol* 122(1):128-134. Tales anticuerpos también están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California), Novus Biologicals, (Littleton, Colorado), y R&D Systems (Minneapolis, MN).

Los métodos adecuados para generar un anticuerpo que se une a una proteína anclada a GPI o una fracción de GPI para su uso en métodos de diagnóstico y/o terapéuticos son bien conocidos en la materia y se describen en la siguiente sección.

Métodos para generar un anticuerpo

Los métodos adecuados para producir un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo que se une a una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI), o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de acuerdo con la divulgación son conocidos en la materia y se describen en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD55 monoclonales pueden generarse utilizando células que expresan CD55 humano, un polipéptido CD55, o un fragmento antigénico de polipéptido CD55, como un inmunógeno, elevando así una respuesta inmunitaria en animales de los que las células que producen anticuerpos y, a su vez, anticuerpos monoclonales pueden aislarse. La secuencia de tales anticuerpos puede determinarse y los anticuerpos o variantes de los mismos se producen por técnicas recombinantes. Las técnicas recombinantes se pueden utilizar para producir anticuerpos quiméricos, injertados a RDC, humanizados y completamente humanos basándose en la secuencia de los anticuerpos monoclonales así como los polipéptidos capaces de unirse a una proteína anclada a GPI o a una fracción de GPI.

Además, los anticuerpos derivados de bibliotecas recombinantes ("anticuerpos de fago") pueden seleccionarse utilizando, por ejemplo, células que expresan una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI, proteínas ligadas a GPI recombinante, o fracciones de GPI libre, como cebo para aislar los anticuerpos o polipéptidos sobre la base de la especificidad de la diana. La producción y aislamiento de anticuerpos no humanos y quiméricos están adecuadamente comprendidos en el ámbito del experto.

La tecnología de ADN recombinante se puede utilizar para modificar una o más características de los anticuerpos producidos en células no humanas. De este modo, los anticuerpos quiméricos pueden construirse a efectos de disminuir su inmunogenicidad de los mismos en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Además, la inmunogenicidad puede minimizarse humanizando los anticuerpos mediante injerto a RDC y, opcionalmente, modificación del armazón. Véanse, las patentes de EE. UU. n.º 5.225.539 y 7.393.648.

Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de suero animal, o, en el caso de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, pueden producirse en un cultivo celular. La tecnología de ADN recombinante se puede utilizar para producir los anticuerpos de acuerdo con procedimientos establecidos, incluyendo procedimientos en cultivo de células bacterianas o preferentemente cultivo de células de mamíferos. El sistema de cultivo celular seleccionado secreta preferentemente el producto de anticuerpo.

Un proceso para la producción de un anticuerpo divulgado en la presente memoria incluye el cultivo de una célula huésped, por ejemplo una célula de *E. coli* o de mamífero, que se ha transformado con un vector híbrido. El vector incluye uno o más casetes de expresión que contienen un promotor unido operativamente a una primera secuencia de ADN que codifica un péptido señal ligado en el marco de lectura apropiado a una segunda secuencia de ADN que codifica la proteína de anticuerpo. La proteína de anticuerpo se recoge entonces y se aísla. Opcionalmente, el casete de expresión puede incluir un promotor unido operativamente a secuencias de ADN policistrónico (por ejemplo, bicistrónico), que codifican proteínas de anticuerpo cada una capaz de unirse operativamente a un péptido señal en el marco de lectura apropiado.

La multiplicación de células del hibridoma o células del huésped de mamíferos *in vitro* se lleva a cabo en medios de cultivo adecuados, que incluyen los medios de cultivo convencionales habituales (tales como, por ejemplo medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio RPMI 1640), repuesto opcionalmente con un suero de mamífero (por ejemplo, suero de ternera fetal), o elementos traza y suplementos de mantenimiento del crecimiento (por ejemplo, células alimentadoras, tales como células de exudado peritoneal de ratón normal, células de bazo, macrófagos de médula ósea, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baja densidad, ácido oleico, o similares). La multiplicación de las células huésped que son células bacterianas o células de levadura se lleva a cabo igualmente en medio de cultivo adecuado conocido en la materia. Por ejemplo, para las bacterias, los medios de cultivo adecuados incluyen medio LE, NZCYM, NZYM, NZM, Caldo de cultivo Terrific, SOB, SOC, 2 xYT, o medio mínimo M9. Para las levaduras, los medios de cultivo adecuados incluyen medio YPD, YEPD, medio mínimo o medio selectivo deficiente en algún aminoácido mínimo completo.

La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpos relativamente puras y permite la ampliación de la producción para dar grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Las técnicas para el cultivo de células bacterianas, levaduras, plantas, o mamíferos son conocidas en la técnica e incluyen un cultivo en suspensión homogéneo (por ejemplo, en un fermentador de agitación por aire o en un reactor de agitación continua), y un cultivo de células inmovilizadas o atrapadas (por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica).

Grandes cantidades de los anticuerpos deseados pueden obtenerse también multiplicando células de mamíferos *in vivo*. A tal fin, las células del hibridoma que producen los anticuerpos deseados se inyectan en mamíferos histocompatibles para provocar el crecimiento de tumores que producen anticuerpos. Opcionalmente, los animales son sometidos a un tratamiento previo con un hidrocarburo, especialmente aceites minerales, tales como pristano (tetrametil-pentadecano), antes de la inyección. Después de una a tres semanas, los anticuerpos se aíslan a partir de los fluidos corporales de esos mamíferos. Por ejemplo, las células del hibridoma obtenidas por fusión de células de mieloma adecuadas con células de bazo productoras de anticuerpos procedentes de ratones Balb/c, o células transfectadas derivadas de la estirpe celular de hibridoma Sp2/0 que produce los anticuerpos deseados se inyecta intraperitonealmente en ratones Balb/c opcionalmente pre-tratados con pristano. Después de una a dos semanas, se extrae fluido ascítico de los animales.

Las técnicas anteriores, y otras técnicas se discuten, por ejemplo, en Kohler y Milstein, (1975) *Nature* 256:495-497; patente de Estados Unidos n.º 4.376.110; Harlow y Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor.

Las técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes se describen en las referencias anteriores y también en, por ejemplo: el documento WO97/08320; patente de Estados Unidos n.º 5.427.908; patente de Estados Unidos n.º 5.508.717; Smith (1985) *Science* 225:1315-1317; Parmley y Smith (1988) *Gene* 73:305-318; De La Cruz *et al.* (1988) *Journal of Biological Chemistry* 263:4318-4322; patente de Estados Unidos n.º 5.403.484; patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; documento WO88/06630; documento WO92/15679; patente de Estados Unidos n.º 5.780.279; patente de Estados Unidos n.º 5.571.698; patente de Estados Unidos n.º 6.040.136; Davis *et al.* (1999) *Cancer Metastasis Rev.* 18(4):421-5; y Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 97(2): 722-727.

Los sobrenadantes del cultivo celular se identifican sistemáticamente para los anticuerpos deseados, preferentemente por tinción inmunofluorescente de GPI o células que expresan la proteína anclada a GPI, por inmunotransferencia, mediante un inmunoensayo enzimático, por ejemplo, un ensayo tipo sándwich o un ensayo de aplicación puntual, o un radioinmunoensayo.

Para el aislamiento de los anticuerpos, las inmunoglobulinas en los sobrenadantes del cultivo o en el fluido ascítico pueden concentrarse, por ejemplo mediante precipitación con sulfato de amonio, diálisis con respecto al material higroscópico, tal como polietilenglicol, filtración a través de membranas selectivas, o similares. Si es necesario y/o deseado, los anticuerpos se purifican por los métodos cromatográficos habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno)-afinidad, por ejemplo cromatografía de afinidad con una fracción de GPI, una célula que expresa anclajes tipo GPI en su superficie, un polipéptido anclado a GPI, una célula que expresa una proteína anclada a GPI en su superficie, o con proteína A o G.

Se describe un proceso para la preparación de una estirpe celular bacteriana secretora de anticuerpos dirigidos contra una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI en un mamífero adecuado. Por ejemplo, un conejo es inmunizado con una fracción de GPI, una célula que expresa anclajes tipo GPI en su superficie, un polipéptido anclado a GPI, una célula que expresa una proteína anclada a GPI en su superficie, o fragmentos de los mismos.

5 Una biblioteca de expresión en fago producida a partir del conejo inmunizado se construye y se extrae de los anticuerpos deseados de acuerdo con métodos bien conocidos en la materia (tal como, por ejemplo, los métodos desvelados en las distintas referencias enumeradas en la presente memoria).

También se divulgan células del hibridoma que secretan los anticuerpos monoclonales. Las células del hibridoma preferentes son genéticamente estables, secretan anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria de la especificidad deseada, y se pueden ampliar a partir de cultivos ultracongelados por descongelación y propagación *in vitro* o como ascitis *in vivo*.

Asimismo se describe un proceso que se proporciona para la preparación de una estirpe celular de hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales contra una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI. En ese proceso, un mamífero adecuado, por ejemplo un ratón Balb/c, se inmuniza con uno o más polipéptidos o fragmentos antigénicos de, por ejemplo, CD55 o CD14 o con uno o más polipéptidos o fragmentos antigénicos derivados de una célula que expresa CD55, la propia célula que expresa CD55, o un vehículo antigénico que contiene un polipéptido purificado como se ha descrito. Del mismo modo, el mamífero puede ser inmunizado con una fracción de GPI humano, un fragmento del mismo, o células que expresan la fracción de GPI humano, tal vez en una alta cantidad. Las células productoras de anticuerpos del mamífero inmunizado se cultivan brevemente en un cultivo o se fusionan con células de una estirpe celular de mieloma adecuada. Las células híbridas obtenidas en la fusión se clonan, y se seleccionan los clones celulares que secretan los anticuerpos deseados. Por ejemplo, las células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con, por ejemplo, una proteína anclada a GPI o una fracción de GPI se fusionan con células de la estirpe celular de mieloma, PAI, o la estirpe celular de mieloma Sp2/0-Ag 14. Las células híbridas obtenidas se identifican sistemáticamente para la secreción de los anticuerpos deseados y las células del hibridoma positivas se clonan.

