

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 703**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2015 PCT/EP2015/070526**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16038055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2015 E 15760451 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3191509**

54 Título: **Anticuerpos específicos para el componente del complemento C4d y usos del mismo**

30 Prioridad:

09.09.2014 EP 14184140

27.01.2015 EP 15152765

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

26.09.2019

73 Titular/es:

SVAR LIFE SCIENCE AB (100.0%)

PO Box 50117

202 11 Malmö, SE

72 Inventor/es:

BLOM, ANNA y

OKRÓJ, MARCIN SEBASTIAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 725 703 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

Anticuerpos específicos para el componente del complemento C4d y usos del mismo

5 Campo de la invención

La invención se encuentra en el campo del diagnóstico médico y otras herramientas médicas, así como usos de los mismos. Más en particular, proporciona anticuerpos dirigidos específicamente contra un componente del sistema del complemento, lo que permite una determinación mejorada de la activación de la ruta clásica del complemento. Incluso más en particular, la invención proporciona medios y métodos para detectar la activación de la ruta clásica del complemento. Además, la invención proporciona medios y métodos para determinar la presencia del componente del complemento C4d en una muestra biológica.

Antecedentes de la invención

El sistema del complemento ayuda o “complementa” la capacidad de anticuerpos y células fagocíticas para eliminar patógenos de un organismo. Es parte del sistema inmunitario denominado sistema inmunitario innato [1] que no puede adaptarse y no cambia a lo largo del transcurso de la vida de un individuo. Sin embargo, puede reclutarse rápidamente y ponerse en acción mediante el sistema inmunitario adaptativo.

El sistema del complemento consiste en varias proteínas que se encuentran en la sangre, en general sintetizadas por el hígado, y que circulan normalmente como precursores inactivos (pro-proteínas). Cuando se estimulan por uno o varios factores desencadenantes, las proteasas del sistema escinden proteínas específicas liberando anafilotoxinas e inicialmente una cascada de amplificación de escisiones adicionales. El resultado final de esta cascada de activación es la amplificación masiva de la respuesta y la activación del complejo de ataque a la membrana que destruye las células. Más de 30 proteínas y fragmentos proteicos constituyen el sistema del complemento, incluyendo proteínas solubles que se encuentran en altas concentraciones en la sangre y receptores de membrana celular. Representan aproximadamente el 5% de la fracción de globulina del suero sanguíneo y pueden servir como opsoninas.

Las proteínas que constituyen el sistema del complemento se sintetizan principalmente por los hepatocitos. También se producen cantidades significativas en macrófagos tisulares, monocitos sanguíneos y células epiteliales del tracto genitourinario y el tracto gastrointestinal. El sistema del complemento puede iniciarse mediante tres rutas bioquímicas: la ruta clásica, la ruta alternativa y la ruta de lectina [2].

Las tres rutas de activación generan todas C3-convertasas proteolíticas análogas y la ruta terminal común que da como resultado la formación de ataque a la membrana. La ruta clásica del complemento requiere normalmente complejos antígeno:anticuerpo (complejos inmunitarios) para la activación, mientras que las rutas alternativa y de lectina de unión a manosa pueden activarse mediante hidrólisis C3 espontánea o hidratos de carbono sin la presencia de anticuerpos, respectivamente. En las tres rutas, la C3-convertasa escinde y activa el componente C3, creando C3a y C3b, y provocando una cascada de acontecimiento de escisión y activación adicionales.

La ruta clásica se desencadena por la activación del complejo C1. El complejo C1 se compone de una molécula de C1q, dos moléculas de C1r y dos moléculas de C1s, o C1qr²s². El complejo C1 se activa cuando C1q se une a IgM o IgG complejada con antígenos. Una única IgM puede iniciar la ruta, mientras que se necesitan múltiples IgG. Esto también se produce cuando C1q se une directamente a la superficie del patógeno. Tal unión conduce a cambios conformacionales en la molécula de C1q, lo que conduce a la activación de dos moléculas de C1r. C1r es una serina proteasa. C1r activada escinde C1s (otra serina proteasa). El componente C1r²s² separa ahora C4 y luego C2, produciendo C4a, C4b, C2a y C2b. C4b y C2a se unen formando la C3-convertasa de la ruta clásica (complejo C4b2a), que promueve la escisión de C3 para dar C3a y C3b; C3b posteriormente se une con C4b2a (la C3 convertasa) produciendo la C5 convertasa (complejo C4b2a3b).

C4b formado durante la activación de la ruta clásica se degrada entonces rápidamente por un factor I de serina proteasa, que en presencia de un cofactor tal como proteína de unión a C4b, genera C4d, el producto final de la degradación de C4b, que aparece sólo tras la activación de la ruta clásica del complemento. C4d es por tanto un marcador excelente para la activación clásica del complemento *in vivo* e *in vitro*. Recientemente, se describió C4d en sangre sistémica como marcador de diagnóstico y pronóstico de cáncer de pulmón [3]. Se ha usado ampliamente como marcador de lupus eritematoso sistémico (LES) [4] y rechazo de injerto mediado por anticuerpos [5]. Aunque la mayoría del C4d permanece unido a la superficie de la célula, que activaba originalmente la ruta clásica del complemento, cierta porción se libera y puede detectarse en la sangre. El esquema de la formación de C4d se presenta en la figura 1.

Con el fin de estudiar y comprender el papel de C4d y la activación de la ruta clásica que subyace a algunas enfermedades, existe la necesidad en la técnica de reactivos, normalmente anticuerpos, que sean específicos para C4d. La presente solicitud aborda esa necesidad.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo específicamente reactivo con el componente del complemento C4d y no con el componente del complemento C4b o C4 en el que el anticuerpo reacciona con un péptido que comprende un epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos NVTLSSTGR-COOH y no con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos NVTLSSTGRNGFK-COOH.

La invención también proporciona un método para generar un anticuerpo de este tipo en el que un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SSTGR-COOH se usa como inmunógeno.

La invención también proporciona un método para la detección del componente del complemento C4d en una muestra en el que la muestra se pone en contacto con un anticuerpo tal como se describe en el presente documento y en el que la unión entre el anticuerpo y C4d se detecta.

La invención también proporciona un método para el diagnóstico o pronóstico de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en cáncer de pulmón, LES, vasculitis y rechazo de injerto mediado por anticuerpos, en el que un anticuerpo tal como se describe en el presente documento se pone en contacto con una muestra de un individuo y en el que se concluye que el individuo tiene un riesgo aumentado de tener o desarrollar dicha enfermedad si la muestra contiene un nivel elevado de componente del complemento C4d en comparación con una muestra de un sujeto de control.

La invención también proporciona un método para monitorizar la actividad de una enfermedad en el que la enfermedad se caracteriza por exacerbaciones de la actividad de la enfermedad. Tal enfermedad puede seleccionarse del grupo que consiste en LES, vasculitis y rechazo de injerto mediado por anticuerpos, en el que un anticuerpo tal como se describe en el presente documento se pone en contacto con una muestra de un individuo y en el que el nivel de C4d presente en la muestra se monitoriza a lo largo del tiempo.

La invención también proporciona un método para determinar la eficacia del tratamiento de una enfermedad. En particular si la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, LES, vasculitis y rechazo de injerto mediado por anticuerpos. En un método de este tipo, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento se pone en contacto con una muestra tomada de un individuo antes y después del tratamiento y se concluye que el individuo responde al tratamiento si la muestra tomada tras el tratamiento tiene un nivel disminuido o inferior de C4d en comparación con el nivel de C4d en la muestra tomada antes del tratamiento.

Descripción detallada de la invención

Se conocen anticuerpos reactivos con C4d en la técnica y disponibles comercialmente. Sin embargo, con el fin de que sean útiles como reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de C4d, es imprescindible que el anticuerpo sea específico para C4d libre generado como resultado de la activación del complemento, lo que significa que reconoce sólo C4d y no C4b o C4. Puesto que C4d es un fragmento de C4b y C4, esto no es una tarea menor.