Los métodos preparar una estirpe celular de hibridoma incluyen la inmunización de ratones Balb/c mediante la inyección por vía subcutánea y/o intraperitoneal de un antígeno de interés varias veces, por ejemplo, de cuatro a seis veces, durante varios meses, por ejemplo, entre dos y cuatro meses. Las células de bazo de los ratones inmunizados se recogen dos a cuatro días después de la última inyección y se fusionan con las células de la estirpe celular de mieloma, PAI, en presencia de un promotor de fusión, preferentemente polietilenglicol. Preferentemente, las células de mieloma se fusionan con un exceso de tres a veinte veces de células de bazo de los ratones inmunizados en una solución que contiene aproximadamente polietilenglicol al 30 % a aproximadamente 50 % de un peso molecular alrededor de 4.000. Después de la fusión, las células se expanden en medios de cultivo apropiados como se ha descrito *supra*, se suplementan con un medio de selección, por ejemplo medio HAT, a intervalos regulares a efectos de evitar que las células de mieloma normales presenten un crecimiento excesivo con respecto a las células del hibridoma deseadas.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser "quiméricos". Los anticuerpos quiméricos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden partes de dos o más especies diferentes (por ejemplo, ratón y humano). Los anticuerpos quiméricos se pueden producir con las regiones variables de ratón de especificidad deseada con corte y empalme en segmentos génicos de dominio constante humano (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). De esta manera, los anticuerpos no humanos pueden ser modificados para hacerlos más adecuados para la aplicación clínica en seres humanos (por ejemplo, métodos para la detección de células de HPN de tipo II).

Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria incluyen formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, ratón). Los AMs humanizados o injertados a RDC son particularmente útiles como agentes terapéuticos para seres humanos debido a que no se eliminan de la circulación tan rápidamente como los anticuerpos de ratón y normalmente no provocan una reacción inmunitaria adversa. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "de importación", que se recogen normalmente de un dominio variable "de importación". Los métodos para preparar anticuerpos humanizados son generalmente bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véanse, por ejemplo, Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; y Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), mediante la sustitución de RDCs o secuencias de RDC de roedor con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Véase también, por ejemplo, Staelens *et al.* (2006) *Mol Immunol* 43:1243-1257. En algunas realizaciones, las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, de ratón) son anticuerpos humanos (anticuerpo receptor) en las que los residuos de región hipervariable (RDC) del anticuerpo receptor se reemplazan con residuos de región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tengan la especificidad, afinidad, y capacidad de unión deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco de la inmunoglobulina humana también se reemplazan con los correspondientes residuos no humanos (los llamados "mutaciones de retroceso"). Además, las bibliotecas de

expresión en fagos se pueden utilizar para variar los aminoácidos en las posiciones elegidas dentro de la secuencia del anticuerpo. Las propiedades de un anticuerpo humanizado también se ven afectadas por la elección de la estructura humana. Además, los anticuerpos humanizados y quimerizados pueden ser modificados para comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante con el fin de mejorar adicionalmente las propiedades de los anticuerpos, tales como, por ejemplo, afinidad o función efectora.

Los anticuerpos completamente humanos también se describen en la divulgación. La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los que las secuencias de RDC derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias de estructura humana (es decir, anticuerpos humanizados). Los anticuerpos completamente humanos o humanos pueden derivarse de ratones transgénicos que llevan genes de anticuerpos humanos (que llevan exones de variable (V), diversidad (D), de unión (U) y constante (C)) o de células humanas. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. (Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90:2551; Jakobovits *et al.* (1993) *Nature* 362:255-258; Bruggemann *et al.* (1993) *Year in Immunol.* 7:33; y Duchosal *et al.* (1992) *Nature* 355:258). Las cepas de ratones transgénicos pueden ser modificadas por ingeniería genética para contener secuencias génicas de genes de inmunoglobulina humana no reordenados. Las secuencias humanas pueden codificar tanto las cadenas pesada como ligera de los anticuerpos humanos y funcionarían correctamente en los ratones, soportando la reordenación para proporcionar un amplio repertorio de anticuerpos similar al de los seres humanos. Los ratones transgénicos pueden inmunizarse con la proteína diana (por ejemplo, una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI, tal como CD55 o CD14) para crear una matriz diversa de anticuerpos específicos y su ARN codificante. Los ácidos nucleicos que codifican los componentes de la cadena del anticuerpo de dichos anticuerpos pueden entonces ser clonados del animal en un vector de expresión. Normalmente, las poblaciones distintas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la cadena pesada y ligera se clonan, y las poblaciones distintas se recombinan en la inserción en el vector, de tal manera que cualquier copia dada del vector recibe una combinación aleatoria de una cadena pesada y ligera. El vector está diseñado para expresar cadenas de anticuerpo de modo que puedan ser montadas y expresadas en la superficie exterior de un paquete de expresión que contiene el vector. Por ejemplo, las cadenas de anticuerpos se pueden expresar como proteínas de fusión con una proteína de recubrimiento de fago de la superficie exterior del fago. A partir de entonces, los paquetes de expresión se pueden identificar sistemáticamente para la expresión de los anticuerpos que se unen a una diana.

Además, los anticuerpos humanos se pueden derivar de las bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597; y Vaughan *et al.* (1996) *Nature Biotech* 14:309 (1996)). Las bibliotecas de fagos sintéticos que pueden ser creadas utilizan combinaciones aleatorias de regiones V de anticuerpos humanos sintéticos. Por medio de la selección, se pueden fabricar anticuerpos completamente humanos de antígeno en los que las regiones V son muy similares a la naturaleza humana. Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 6.794.132, 6.680.209, 4.634.666, y Ostberg *et al.* (1983), *Hybridoma* 2:361-367.

Para la generación de anticuerpos humanos, véanse también Mendez *et al.* (1998) *Nature Genetics* 15:146-156, Green y Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188:483-495.

Los anticuerpos humanos se discuten y definen adicionalmente en las patentes de Estados Unidos n.º: 5.939.598; 6.673.986; 6.114.598; 6.075.181; 6.162.963; 6.150.584; 6.713.610; y 6.657.103, así como la publicación de patentes de Estados Unidos n.º 20030229905 A1, 20040010810 A1, US 20040093622 A1, 20060040363 A1, 20050054055 A1, 20050076395 A1, 20050287630 A1. Véase también las publicaciones internacionales n.º WO 94/02602, WO 96/34096, y WO 98/24893, y la patente europea n.º EP 0 463 151 B1.

En un enfoque alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque minilocus, un locus Ig exógeno es mimetizado a través de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus Ig. De este modo, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu, y una segunda región constante (preferentemente una región constante gamma) se forman en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º: 5.545.807; 5.545.806; 5.625.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; 5.770.429; 5.789.650; y 5.814.318; 5.591.669; 5.612.205; 5.721.367; 5.789.215; 5.643.763; 5.569.825; 5.877.397; 6.300.129; 5.874.299; 6.255.458; y 7.041.871.

Patente Europea n.º 0 546 073 B1, publicaciones de patentes internacionales n.º WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884.

Véanse a continuación Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 6287; Chen *et al.* (1993) *Int. Immunol.* 5: 647; Tuailleon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90: 3720-4; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4: 117; Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368: 856-859; Taylor *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Tuailleon *et al.* (1995) *J.*

Immunol. 154: 6453-65; Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845; y Tuailleon *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 10: 2998-3005.

5 Se describen anticuerpos no inmunizados (por ejemplo, anticuerpos que se unen a una fracción de GPI humano o
una proteína anclada a GPI) o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los anticuerpos no inmunizados o
fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden ser modificados con el fin de hacer que el anticuerpo o el
fragmento de unión al antígeno del mismo no sea inmunogénico, o sea menos inmunogénico, para una especie
10 dada. La no inmunización puede conseguirse mediante la modificación del anticuerpo o fragmento de unión al
antígeno del mismo utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia
(véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO 04/108158 y WO 00/34317). Por ejemplo, un anticuerpo o
fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser no inmunizado mediante la identificación de epítomos de
15 linfocitos T y/o epítomos de linfocitos B potenciales dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o
fragmento de unión al antígeno del mismo y retirando uno o más de los epítomos de linfocitos T y/o epítomos de
linfocitos B potenciales del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, utilizando técnicas
recombinantes. El anticuerpo modificado o fragmento de unión al antígeno del mismo puede entonces ser producido
opcionalmente y ensayado para identificar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que hayan
retenido una o más actividades biológicas deseadas, tales como, por ejemplo, afinidad de unión, pero que tengan
una reducción de la inmunogenicidad. Los métodos para la identificación de epítomos de linfocitos T y/o epítomos de
20 linfocitos B potenciales pueden llevarse a cabo utilizando técnicas conocidas en la materia, tales como, por ejemplo,
técnicas de métodos computacionales (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 02/069232), técnicas *in vitro*
o *in silico* y ensayos biológicos o métodos físicos (tales como, por ejemplo, determinación de la unión de péptidos a
moléculas de CMH, determinación de la unión de complejos de péptido:CMH a los receptores de linfocitos T de las
especies para recibir el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, ensayar las partes de proteína o
péptidos de la misma utilizando animales transgénicos con las moléculas de CMH de las especies para recibir el
anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o ensayar con animales transgénicos reconstituidos con
25 células del sistema inmunitario de las especies para recibir el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del
mismo, etc.). Los anticuerpos no inmunizados descritos en la presente memoria incluyen fragmentos de unión al
antígeno no inmunizados, Fab, Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂, anticuerpos monoclonales, anticuerpos murinos, anticuerpos
modificados por ingeniería genética (tales como, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, injertados
a RDC, humanizados, completamente humanos, y anticuerpos seleccionados de manera artificial), anticuerpos
30 sintéticos y anticuerpos semisintéticos.

Se puede producir ADN recombinante que comprende una inserción que codifica un dominio variable de cadena
pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de una estirpe celular que expresa un anticuerpo. El término ADN
35 incluye ADN monocatenario codificante, ADN bicatenario que consiste en dichos ADN codificantes y de ADNs
complementarios al mismo, o estos ADNs complementarios (monocatenarios) por sí mismos.