Se ha razonado [6-8] que las proteínas del complemento activadas expresarían determinados epítopos conformacionales, que no están presentes en sus moléculas originales. Tales epítopos se denominan a menudo neo-epítopos. Están disponibles comercialmente anticuerpos contra neo-epítopos en C4d de Quidel Corporation (12544 High Bluff Drive, Suite 200, San Diego, CA 92130, EE. UU., tal como el anticuerpo A251, que es la base del kit de EIA de C4d MicroVue™ comercializado por Quidel Specialty Products. El ELISA de C4d MicroVue de Quidel es un ensayo recomendado por la International Complement Society como prueba para la medición del fragmento C4d en suero o plasma [9]. Este ensayo se basa en el anticuerpo monoclonal anti-C4d A251 como anticuerpo de captura y emplea un anticuerpo policlonal de cabra anti-C4d como anticuerpo de detección. Se sometió a prueba la reactividad específica del anticuerpo A251 con C4d y se encontró que también reconoce a C4 y C4b (ejemplo 7, figura 2).

Otro ejemplo representativo de anticuerpos contra C4d es el anticuerpo Ab167093 (clon LP69) generado contra C4d purificado a partir de plasma humano. Este anticuerpo está disponible comercialmente de Abcam (330 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL, Reino Unido). Se sometió a prueba la especificidad de ese anticuerpo hacia C4d y también pareció reaccionar de manera cruzada con C4 y C4b (ejemplo 7, figura 3). Por tanto, parece que C4d purificado a partir de plasma humano no es una fuente adecuada para generar anticuerpos específicos de C4d.

Otro enfoque para generar anticuerpos específicos de C4d se basa en el uso de péptidos sintéticos de una secuencia interna de C4d como inmunógeno. Un ejemplo representativo de este grupo es el anticuerpo monoclonal de conejo Ab136921, clon A24-T, también disponible comercialmente de Abcam. Se sometió a prueba la especificidad del anticuerpo Ab136921 hacia C4d y también este anticuerpo pareció reaccionar de manera cruzada con C4 y C4b (ejemplo 7, figura 4).

Otro anticuerpo supuestamente reactivo de manera específica con C4d es un anticuerpo policlonal de conejo 12-5000 descrito en la referencia n.º 20 (Ali *et al.*). Este anticuerpo se obtuvo de American Research Products y se

sometió a prueba su especificidad hacia C4d. También este anticuerpo pareció reaccionar de manera cruzada con C4 y C4b (ejemplo 7, figura 16).

Por tanto, parece que tampoco pueden usarse péptidos internos de C4d como inmunógeno adecuado para obtener anticuerpos específicos de C4d.

Una categoría adicional de supuestos anticuerpos específicos de C4d son anticuerpos generados contra un péptido de la mitad C-terminal de C4d. Se sometieron a prueba tres ejemplos representativos de tales anticuerpos. El anticuerpo monoclonal de conejo 183311, clon SP91, disponible comercialmente de Abcam, tampoco era específico para C4d, ya que reacciona con C4 así como C4b (figura 5).

También se sometió a prueba un anticuerpo policlonal de un conejo inmunizado con un péptido C-terminal de C4d. Este anticuerpo (Ab 58781 disponible comercialmente de Abcam) tampoco es específico para C4d, ya que reacciona con C4 y C4b (figura 17).

También se sometió a prueba otro anticuerpo policlonal de un conejo inmunizado con un péptido C-terminal de C4d. Este anticuerpo (CPAMD2, número de catálogo AP15376PU-S, disponible comercialmente de Acris) tampoco es específico para C4d, ya que reacciona con C4 y C4b (figura 18). Estos resultados muestran que la inmunización con un péptido C-terminal derivado de C4d tampoco es una estrategia eficaz para obtener anticuerpos específicos para C4d, que no reaccionan de manera cruzada con C4b y/o C4.