Además, un ADN que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de un
anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-GPI o una proteína anclada a GPI) puede ser sintetizado enzimática o
40 químicamente para contener la secuencia de ADN auténtica que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o
un dominio variable de cadena ligera, o un mutante del mismo. Un mutante del ADN auténtico es un ADN que
codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos
mencionados anteriormente en los que uno o más aminoácidos se delecionan, se insertan, o intercambian, con uno
u otros aminoácidos. Preferentemente, dicha modificación o modificaciones están fuera de las RDC del dominio
45 variable de cadena pesada y/o del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo en aplicaciones de optimización
de la humanización y de la expresión. La expresión ADN mutante también abarca mutantes silenciosos en los que
uno o más nucleótidos se reemplazan con otros nucleótidos con los nuevos codones que codifican el mismo
aminoácido o los mismos aminoácidos. La expresión secuencia mutante también incluye una secuencia degenerada.
Las secuencias degeneradas están degeneradas dentro del significado del código genético en el que un número
50 ilimitado de nucleótidos se reemplazan con otros nucleótidos sin producir un cambio de la secuencia de aminoácidos
codificada originalmente. Dichas secuencias degeneradas pueden ser útiles debido a sus diferentes sitios de
restricción y/o frecuencia de codones particulares que son preferentes por el huésped específico, particularmente *E.*
coli, para obtener una expresión óptima del dominio variable de cadena pesada de murino y/o dominio variable de
cadena ligera de murino.

55 El término mutante tiene por objeto incluir un mutante de ADN obtenido por mutagénesis *in vitro* del ADN auténtico
de acuerdo con métodos conocidos en la materia.

60 Para el ensamblaje de moléculas de inmunoglobulina tetraméricas completas y la expresión de anticuerpos
quiméricos, las inserciones de ADN recombinante que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera se
fusionan con los ADN correspondientes que codifican los dominios constantes de cadena pesada y ligera, después
se transfirieren en células huésped apropiadas, para ejemplo después de su incorporación en vectores híbridos.

65 Los ADN recombinantes que incluyen una inserción que codifica un dominio variable de cadena pesada de murino
de un anticuerpo de interés fusionado a una IgG de dominio constante humano, por ejemplo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ o $\gamma 4$, en
particular, $\gamma 1$ o $\gamma 4$, pueden utilizarse. También se proporcionan ADN recombinantes que incluyen una inserción que

codifica un dominio variable de cadena ligera de murino de un anticuerpo fusionado con un dominio constante humano κ o λ , preferentemente κ .

5 En la presente memoria se describen ADN recombinantes que codifican un polipéptido recombinante en el que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera están ligados por medio de un grupo espaciador, que comprende opcionalmente una secuencia señal que facilita el procesamiento del anticuerpo en la célula huésped y/o una secuencia de ADN que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo y/o un sitio de escisión y/o un espaciador peptídico y/o un agente. El ADN que codifica un agente tiene por objeto ser un ADN que codifica el agente útil en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Por consiguiente, las moléculas de agente que son toxinas o enzimas, concretamente enzimas capaces de catalizar la activación de profármacos, son particularmente indicadas. El ADN que codifica dicho agente tiene la secuencia de una enzima o toxina que codifica ADN de origen natural, o un mutante de las mismas, y puede prepararse por métodos bien conocidos en la materia.

15 En consecuencia, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de la divulgación pueden ser anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno desnudos que no están conjugados con otros agentes, por ejemplo, un agente terapéutico o marcador detectable. Alternativamente, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno puede conjugarse con un agente tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una molécula pequeña, una hormona, una enzima, un factor de crecimiento, una citoquina, una ribozima, un peptidomimético, un producto químico, un profármaco, una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de codificación (tales como construcciones antisentido, ARNi, construcciones de orientación selectiva al gen, etc.), o un marcador detectable (por ejemplo, un agente de contraste por RMN o rayos X, molécula fluorescente, etc.). Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, Fab, Fv, scFv de cadena sencilla, Fab' y F(ab')₂) puede ligarse a una molécula que aumenta la semivida del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (véase la sección titulada "Conjugados").

25 Varios sistemas de vectores posibles están disponibles para la expresión de genes de cadena pesada y cadena ligera clonados en células de mamífero. Una clase de vectores se basa en la integración de las secuencias génicas deseadas en el genoma de la célula huésped. Las células que han integrado el ADN de forma estable se pueden seleccionar mediante introducción de forma simultánea de genes de resistencia a fármacos, tales como gpt de *E. coli* (Mulligan y Berg (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 78:2072) o Tn5 neo (Southern y Berg (1982) *Mol. Appl. Genet.* 1:327). El gen marcador seleccionable puede ligarse a las secuencias génicas de ADN a expresar, o introducirse en la misma célula mediante co-transfección (Wigler *et al.* (1979) *Cell* 16:77). Una segunda clase de vectores utiliza elementos de ADN que confieren capacidades de replicación autónoma a un plásmido extracromosómico. Estos vectores se pueden derivar de virus de animales, tales como virus del papiloma bovino (Sarver *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 79:7147), virus del poliovirus (Deans *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 81:1292), o virus SV40 (Lusky y Botchan (1981) *Nature* 293:79).

40 Puesto que un ADNc de inmunoglobulina está formado solamente por secuencias que representan el ARNm maduro que codifica una proteína de anticuerpo, se requieren elementos de expresión génica adicionales que regulen la transcripción del gen y el procesamiento del ARN para la síntesis del ARNm de inmunoglobulina. Estos elementos pueden incluir señales de corte y empalme, promotores de transcripción, incluyendo potenciadores de promotores inducibles, y señales de terminación. Los vectores de expresión de ADNc que incorporan tales elementos incluyen los que se describen en Okayama y Berg (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:280; Cepko *et al.* (1984) *Cell* 37:1053; y Kaufman (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 82:689.

45 Como resulta aparente a partir de la divulgación, los anticuerpos de la fracción anti-GPI o anticuerpos de la proteína anclada a anti-GPI se pueden utilizar en métodos para el diagnóstico de la enfermedad (por ejemplo, diagnosticar HPN o un mayor riesgo de desarrollar trombocitopenia), la supervisión de la progresión de la enfermedad, y la selección de terapias apropiadas, incluyendo terapias de combinación para el tratamiento de HPN, trombocitopenia, o trombosis en un sujeto.

50 En la presente divulgación, se contemplan anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI en una célula (tales como, por ejemplo, un glóbulo blanco o un glóbulo rojo), la otra es para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína o receptor de la superficie celular o subunidad receptora.

60 Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos están dentro del alcance de los expertos en la materia. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello (1983) *Nature* 305:537-539). Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza preferentemente con un dominio constante de cadenas pesadas de inmunoglobulina, incluyendo al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de

inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Para detalles adicionales de métodos ilustrativos conocidos en la actualidad para la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.* (1986) *Methods in Enzymology* 121:210; publicación PCT n.º WO 96/27011; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81; Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* (1992) 175:217-225; Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148(5):1547-1553; Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90:6444-6448; Gruber *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:5368; y Tutt *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:60. Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos reticulados o heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la materia, y se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos han sido producidos utilizando cremalleras de leucina. (Véase, por ejemplo, Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148(5):1547-1553). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun pueden estar ligados a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se pueden reducir a la región bisagra para formar monómeros y luego se vuelven a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90:6444-6448 ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento se ven forzados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (scFv) también ha sido notificada. (Véase, por ejemplo, Gruber *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:5368). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe, por ejemplo, en Zapata *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062. Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Conjugados

Un reactivo descrito en la presente memoria (por ejemplo, un polipéptido de aerolisina no lítica o un anticuerpo que se une a una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI) se puede conjugar a una fracción heteróloga. La fracción heteróloga puede ser, por ejemplo, una proteína heteróloga (véase previamente), un agente terapéutico (por ejemplo, una toxina o un fármaco), o un marcador detectable tal como, pero no se limita a, un marcador radiactivo, un marcador enzimático, un marcador fluorescente, o un marcador luminiscente. Los marcadores radiactivos adecuados incluyen, por ejemplo, ³²P, ³³P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, y ³H. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, sin limitación, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato (FITC), Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 647, PVF, DyLight 488, ficoeritrina (PE), yoduro de propidio (PI), PerCP, PE-Alexa Fluor® 700, Cy5, alofococianina, Cy7, y PE-Alexa Fluor® 750. Los marcadores luminiscentes incluyen, por ejemplo, cualquiera de una variedad de quelatos de lantánido luminiscente (por ejemplo, europio o terbio). Por ejemplo, los quelatos de europio adecuados incluyen el quelato de europio de ácido dietilentiáminopentaacético (DTPA). Los marcadores enzimáticos incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina, CAT, luciferasa, y peroxidasa de rábano picante.

Los métodos adecuados para conjugar una fracción heteróloga al reactivo son bien conocidos en la materia de la química proteica. Por ejemplo, dos proteínas pueden ser reticuladas utilizando cualquiera de una serie de agentes de reticulación química conocidos. Ejemplos de tales agentes de reticulación son aquellos que enlazan dos residuos de aminoácidos mediante un enlace que incluye un enlace disulfuro "obstaculizado". En estos enlaces, un enlace disulfuro en la unidad de reticulación está protegido (por grupos obstaculizantes a cada lado del enlace disulfuro) de la reducción por la acción, por ejemplo, de glutatión reducido o de la enzima disulfuro reductasa. Un reactivo adecuado, 4-succinimidiloxycarbonil- α -metil- α (2-piridilditio) tolueno (SMPT), forma un enlace entre dos proteínas que utilizan una lisina terminal en una de las proteínas y una cisteína terminal en la otra. Los reactivos heterobifuncionales que se reticulan por una fracción de acoplamiento diferente en cada proteína también se pueden utilizar. Otros agentes de reticulación útiles incluyen, sin limitación, reactivos que enlazan dos grupos amino (por ejemplo, N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida), dos grupos sulfhidrilo (por ejemplo, 1,4-bis-maleimidobutano) un grupo amino y un grupo sulfhidrilo (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida), un grupo amino y un grupo carboxilo (por ejemplo, 4-[p-azidosalicilamido]butilamina), un grupo amino y un grupo guanidinio que está presente en la cadena lateral de arginina (por ejemplo, p-azidofenil glioxal monohidrato).