Con el fin de obtener anticuerpos verdaderamente específicos contra C4d, se inmunizaron conejos con péptidos (dos conejos por péptido) correspondientes a 5 aminoácidos de las secuencias N-terminal y C-terminal de C4d, unidos a un espaciador de glicina/cisteína. Esto se detalla en el ejemplo 4. La secuencia de los dos péptidos usados para la inmunización fue:

Parte N-terminal de C4d: **NH2-TLEIPG**-GGC (SEC ID NO: 1)

Parte C-terminal C4d: CGG-**SSTGR-COOH** (SEC ID NO: 2)

Los aminoácidos que se muestran en negrita son parte de la secuencia de aminoácidos de C4d, los residuos de glicina y cisteína se usan como espaciadores. Los conejos n.º 1 y n.º 2 se inmunizaron con un péptido según SEQ ID NO: 1. Los conejos n.º 3 y n.º 4 se inmunizaron con un péptido según SEQ ID NO: 2. Agrisera AB (Suecia) realizó la inmunización y el sangrado y el antisuero recogido se sometió a prueba en ELISA para determinar la reactividad con C4, C4b y C4d en los mismos ensayos que se usaron anteriormente.

Ambos conejos n.º 3 y n.º 4, inmunizados con el péptido C-terminal, que comprende la secuencia SSTGR-COOH, produjeron anticuerpos específicos para C4d. Ambos reaccionaron igual de bien con C4d y no con C4 o C4b (solo se muestran los anticuerpos del conejo n.º 3 en la figura 6). Los dos sueros de los conejos n.º 3 y n.º 4 inmunizados con el péptido C-terminal CGGSSTGR-COOH (SEQ ID NO: 2) parecían tener una especificidad idéntica. Todos los experimentos descritos en el presente documento se realizaron con anticuerpos del conejo n.º 3, cuando se usaron anticuerpos del conejo n.º 4, proporcionaron resultados idénticos. Los anticuerpos del conejo n.º 3 se denominan en el presente documento adicionalmente anticuerpo BLOK C4d. Los anticuerpos de los dos conejos (n.º 1 y n.º 2) inmunizados con el péptido N-terminal que comprende la secuencia NH2-TLEIPG no reaccionaron con C4, C4b o C4d y se descartaron.

El epítipo reconocido por BLOK C4d se mapeó entonces en el extremo C-terminal distante de C4d, tal como se evidencia por la reactividad de BLOK C4d con el péptido Cys-NVTLSSTGR-COOH (SEQ ID NO: 3) y la ausencia de reactividad con el péptido Cys-NVTLSSTGRNGFK-COOH (SEQ ID NO: 4).

SEQ ID NO: 3 representa el extremo C-terminal distante de C4d con el grupo carboxilo libre, mientras que SEQ ID NO: 4 representa la unión entre el extremo C-terminal de C4d y C4c (véase la figura 1). Por tanto, se concluye que el anticuerpo BLOK C4d reconoce un epítipo específico para C4d, presente en el extremo C-terminal distante de C4d, que no está presente en su precursor C4b o C4.

Los anticuerpos anti-C4d disponibles comercialmente descritos anteriormente también se sometieron a prueba para determinar su reactividad con los péptidos según SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. Ninguno de los anticuerpos disponibles en el mercado eran reactivos con péptidos según SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Esto se presenta gráficamente en la figura 7.

Por tanto, la invención se refiere en un aspecto a un anticuerpo específicamente reactivo con un péptido que comprende un epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos NVTLSSTGR-COOH y no con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos NVTLSSTGRNGFK-COOH. Tales anticuerpos son específicamente reactivos con C4d y no con C4 o C4b.