Los marcadores radiactivos se pueden conjugar con el reactivo por enlaces covalentes o no covalentes (por ejemplo, iónico o hidrófobo). Estos pueden unirse a cualquier parte de la proteína siempre que la conjugación no interfiera con la capacidad del reactivo para unirse a una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI. Cuando el reactivo es una proteína, el marcador radiactivo se puede conjugar directamente al esqueleto de aminoácidos del reactivo. Alternativamente, el marcador radiactivo puede ser incluido como parte de una molécula más grande (por ejemplo, ¹²⁵I en meta-[¹²⁵I]yodofenil-N-hidroxisuccinimida ([¹²⁵I]mIPNHS) que se une a los grupos amino libres para formar

derivados de meta-yodofenil (MIP) de proteínas relevantes (véase, por ejemplo, Rogers *et al.* (1997). *J. Nucl. Med.* 38: 1221-1229) o quelato (por ejemplo, DOTA o DTP) que, a su vez, se une al esqueleto proteico. Los métodos de conjugación de los marcadores radiactivos o moléculas más grandes/quelatos que los contienen a los reactivos descritos en la presente memoria también son conocidos en la materia. Dichos métodos implican incubar el reactivo con el marcador radioactivo en condiciones (por ejemplo, pH, concentración de sal, y/o temperatura) que faciliten la unión del marcador radioactivo o quelato al reactivo (véase, por ejemplo patente de Estados Unidos n.º 6.001.329).

Los métodos para conjugar un marcador fluorescente (conocido a veces como un "fluoróforo") con un reactivo (por ejemplo, una proteína aerolisina no lítica o un anticuerpo) son conocidos en la materia de la química proteica. Por ejemplo, los fluoróforos se pueden conjugar con los grupos amino libres (por ejemplo, de lisinas) o grupos sulfhidrilo (por ejemplo, cisteínas) de proteínas utilizando éster succinimidil (NHS) o fracciones de éster TFP fijadas a los fluoróforos. En algunas realizaciones, los fluoróforos se pueden conjugar a una fracción de agente reticulante heterobifuncional, tal como sulfo-SMCC. Los métodos de conjugación adecuados implican la incubación del reactivo con el fluoróforo en condiciones que faciliten la unión del fluoróforo al reactivo. Véanse, por ejemplo, Welch y Redvanly (2003) "*Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*", John Wiley y Sons (ISBN: 0471495603). Diversos kits están disponibles comercialmente para su uso en la conjugación de un fluoróforo a una proteína, por ejemplo, kit de marcado proteico Alexa Fluor® 488 y kit de marcado proteico Alexa Fluor® 647 (Molecular Probes, Invitrogen™).

El fluoróforo se puede conjugar con un reactivo en 1-2 mol de colorante por mol de proteína.

Los reactivos descritos en la presente memoria (por ejemplo, una proteína aerolisina o un anticuerpo que se une a una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI) se pueden modificar, por ejemplo, con una fracción que mejora la estabilización y/o retención de los propios anticuerpos en la circulación, por ejemplo, en sangre, suero, u otros tejidos. Por ejemplo, un reactivo descrito en la presente memoria puede ser PEGilado como se describe, por ejemplo, en Lee *et al.* (1999) *Bioconjug. Chem* 10(6): 973-8; Kinster *et al.* (2002) *Advanced Drug Deliveries Reviews* 54:477-485; y Roberts *et al.* (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476. La fracción de estabilización puede mejorar la estabilidad, o la retención del reactivo en el cuerpo de un sujeto (por ejemplo, sangre o tejido) en al menos 1,5 veces (por ejemplo, al menos 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, o 50 o más).

Muestras biológicas y de recogida de muestras

Las muestras biológicas adecuadas para su uso en los métodos descritos en la presente memoria incluyen cualquier fluido biológico, población de células, o tejido o fracción de los mismos, que incluye uno o más glóbulos blancos y/o uno o más glóbulos rojos. Una muestra biológica puede ser, por ejemplo, un espécimen obtenido de un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) o puede derivarse de dicho sujeto. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección de tejido obtenido por biopsia, o células que se colocan o adaptan para el cultivo tisular. Una muestra biológica también puede ser un fluido biológico, tal como orina, sangre entera o una fracción de las mismas (por ejemplo, plasma), saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, o mocos. Una muestra biológica puede fraccionarse adicionalmente, si se desea, en una fracción que contiene tipos de células particulares. Por ejemplo, una muestra de sangre entera puede fraccionarse en suero o en fracciones que contienen tipos particulares de células de sangre, tales como glóbulos rojos o glóbulos blancos (leucocitos). Si se desea, una muestra biológica puede ser una combinación de diferentes muestras biológicas de un sujeto, tal como una combinación de una muestra de tejido y fluido.

Las muestras biológicas pueden obtenerse a partir de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o corre el riesgo de desarrollar hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). Cualquier método adecuado para obtener las muestras biológicas se puede emplear, aunque los métodos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, flebotomía, hisopo (por ejemplo, un hisopo bucal), lavado, o procedimiento de biopsia y aspirado con aguja fina. Los ejemplos no limitantes de tejidos susceptibles al aspirado con aguja fina incluyen los ganglios linfáticos, pulmones, tiroides, mama, e hígado. Las muestras biológicas también pueden ser obtenidas de la médula ósea. Las muestras también se pueden recoger, por ejemplo, por microdissección (por ejemplo, microdissección de captura por láser (MCL) o microdissección por láser (MDL)), lavado de vejiga, frotis cervical (frotis cervical PAP), o lavado ductal.

Los métodos para obtener y/o almacenar muestras que preservan la actividad o la integridad de las células en la muestra biológica son bien conocidos por los expertos en la materia.

Por ejemplo, una muestra biológica puede ponerse en contacto además con uno o más agentes adicionales, tales como tampones y/o inhibidores apropiados, incluyendo inhibidores de la proteasa, los agentes destinados a preservar o minimizar cambios en las células (por ejemplo, cambios en la osmolaridad o pH) o desnaturalización de las proteínas de la superficie celular (por ejemplo, proteínas ligadas a GPI) o fracciones de GPI en la superficie de las células. Tales inhibidores incluyen, por ejemplo, quelantes, tales como ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), ácido de etileno glicol tetraacético (EGTA), inhibidores de la proteasa, tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, y leupeptina. Los tampones y condiciones apropiados de almacenamiento o de otra manera de manipulación de células enteras se describen, por ejemplo, en Pollard y Walker (1997), "*Basic Cell Culture Protocols*", volumen 75 de *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; Masters (2000) "*Animal cell culture: a*

practical approach", volumen 232 de *Practical approach series*, Oxford University Press; y Jones (1996) "*Human cell culture protocols*", volumen 2 de *Methods in molecular medicine*, Humana Press".

Una muestra también puede ser procesada para eliminar o minimizar la presencia de sustancias interferentes. Por ejemplo, una muestra biológica se puede fraccionar o purificar para extraer uno o más materiales (por ejemplo, células) que no son de interés. Los métodos de fraccionamiento o purificación de una muestra biológica incluyen, entre otros, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia, y sedimentación.

Métodos de diagnóstico y terapéuticos

Como se ha señalado previamente y elaborado en los ejemplos prácticos, los inventores han descubierto una relación clínica entre la presencia o la cantidad de células hematopoyéticas de HPN de tipo II (por ejemplo, glóbulos blancos de tipo II y/o glóbulos rojos de tipo II) y trombocitopenia en un paciente. Por ejemplo, los inventores han determinado que un paciente con una población celular de glóbulos blancos de HPN de tipo II de al menos 1,2 % (por ejemplo, al menos 1,2, 1,5, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45, 47, 50, 52, 55, 57, 60, 62, 65, o 65,3 o más) en comparación con los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico (el mismo linaje) en la muestra biológica ensayada sea posiblemente trombocitopénico que un paciente que no tiene una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II detectable o un paciente con una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II inferior a 1,2 %. Las muestras de pacientes con poblaciones de granulocitos de HPN de tipo II tuvieron recuentos similares de glóbulos blancos periféricos, recuentos de glóbulos rojos periféricos, recuentos de neutrófilos absolutos, y niveles de hemoglobina (HGB), en comparación con las muestras de pacientes sin poblaciones de granulocitos de tipo II detectables, lo que indica que las diferencias en los recuentos de plaquetas no son probables debido a las diferencias en la producción de la médula ósea subyacente. En otras palabras, la disminución de los recuentos de plaquetas en pacientes con clones de granulocitos de HPN de tipo II detectables puede ser debida a un mayor consumo o destrucción de plaquetas mediada por el complemento terminal, que puede estar asociado con la trombosis, la causa principal de muerte entre los pacientes con HPN. Véase, por ejemplo, Franchini (2006) *Hematology* 11(3):139-146. En consecuencia, la presente divulgación presenta métodos para utilizar la información relacionada con el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II en una muestra del paciente para determinar si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombocitopenia y/o trombosis. Del mismo modo, los inventores han determinado que un paciente con una población de GRs de HPN de tipo II de al menos 0,02 % (por ejemplo, al menos 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 71, 71,3, o 75 o más) es probable que sea trombocitopénico que un paciente que no tiene una población de GRs de HPN de tipo II detectable o un paciente con una población de GRs de HPN de tipo II a 0,02 %. Así, la presente divulgación también presenta métodos para utilizar la información relacionada con el tamaño del clon de GRs de HPN de tipo II en un paciente para determinar si el paciente corre el riesgo de desarrollar trombocitopenia y/o trombosis.

Los siguientes métodos pueden ser empleados para detectar la presencia, o para determinar el porcentaje de células hematopoyéticas de HPN de tipo II (por ejemplo, glóbulos blancos de HPN de tipo II) en comparación con la cantidad total de células del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente del paciente. Cuando se interroga una pluralidad de glóbulos blancos, los métodos pueden ser útiles para permitir a un profesional sanitario habilitado distinguir entre poblaciones de glóbulos blancos de HPN de tipo I, tipo II y tipo III del mismo tipo histológico (mismo linaje) a fin de determinar con precisión el tamaño de la población de HPN anormal total (es decir, células de tipo II más tipo III) en comparación con el número total de glóbulos blancos del mismo tipo histológico en la pluralidad (y/o permitir que el profesional sanitario habilitado determine el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II en la pluralidad). En primer lugar, una población de células (por ejemplo, glóbulos blancos, glóbulos rojos, o una combinación de glóbulos blancos y rojos) se pone en contacto con un reactivo que se une a: (i) una fracción de GPI o (ii) a una proteína ligada a GPI durante un periodo de tiempo y en condiciones que permitan la unión del reactivo a la fracción de GPI o a la proteína unida a GPI si está presente en la superficie de las células presentes en la muestra. La población de células puede estar presente en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre entera; véase la sección titulada "Muestras biológicas y recogida de muestras"), por ejemplo, una muestra biológica obtenida de un paciente. Por ejemplo, las células presentes en una muestra de sangre entera procedente de un paciente pueden ponerse en contacto con una proteína aerolisina (por ejemplo, una forma no lítica de aerolisina) o un anticuerpo que se une a una fracción de GPI o una proteína anclada a GPI, tal como CD59. Véanse, por ejemplo, Hall y Rosse (1996) *Blood* 87(12):5332- 5340 y la patente de Estados Unidos n.º 6.593.095. Al menos una parte de las células (por ejemplo, glóbulos blancos o GRs) en contacto con el reactivo se puede distinguir basándose en la cantidad de reactivo unido a la superficie de las células. Por ejemplo, cuando se utilizó un reactivo marcado de forma detectable, la cantidad de reactivo unido a la superficie se puede determinar como una función de la cantidad total de la señal producida a partir de un reactivo marcado de manera detectable unido a la superficie de la célula. Como se ha descrito anteriormente, la cantidad de unión del reactivo a la célula refleja la cantidad de expresión de fracciones de GPI y/o proteínas ancladas a GPI, que son indicativas de si las células son células de HPN de tipo III (expresión escasa o nula de GPI y proteínas ancladas a GPI), células normales (células de tipo I; que tienen un nivel relativamente alto de expresión de GPI y proteínas ancladas a GPI en comparación con las células de tipo III) y las células de HPN de tipo II (que tienen un nivel intermedio de expresión de GPI y proteínas ancladas a

GPI en comparación con las células de tipo I y las células de tipo III). El proceso de distinción o interrogación puede implicar, por ejemplo, una citometría de flujo.

5 Los métodos pueden utilizarse para detectar la cantidad de unión de un reactivo en los GRs de una muestra procedente del paciente. Los métodos pueden utilizarse para detectar la cantidad de unión de un reactivo en los glóbulos blancos de una muestra procedente del paciente. Los glóbulos blancos que son particularmente susceptibles de evaluación en los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, granulocitos y monocitos (por ejemplo, macrófagos).

10 Las muestras pueden ser de los pacientes que han tenido, se sospecha que tienen, o corren el riesgo de desarrollar hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). Los pacientes pueden tener uno o más síntomas que incluyen, por ejemplo, hemólisis intravascular de Coombs negativa, niveles de LC elevados, anemia por deficiencia de hierro recurrente, trombosis en sitios inusuales, disfgia episódica, o dolor abdominal.

15 Para ayudar en la identificación de células normales o células de HPN, un conjunto de poblaciones de células de control también puede ser sometido al método de detección. Las poblaciones de control pueden ser evaluadas antes, simultáneamente, o después de la evaluación de la población celular de interés. Como se discute con más detalle a continuación, un profesional sanitario habilitado puede elegir someter una población de control de células conocidas por ser células de HPN de tipo II, una población de control de células conocidas por ser células de HPN de tipo III, y/o una población de control de células conocidas por ser células normales o de tipo I para los métodos para determinar la cantidad típica, o cantidad media de unión del reactivo utilizado para un tipo particular de célula. Esta información de control se puede utilizar para clasificar o identificar las células (por ejemplo, glóbulos blancos o glóbulos rojos) de interés como células normales, células de HPN de tipo II, y/o células de HPN de tipo III.

25 Dependiendo de la composición particular de la población de células en la muestra biológica, al menos algunas células de la población pueden distinguirse de otras células sobre la base de una alta cantidad de reactivo unido, una baja cantidad de reactivo unido, o un nivel intermedio de reactivo unido. En algunos casos, solo las células con una alta cantidad de reactivo unido estarán presentes (por ejemplo, las células de un paciente sano o un paciente que no tiene HPN). En algunos casos, un mayor porcentaje de células tendrá poco, o ningún, reactivo unido a su superficie (por ejemplo, glóbulos blancos o GRs de un paciente con HPN que tiene un alto porcentaje de células de HPN de tipo III).

Una población de células en contacto con el reactivo se puede clasificar en las categorías alta, baja, e intermedia en base a la cantidad de reactivo unido a las células.

35 Una o más células (por ejemplo, uno o más células interrogadas o distinguidas) se pueden clasificar en base a la cantidad de reactivo unido a su superficie celular. Como se ejemplifica en los ejemplos prácticos y se representa en la Fig. 1, las células individuales en una población se pueden clasificar con facilidad como reactivo altamente unido, reactivo bajo o mal unido, y reactivo unido de forma intermedia utilizando métodos de citometría de flujo. Por ejemplo, los glóbulos blancos obtenidos de un paciente con HPN se ponen en contacto con dos reactivos diferentes: un primer reactivo que se une a una fracción de GPI (por ejemplo, una proteína aerolisina no lítica, marcada de manera detectable) y un segundo reactivo que se une a una proteína anclada a GPI (por ejemplo, un anticuerpo marcado de manera detectable que se une a CD24 humano). El primer reactivo y el segundo reactivo se marcan con diferentes marcadores detectables. Las células en contacto se someten entonces a citometría de flujo. Un experto en la materia en la materia de citometría de flujo será capaz de utilizar con facilidad los métodos para distinguir entre las células basadas en la cantidad de unión de cada reactivo en las células. Véanse, por ejemplo, Macey (2007) "*Flow Cytometry: principles and applications*", Humana Press (ISBN: 1588296911) y Brodsky *et al.* (2000) *Am J Clin Pathol* 114:459-466. Como se muestra en la Fig. 1, los métodos de citometría de flujo se pueden utilizar con facilidad para clasificar granulocitos obtenidos de un paciente con HPN que tiene una alta cantidad de unión de cada uno de los reactivos (población celular en la parte superior derecha; células normales o de tipo I), una baja cantidad de unión de cada reactivo (población celular en la parte inferior izquierda; células de tipo III), y una cantidad intermedia de unión de cada reactivo (población de células en la parte inferior central; células de tipo II).

La clasificación de una célula se puede realizar mediante la comparación de la cantidad del reactivo unido a la célula con una cantidad de control (por ejemplo, una cantidad de control de la unión del reactivo a las células de HPN de tipo I, células de HPN de tipo II, y/o células de HPN de tipo III). La cantidad de control de la unión del reactivo a las células de HPN de tipo I se puede basar en, por ejemplo, la cantidad promedio de unión observada del reactivo a las células del mismo tipo histológico obtenido a partir de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35, o 40 o más) individuos sanos. La cantidad de control de la unión del reactivo a las células de HPN de tipo III puede basarse, por ejemplo, en la cantidad media de unión observada a las células del mismo tipo obtenido a partir de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35, o 40 o más) pacientes con HPN. La cantidad de control de la unión del reactivo a células de HPN de tipo II se puede basar, por ejemplo, en la cantidad media de unión observada a las células del mismo tipo obtenido a partir de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35, o 40 o más) pacientes con HPN y que tienen una población de células de HPN de tipo II detectable del mismo tipo histológico (mismo linaje). Por ejemplo, para clasificar un glóbulo blanco de interés basado en la cantidad de reactivo unido a la superficie de la célula, un profesional sanitario habilitado puede comparar la cantidad de reactivo unido a la célula

con la cantidad típica, o la cantidad media de reactivo unido a un glóbulo blanco conocido por ser un glóbulo blanco de HPN de tipo I, un glóbulo blanco conocido por ser un glóbulo blanco de HPN de tipo II, y/o un glóbulo blanco conocido por ser un glóbulo blanco de HPN de tipo III.

- 5 La distinción o clasificación de una célula (por ejemplo, un glóbulo blanco o GR) de interés se puede realizar determinando si la cantidad de un reactivo unido a la célula cae dentro de un intervalo predeterminado indicativo de células de HPN de tipo I, células de HPN de tipo II, o células de HPN de tipo III del mismo tipo histológico.

10 La distinción o clasificación de una célula hematopoyética de interés puede incluir determinar si la cantidad de reactivo unido a la superficie de la célula cae por encima o por debajo de un valor de corte predeterminado. Un valor de corte es normalmente la cantidad de reactivo unido a la superficie de una célula (o la cantidad de señal detectada de una célula) por encima o por debajo de lo que se considera indicativo de una cierta clase de células, a saber, células de HPN de tipo I, células de HPN de tipo II, o células de HPN de tipo III.

15 Algunos valores de corte no son absolutos puesto que las correlaciones de diagnóstico (por ejemplo, una cantidad de reactivo unido a la superficie de la célula y la probabilidad de que la célula sea una célula de HPN de tipo II) aún pueden mantenerse significativos sobre un intervalo de valores en cada lado del corte. Se entiende que los refinamientos en los valores de corte óptimos pudieron determinarse en función de la calidad de los reactivos utilizados, la sofisticación de los métodos estadísticos y del dispositivo de detección (por ejemplo, citometría de flujo) utilizados, y en el número y la fuente de muestras interrogadas. Por lo tanto, los valores de corte se pueden ajustar hacia arriba o hacia abajo sobre la base de las reevaluaciones o cambios periódicos en la metodología o en la distribución de muestras.

20 Como se utiliza en la presente memoria, "trombocitopenia" se refiere a una condición en la que un paciente tiene un recuento de plaquetas inferior a 200.000 (por ejemplo, inferior a 150.000; inferior a 140.000; inferior a 130.000; inferior a 120.000; inferior a 110.000; inferior a 100.000; o inferior a 90.000) plaquetas por μl de sangre. Un paciente con trombocitopenia tiene un recuento de plaquetas inferior a 100.000 plaquetas por μl de sangre.

25 Como se ha descrito anteriormente, la información relacionada con el porcentaje de células de HPN de tipo II se puede utilizar en métodos para determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis. La información relacionada con el porcentaje de células de HPN de tipo II (por ejemplo, glóbulos blancos de tipo II y/o glóbulos rojos de tipo II) en una muestra biológica procedente de un paciente puede ser comunicada (por ejemplo, en forma, electrónica o impresa) a un profesional sanitario para que sea utilizado por el profesional sanitario habilitado para la selección de un régimen terapéutico apropiado para el paciente. Basado en una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II de al menos 1,2 % (por ejemplo, al menos 1,2, 1,5, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45, 47, 50, 52, 55, 57, 60, 62, 65, o 65,3 o más) en comparación con el número total de glóbulos blancos del mismo tipo histológico en la muestra biológica ensayada, el profesional sanitario habilitado puede determinar que el paciente corre el riesgo de desarrollar trombocitopenia, o que puede ser trombocitopénico. Del mismo modo, un paciente con una población de GRs de HPN de tipo II de al menos 0,02 % (por ejemplo, al menos 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 71, 71,3, o 75 o más) de GRs totales en la muestra biológica ensayada es probable que sea trombocitopénico que un paciente que no tiene una población de GRs de HPN de tipo II detectable o un paciente que tiene una población de GRs de HPN de tipo II inferior a 0,02 %. Un paciente con una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II de al menos 1,2 % o una población de glóbulos rojos de HPN de tipo II de al menos 0,02 % puede ser, por ejemplo, al menos 1,5 veces (por ejemplo, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 20, 30, o incluso 40 o más) probable de desarrollar un trombo que un individuo normal o un paciente que no tiene ese porcentaje de células de HPN de tipo II.

50 El profesional sanitario puede solicitar ensayos adicionales para determinar los recuentos de plaquetas en el paciente. Los métodos para determinar los recuentos de plaquetas en una muestra derivada de sangre procedente de un sujeto son bien conocidos en el materia de la medicina y se describen, por ejemplo, en Sallah *et al.* (1998) *Postgraduate Medicine* 103:209-210; Kottke-Marchant (1994) *Hematol Oncol Clin North Am.* 8:809-853; Redei *et al.* (1995) *J Crit Illn* 10:133-137; Butkiewicz *et al.* (2006) *Thrombosis Research* 118(2):199-204; Tomita *et al.* (2000) *Am J Hematol* 63(3):131-135; y Schrezenmeier *et al.* (1998) *Br J Haematol* 100(3):571-576.

55 Si el paciente es determinado por el profesional sanitario por ser trombocitopénico o es probable que sea trombocitopénico, el profesional sanitario habilitado puede seleccionar, prescribir o administrar al paciente una terapia anti-trombocitopénica. La terapia anti-trombocitopénica puede ser, por ejemplo, un corticosteroide, una transfusión de plaquetas, una esplenectomía, o un agente estimulante de la producción de plaquetas. El agente estimulante de la producción de plaquetas puede ser, por ejemplo, trombopoyetina (TPO) o un mimético de trombopoyetina. Véanse, por ejemplo, Kuter y Begley (2002) *Blood* 100:3457-3469; Li *et al.* (2001) *Blood* 98:3241-3248; y Vadhan-Raj *et al.* (2000) *Ann Intern Med* 132:364-368. Un péptido mimético de TPO puede tener la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 5 de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030049683.

- Si el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II en una muestra biológica de un paciente es de aproximadamente 1,2 %, el profesional sanitario también puede determinar que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis. El profesional médico puede entonces seleccionar una terapia anti-trombótica apropiada para el paciente. Por ejemplo, el profesional sanitario habilitado puede seleccionar, prescribir o administrar al paciente un anticoagulante o un agente trombolítico. El anticoagulante puede ser, por ejemplo, coumadina, heparina o derivados de los mismos. El agente trombolítico puede ser, por ejemplo, un activador del plasminógeno tisular (por ejemplo, Retavase™, Rapilysin™), estreptoquinasa, o un activador del plasminógeno de tipo uroquinasa.
- Un paciente determinado por tener una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II superior o igual a 1,2 % o una población de glóbulos rojos de HPN de tipo II superior o igual a 0,02 % puede ser diagnosticado con tener HPN. Un paciente diagnosticado con HPN o un paciente diagnosticado previamente con HPN está determinado a tener una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II superior o igual a 1,2 % o una población de glóbulos rojos de HPN de tipo II que es superior o igual a 0,02 %, puede ser prescrito y/o tratado con un inhibidor del complemento.
- Cualquiera de los compuestos que se unen o de otro modo bloquean la generación y/o actividad de cualquiera de los componentes del complemento humano puede ser utilizado de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, un inhibidor del complemento puede ser, por ejemplo, una pequeña molécula, un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, un peptidomimético, o una macromolécula que no es un ácido nucleico o una proteína. Estos agentes incluyen, entre otros, moléculas orgánicas pequeñas, aptámeros de ARN, aptámeros de L-ARN, Spiegelmers, compuestos antisentido, ARN bicatenario, ARN de interferencia pequeño, inhibidores de ácido nucleicos bloqueados, e inhibidores de ácidos nucleicos peptídicos. Un inhibidor del complemento puede ser una proteína o fragmento de proteína.
- Los anticuerpos específicos a un componente del complemento humano son útiles en la presente memoria. Algunos compuestos incluyen anticuerpos dirigidos contra componentes del complemento C1, C2, C3, C4, C5 (o un fragmento del mismo; véase más adelante), C6, C7, C8, C9, Factor D, Factor B, Factor P, MBL, MASP-1, y MASP-2, evitando así la generación de la actividad anafilática asociada con C5a y/o prevención del ensamblaje del complejo de ataque a la membrana asociado con C5b.
- También son útiles en los presentes métodos formas de origen natural o solubles de los compuestos inhibidores del complemento, tales como CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, Factor H, factor de veneno de cobra, FUT-175, complestatina, y K76 COOH. Otros compuestos que se pueden utilizar para unirse o de otra manera bloquear la generación y/o la actividad de cualquiera de los componentes del complemento humano incluyen, entre otros, proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, moléculas pequeñas, aptámeros de ARN, incluyendo ARC187 (que está disponible comercialmente en Archemix Corporation, Cambridge, MA), aptámeros L-ARN, Spiegelmers, compuestos antisentido, inhibidores de serina proteasa, moléculas que se pueden utilizar en la interferencia del ARN (ARNi) como el ARN bicatenario incluyendo ARN de interferencia pequeños (ARNis), inhibidores del ácido nucleico bloqueado (ANB), inhibidores de ácidos nucleicos peptídicos (ANP), etc.
- El inhibidor del complemento inhibe la activación del complemento. Por ejemplo, el inhibidor del complemento puede unirse e inhibir la actividad de la activación del complemento de C1 (por ejemplo, C1q, C1r, o C1s) o el inhibidor del complemento puede unirse e inhibir (por ejemplo, inhibir la escisión de) C2, C3, o C4. El inhibidor puede inhibir la formación o ensamblaje de la convertasa C3 y/o convertasa C5 de las vías alternativas y/o clásicas del complemento.
- El inhibidor del complemento puede inhibir la formación del complemento terminal, por ejemplo, formación del complejo de ataque de la membrana C5b-9. Por ejemplo, un inhibidor del complemento del anticuerpo puede incluir un anticuerpo anti-C5. Tales anticuerpos anti-C5 pueden interactuar directamente con C5 y/o C5b, de manera que se inhibe la formación y/o la función fisiológica de C5b. Los anticuerpos anti-C5 a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, eculizumab (Soliris®; Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT; véanse, por ejemplo, Kaplan (2002) *Curr Opin Investig Drugs* 3(7):1017-1023; Hill (2005) *Clin adv Hematol Oncol* 3 (11):849- 50; y Rother *et al.* (2007) *Nature Biotechnology* 25(11):1256-1488) y pexelizumab (Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT; véanse, por ejemplo, Whiss (2002) *Curr Opin Investig Drugs* 3(6):870-7; Patel *et al.* (2005) *Drugs Today (Barc)* 41(3):165-70; y Thomas *et al.* (1996) *Mol Immunol.* 33(17-18):1389-401).
- Los métodos para la administración de una terapia anti-trombótica y/o una terapia anti-trombocitopénica apropiada a un paciente en necesidad del mismo son bien conocidos en la materia de la medicina.
- Los métodos para determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombocitopenia o trombosis pueden ser ayudados por ordenador. Por ejemplo, los métodos pueden incluir datos de recepción que incluyen un perfil médico de un paciente con HPN, el perfil comprende información sobre el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II sobre los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico (mismo linaje) en una muestra biológica procedente del paciente; y el procesamiento de al menos parte de los datos que contienen la información para determinar si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis. En otro ejemplo, los métodos pueden incluir proporcionar información sobre el porcentaje de glóbulos blancos de HPN de tipo II sobre los glóbulos blancos totales del mismo tipo histológico en una muestra biológica procedente del paciente; la introducción de la

información en un ordenador; y el cálculo de un parámetro que indica si el paciente corre un mayor riesgo de trombosis utilizando el ordenador y la información de entrada. El riesgo relativo del paciente a desarrollar trombocitopenia o trombosis puede ser la salida por el ordenador en forma impresa y/o puede ser almacenada en un medio legible por ordenador.

5

Kits

Asimismo se presentan en la presente memoria kits para su uso en: determinar si una muestra biológica procedente de un paciente contiene una población de glóbulos blancos de HPN de tipo II y/o determinar si un paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombocitopenia o trombosis. Los kits pueden incluir, por ejemplo, uno o más conjugados marcados detectablemente seleccionados entre: un conjugado de aerolisina (por ejemplo, un conjugado de variante no lítica de proteína aerolisina) o conjugados de anticuerpos que se unen a las proteínas ancladas a GPI. Los kits también pueden incluir una muestra de control que contiene una célula que expresa GPI o una partícula unida a GPI; y, opcionalmente, instrucciones para detectar la presencia de una célula que expresa GPI. Los kits también pueden incluir uno o más medios para obtener una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre) procedente de un ser humano y/o cualquiera de los componentes del kit descritos anteriormente.

10

15

Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar, no limitar, la invención.

20 Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Se obtuvieron un total de 2.921 muestras de sangre periférica de pacientes para ensayar la presencia de células de HPN de tipo II y células de HPN de tipo III. Las muestras de sangre fueron extraídas en viales estériles que contenían EDTA.

25

Para determinar el porcentaje de glóbulos blancos normales (células de tipo I), los glóbulos blancos de HPN de tipo II, y de HPN de tipo III presentes en cada una de las muestras de los pacientes, la sangre periférica se mezcló y se tiñó con uno o más de los siguientes conjugados: una variante no lítica de proteína de aerolisina conjugado con Alexa Fluor® 488 (Protox Biotech FL2-S), un anticuerpo anti-CD24 conjugado con ficoeritrina (FE) (Clon ALB9 Beckman Coulter), un anticuerpo anti-CD15 conjugado con PC5 (Clon 80H5), y un anticuerpo anti-CD45 conjugado con PC7 (Clon J.33). Después de la incubación de la sangre con uno o más de los reactivos anteriores durante 15-30 minutos a temperatura ambiente, la sangre se lisó con Immunoprep™ (Beckman Coulter) y se lavó dos veces con tampón PBA (solución salina tamponada con fosfato, seroalbúmina bovina al 1%, y 10 mM de NaN₃). Posteriormente, las células se volvieron a suspender en tampón PBA y se analizaron utilizando el citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter). Si se identificó una población de granulocitos de HPN de tipo II o tipo III, los monocitos también fueron interrogados para una población de tipo II o tipo III utilizando la sangre del paciente en contacto con uno o más de los siguientes conjugados: una variante no lítica de proteína aerolisina conjugada con AlexaFluor® 488 (Protox Biotech FL2-S), un anticuerpo que se une a CD33 conjugado con ficoeritrina (FE) (clon D3HL60.251), un anticuerpo que se une a CD14 conjugado con ECD (Clon RMO52), un anticuerpo que se une a CD64 conjugado con PC5 (Clon 22), y un anticuerpo que se une a CD45 conjugado con PC7 (Clon J.33), lo que permitió la selección de poblaciones específicas para el linaje en monocitos.

30

35

40

Para determinar el porcentaje de glóbulos rojos normales (células de tipo I), se colocaron 20 µl de glóbulos rojos de HPN de tipo II, y de HPN de tipo III de sangre periférica en EDTA en 3 ml de tampón fosfato salino (TFS) y se mezclaron minuciosamente. 50 µl de sangre diluida del paciente se puso en contacto con uno o más de los siguientes conjugados: un anticuerpo anti-CD235a conjugado con FITC (clon 11E4B-7-6/KC16 Beckman Coulter) y un anticuerpo anti-CD59 conjugado con FE (Clon MEM-43 Invitrogen). La sangre y los conjugados se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante una hora mientras se agitaban en vórtex cada 15 minutos. Después de la incubación de una hora, la sangre se lavó dos veces con TFS, se volvió a suspender en TFS, y se analizó en un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter).

50

Ejemplo 2.

Las muestras de sangre entera de 2.921 pacientes, cuyas muestras se sometieron a ensayos de diagnóstico para HPN, se analizaron utilizando un ensayo basado en citometría de flujo de alta sensibilidad para detectar el nivel de expresión de GPI y las proteínas ancladas a GPI en los glóbulos blancos (en particular granulocitos) para determinar de este modo las poblaciones de glóbulos blancos (granulocitos) de tipo I, de HPN tipo II y de HPN de tipo III en cada una de las muestras. El ensayo también se utilizó para detectar las poblaciones de glóbulos rojos de tipo I, de HPN de tipo II, y de HPN de tipo III. Los métodos emplearon una variante no lítica de proteína aerolisina marcada con fluorescencia junto con anticuerpos contra antígenos proteicos específicos de linaje anclados a GPI específico. Un análisis de citometría de flujo a modo de ejemplo de una muestra del paciente se representa en la Fig. 1. Las células de una muestra de sangre entera se pusieron en contacto con el reactivo de aerolisina marcado con fluorescencia (Alexa Fluor) y un anticuerpo marcado con ficoeritrina (FE) que se une a la proteína anclada a GPI CD24. Las células de la muestra de sangre entera se sometieron a un análisis de citometría de flujo y los

55

60

65

granulocitos expresados en este se basaron en la cantidad de señal detectada de cada reactivo unido a la superficie de los granulocitos. Como se muestra en la Fig. 1, los granulocitos con la mayor cantidad de señal detectada de los marcadores con AlexaFluor y FE (parte superior derecha; células de tipo I) se separaron de las poblaciones de granulocitos que tuvieron una señal muy baja o ausente (parte inferior izquierda; granulocitos de tipo III) y los granulocitos que produjeron una cantidad de señal intermedia (población media; granulocitos de tipo II).

Las poblaciones de glóbulos rojos de HPN fueron interrogadas utilizando dos reactivos: un anticuerpo marcado de manera detectable que se une a CD235 y un reactivo marcado de forma detectable que se une a CD59. Las poblaciones de glóbulos blancos de HPN fueron interrogadas mediante la proteína aerolisina marcada de forma detectable y varios anticuerpos con respecto a proteínas de superficie celular específicas de linaje ancladas a GPI, incluyendo CD24, CD14, CD16, CD66b y CD55.

216 de las muestras de pacientes tuvieron una población de granulocitos de HPN de tipo III detectable que fue >0,01 % del número total de los granulocitos en la muestra y un recuento absoluto de al menos 50 granulocitos de HPN de tipo III. La información clínica relacionada con varios parámetros (por ejemplo, niveles de hemoglobina, niveles de LC, y recuentos de plaquetas) estaba disponible para 162 de estos pacientes (véase la Tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con una población de granulocitos de HPN de tipo III o II detectable (en la que se dispusieron los datos clínicos).

	Casos de granulocitos con tipo II (N=19)	Casos de granulocitos sin tipo II (N=143)	Valor de P de Wilcoxon
Población de granulocitos media (intervalo) total de HPN (%)	87,20 (9,2-99,5)	11,40 (0,01-99,9)	<0,01
Población de granulocitos media (intervalo) de HPN de tipo II (%)	7,10 (1,2-65,3)	n/a	n/a
Población de granulocitos media (intervalo) de HPN de tipo III (%)	76,0 (4,5-96,4)	0,20 (0-76,20)	<0,01
Población de GRs media (intervalo) de HPN de tipo II (%)	3,30 (0,02-71,3)	0,20 (0-76,20)	<0,01
Población de GRs media (intervalo) III de HPN de tipo (%)	16,10 (0,03-86,70)	2,90 (0-92,9)	0,01
Media de glóbulos blancos (x10 ⁹ /l)	3,80	4,20	0,44
Media absoluta del recuento de neutrófilos (células/μl)	2,07	2,15	0,70
Media de GRs (x10 ¹² /l)	3,08	3,14	0,80
Media de hemoglobina (g/dl)	10,6	10,4	0,87
Media de LC (UI/l)	336	315	0,88
Media de plaquetas (x10 ⁹ /l)	54	116	0,01
Plaquetas <100 x10 ⁹ /l (%)	68,4 (13/19)	44,0 (62/141)	0,05*
Ensayo exacto de Fisher*			

De las muestras de pacientes en la que se disponía la información clínica, 19 (8,8%) muestras de pacientes contenían poblaciones de granulocitos de tipo II distintas, que oscilan desde 1,2-65,3 % de la población total de granulocitos, con un tamaño medio del clon de aproximadamente 7 %. En 4 de las 19 muestras de pacientes, la población de granulocitos de tipo II representó >50 % de la población total anormal (por ejemplo, células de HPN de tipo II y tipo III). En 10 de las 19 muestras de pacientes, también se detectó una población de monocitos de HPN de tipo II. Una evaluación de la capacidad de diversos anticuerpos, específicos para proteínas individuales ligadas a GPI encontradas en granulocitos para detectar granulocitos de HPN de tipo II indicó que la población de granulocitos de tipo II era detectable en todos los casos utilizando el reactivo de aerolisina marcado de forma detectable, pero en porcentajes decrecientes se utilizan anticuerpos específicos para CD66b (88 %), CD55 (50 %), CD24 (47 %), y CD16 (0 %) (véase la Tabla 2). Estos resultados indican que el conjugado basado en aerolisina es particularmente útil para detectar con precisión poblaciones de granulocitos de HPN de tipo II en muestras de pacientes.

Tabla 2. Detección de granulocitos de tipo II utilizando aerolisina u otros anticuerpos de proteína anclada a anti-GPI.

Aerolisina	CD24	CD66b	CD55	CD16
19/19 (100 %)	9/19 (47 %)	8/9 (88 %)	4/8 (50 %)	0/9 (0 %)

5 Las muestras de pacientes que contenían poblaciones de granulocitos de HPN de tipo II tenían una media significativamente mayor de población de granulocitos total de HPN de tipo II y de HPN tipo III combinada que aquellas sin granulocitos de tipo II (87 % frente a 11 %; $p = 0,0003$), así como una media mayor de poblaciones de GRs de tipo II y tipo III, lo que refleja un aumento de la capacidad del método para detectar poblaciones de glóbulos blancos de HPN de tipo II en muestras de pacientes con poblaciones de células de HPN generalmente más grandes.

10 Después de haberse producido la comparación con los datos clínicos, se descubrió que las muestras de pacientes con poblaciones de granulocitos de HPN de tipo II también tenían una media inferior de recuentos de plaquetas (plt) ($54 \times 10^9/l$; $p < 0,01$). Véase la Fig. 2. Las muestras de pacientes con poblaciones de granulocitos de HPN de tipo II tenían recuentos de glóbulos blancos periféricos, recuentos de glóbulos rojos periféricos, recuentos de neutrófilos absolutos, y niveles de hemoglobina (Hgb) similares en comparación con las muestras de pacientes sin poblaciones de granulocitos de tipo II detectables (Tabla 1), lo que indica que las diferencias en los recuentos de plaquetas no se deben probablemente a diferencias en la producción de médula ósea subyacente. En otras palabras, aunque la divulgación no se limita de modo alguno a teoría o mecanismo de acción particular, a medida que los pacientes con HPN han desregulado el control del complemento debido a la falta de proteínas reguladoras del complemento ligadas a GPI, CD55 y CD59, la disminución de recuentos de plaquetas observada en pacientes con clones de granulocitos de HPN de tipo II detectables puede deberse a un aumento del consumo o destrucción de plaquetas mediado por el complemento terminal, que puede, a su vez, estar asociado con la trombosis, la principal causa de muerte entre los pacientes con HPN.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Alexion Pharmaceuticals, Inc.
- <120> REACTIVOS Y MÉTODOS PARA DETECTAR CÉLULAS DE PNH DE TIPO II
- <130> ALXN-150-WO1
- 30 <140> AÚN NO ASIGNADO
- <141> 09-11-2010
- <150> 61/280.897
- 35 <151> 09-11-2009
- <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
- <211> 492
- <212> PRT
- <213> *Aeromonas hydrophila*
- 45 <400> 1

ES 2 625 470 T3

Gln Lys Ile Lys Leu Thr Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Met Ala Gln Ala Gln Ala Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg
 20 25 30

Leu Phe Ser Leu Gly Gln Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val
 35 40 45

Asn Arg Glu Glu Ala Gln Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met
 50 55 60

Gly Gln Trp Gln Ile Ser Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Asn Gly Glu Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp
 85 90 95

Cys Tyr Pro Thr Asn Pro Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala
 100 105 110

Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val
 115 120 125

His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr
 130 135 140

Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu
 145 150 155 160

ES 2 625 470 T3

Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn
 165 170 175
 Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile
 180 185 190
 Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His
 195 200 205
 Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly
 210 215 220
 Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr
 225 230 235 240
 Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly
 245 250 255
 Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val
 260 265 270
 Gly Glu Thr Glu Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala
 275 280 285
 Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg
 290 295 300
 Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr
 325 330 335
 Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr
 340 345 350
 Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly
 355 360 365
 Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg
 370 375 380
 Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln
 385 390 395 400
 Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg
 405 410 415

ES 2 625 470 T3

Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe
 420 425 430

Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser
 435 440 445

His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg
 450 455 460

Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn
 465 470 475 480

Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 485 490

<210> 2
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Aeromonas hydrophila*

5

<400> 2

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

10

ES 2 625 470 T3

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160
 Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175
 Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190
 Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205
 Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220
 Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Glu Leu Ser
 245 250 255
 Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270
 Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300
 Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320
 Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335
 Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350
 Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365
 Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380
 Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

ES 2 625 470 T3

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 3
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> *Aeromonas hydrophila*

5

<400> 3

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

10

ES 2 625 470 T3

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Glu Leu Ser
245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr

ES 2 625 470 T3

370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln
 435

5
 <210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Aeromonas hydrophila*
 <400> 4

Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg
 1 5 10 15

Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr
 20 25 30

Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn
 35 40 45

Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys
 50 55 60

Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Glu Leu Ser Ile Glu
 65 70 75 80

Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr
 85 90 95

Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys
 100 105 110

Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr
 115 120 125

10
 15
 <210> 5
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Aeromonas hydrophila*
 <400> 5

ES 2 625 470 T3

Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg
 1 5 10 15

Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr
 20 25 30

Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn
 35 40 45

Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys
 50 55 60

Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Cys Glu Leu Ser Ile Glu
 65 70 75 80

Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr
 85 90 95

Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys
 100 105 110

Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Cys Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr
 115 120 125

<210> 6
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> *Aeromonas salmonicida*
 <400> 6

5

Met Lys Lys Leu Lys Ile Thr Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Met Ala Gln Ala Gln Ala Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu
 20 25 30

Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln Glu Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro
 35 40 45

Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met
 50 55 60

Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met
 65 70 75 80

Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu Ile Lys Pro Gly Ser Ala Ser Ser Thr
 85 90 95

Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro Ala Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
 100 105 110

10

ES 2 625 470 T3

Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
115 120 125

Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
130 135 140

Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
145 150 155 160

Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
165 170 175

Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ser
180 185 190

Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
195 200 205

His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
210 215 220

Gly Trp Ala Ile Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
225 230 235 240

Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
245 250 255

Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu
260 265 270

Val Gly Glu Thr Glu Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp
275 280 285

Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val
290 295 300

Arg Pro Thr Val Pro Ala His Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu
305 310 315 320

Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser
325 330 335

Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp
340 345 350

Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile
355 360 365

ES 2 625 470 T3

Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys
 370 375 380

Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Ser Asp Trp Asn Trp Thr Ile
 385 390 395 400

Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu
 405 410 415

Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln
 420 425 430

Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Val Ala Ala Ala
 435 440 445

Ser Gln Ser Ser Arg Ala Arg Asn Leu Ser Ala Gly Gln Gly Leu Arg
 450 455 460

Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn
 465 470 475 480

Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 485 490

<210> 7
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> *Aeromonas salmonicida*
 <400> 7

5

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Glu Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

10

ES 2 625 470 T3

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Ser Ala Ser Ser Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Ala Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ser Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Ile Asn Asp Ser
195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Glu Leu Ser
245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala His
275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
290 295 300

ES 2 625 470 T3

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Ser Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Val Ala Ala Ala Ser Gln Ser Ser Arg Ala Arg
 420 425 430

Asn Leu Ser Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala
 435 440 445

Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr
 450 455 460

Pro Ala Ala Asn Gln
 465

25658410_1

5 1

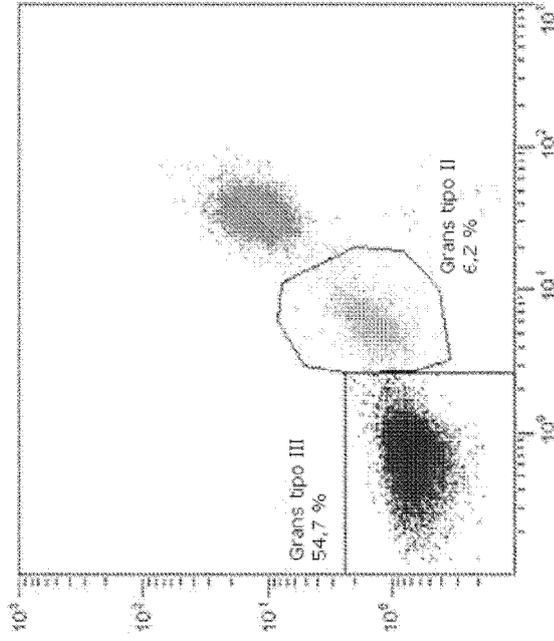
25658410_1

10 25658410_1

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir si un paciente aquejado de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis, comprendiendo el método:
- 5 la determinación del porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II sobre los granulocitos totales en una muestra de sangre entera procedente de un paciente; y
la predicción para saber si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis,
en el que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis si el porcentaje de granulocitos de HPN de
10 tipo II es superior o igual a 1,2 %.
2. El método de la reivindicación 1, en el que una población de granulocitos de HPN de tipo II que está comprendida entre 1,2 % y 65,3 % inclusive, indica que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que una población de granulocitos de HPN de tipo II que es superior o igual a a) 5 %, b) 10 %, c) 20 % o d) 50 % indica que el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la supervisión del paciente con respecto al desarrollo de al menos un síntoma de trombosis si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar
20 trombosis.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además la selección de una terapia anti-trombótica para el paciente si el paciente corre un mayor riesgo de desarrollar trombosis.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que la terapia anti-trombótica es un anticoagulante o un agente trombolítico.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el anticoagulante es coumadina, heparina, o derivados de los mismos.
- 30 8. El método de la reivindicación 6, en el que el agente trombolítico es un activador del plasminógeno tisular, estreptoquinasa, o un activador del plasminógeno de tipo uroquinasa.
9. Un método para seleccionar una terapia para un paciente aquejado de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), comprendiendo el método: (a) la determinación del porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II sobre los
35 granulocitos totales en una muestra de sangre entera del paciente según el método de la reivindicación 1 y (b) la selección de una terapia anti-trombótica o de una terapia anti-trombocitopénica o las dos para un paciente determinado por tener un porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II superior o igual a 1,2 %.
10. Un anticoagulante o un agente trombolítico para su uso en el tratamiento de un paciente aquejado de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), en el que el paciente tiene una población de granulocitos de HPN de
40 tipo II superior al 1,2 %.
11. El método de la reivindicación 9, en el que la terapia anti-trombocitopénica es una transfusión de plaquetas.
- 45 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 u 11 o el anticoagulante o agente trombolítico para su uso según la reivindicación 10, en el que se utiliza una forma de variante no lítica de proteína aerolisina para determinar el porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II.
13. El método de: (a) una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de determinación del porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II comprende, o (b) la reivindicación 9, en el que el porcentaje de
50 granulocitos de HPN de tipo II se determina mediante:
- la puesta en contacto de los glóbulos blancos con un reactivo que se une a: (i) GPI o (ii) una proteína anclada a GPI, en el que los glóbulos blancos se obtienen a partir de la muestra de sangre entera;
55 la determinación de la cantidad de unión del reactivo;
la comparación de la cantidad de unión del reactivo entre los granulocitos, en el que los granulocitos que exhiben una cantidad intermedia de unión se clasifican como granulocitos de HPN de tipo II; y
la determinación del porcentaje de granulocitos de HPN de tipo II.
- 60 14. El método de la reivindicación 13, que comprende además la determinación del porcentaje de granulocitos de HPN de tipo III.
15. El método de la reivindicación 13 o 14, en el que la distinción comprende una citometría de flujo.
- 65 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el reactivo se une a una fracción de GPI humano.

17. El método de la reivindicación 16, en el que el reactivo comprende una proteína aerolisina.
18. El método de la reivindicación 16 o 17, en el que el reactivo comprende una forma de variante de proteína aerolisina que es no lítica o es no lítica en comparación con la forma de tipo natural de la proteína.
- 5 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el reactivo comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 o 7, en el que la treonina en la posición 253 está sustituida con una cisteína y la alanina en la posición 300 está sustituida con una cisteína.
- 10 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que el reactivo es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 o 20, en el que el reactivo se une a una proteína anclada a GPI.
- 15 22. El método de la reivindicación 21, en el que la proteína anclada a GPI se selecciona entre el grupo que consiste en fosfatasa alcalina, 5' nucleotidasa acetilcolinesterasa, dipeptidasa, LFA-3, NCAM, PH-20, CD55, CD59, Thy-1, Qa-2, CD14, CD33, CD16 (el receptor Fcγ III), antígeno carcinoembrionario (ACE), CD24, CD66b, CD87, CD48 y CD52.
- 20



Intensidad log de la señal a partir de un conjugado de anticuerpo anti-CD24 conjugado con ficoeritrina (FE) unido a las células

Intensidad log de la señal a partir de un conjugado de aerolisina no lítica conjugado con Alexa Fluor® 488 unido a las células

Fig. 1