La expresión “un anticuerpo específicamente reactivo con un péptido que comprende un epítipo que consiste en la

secuencia de aminoácidos NVTLSSTGR-COOH y no con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos NVTLSSTGRNGFK-COOH” se usa en el presente documento para indicar que el anticuerpo es específicamente reactivo con un epítipo en el extremo-C terminal de C4d que comprende los aminoácidos SSTGR y un residuo de arginina C-terminal libre (indicado como R-COOH). Además, la expresión describe un anticuerpo específicamente reactivo con un péptido que comprende un epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos NVTLSSTGR-COOH y no con el mismo péptido que solo difiere en un tramo adicional de 4 aminoácidos C-terminales (NGFK), es decir, el mismo péptido que comprende una secuencia de aminoácidos NVTLSSTGRNGFK-COOH.

En términos aun nuevamente diferentes, el anticuerpo según la invención puede describirse como un anticuerpo reactivo con un epítipo comprendido en el péptido NVTLSSTGR-COOH y no en NVTLSSTGRNGFK-COOH.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo específicamente reactivo con el componente del complemento C4d y no con el componente del complemento C4b, en el que el anticuerpo reacciona con un péptido que comprende un epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos NVTLSSTGR-COOH y no con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos NVTLSSTGRNGFK-COOH.

Tales anticuerpos pueden prepararse ahora empleando métodos de inmunización convencionales conocidos en la técnica. En una realización preferida, tales anticuerpos son anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales se conocen por su alta avidez y unión alta de afinidad a sus antígenos diana. En otra realización preferida, un anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal de ratón, rata o conejo. Tales anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que pueden producirse en un suministro ilimitado mientras se mantiene la calidad del anticuerpo.

Pueden obtenerse anticuerpos según la invención mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, en los que se usa como inmunógeno un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SSTGR-COOH. En otras palabras, la invención se refiere a un método para generar un anticuerpo tal como se describió anteriormente, en el que se usa como inmunógeno un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SSTGR-COOH. La invención en otro aspecto, por tanto, se refiere a un anticuerpo que puede obtenerse mediante tal método.

Los anticuerpos así generados tenían ventajas considerables con respecto a los anticuerpos de la técnica anterior y presentaban algunas propiedades inesperadas tal como se describirá en el presente documento.

El kit de EIA de C4d MicroVue™ de Quidel (cat. A008) en el que se usa el anticuerpo A251 como anticuerpo de captura, lo recomienda la International Complement Society como prueba para la medición del fragmento C4d en suero o plasma [6]. Se encuentra que este ensayo adolece de una serie de defectos e inconvenientes. Lo primero de todo, proporciona resultados inconsistentes cuando se realiza con muestras que se congelan y descongelan varias veces. Se muestran en el presente documento los resultados obtenidos con dos muestras (n.º 1 y n.º 8) que se descongelaron y congelaron 12 veces. Estas muestras mostraron niveles de C4d que aumentaron con un número creciente de ciclos de congelación y descongelación (figura 8). Cuando estas mismas muestras se analizaron en un ensayo de tipo sándwich en el que se usó el anticuerpo BLOK C4d como un anticuerpo de captura, los resultados fueron consistentes y no variaron con el número creciente de ciclos de congelación y descongelación (figura 9).

Otro inconveniente del kit de EIA de C4d MicroVue™ de Quidel disponible comercialmente es que no pueden usarse sueros inactivados por calor. Cuando se sometió a prueba un suero humano normal (NHS) antes y después de la inactivación por calor, el ensayo de Quidel provocó una gran reacción de falsos positivos, mientras que el ensayo de tipo sándwich con el anticuerpo BLOK C4d no lo hizo (figura 10).

Los datos presentados en la figura 10 también muestran que el ensayo que emplea el anticuerpo BLOK C4d tenía una razón de señal con respecto a ruido mucho mayor y, por tanto, mejor; mientras que el ensayo MicroVue™ de Quidel produjo una razón de señal con respecto a ruido de 10 (patrón alto/patrón bajo), el ensayo de ELISA de tipo sándwich que emplea BLOK C4d como anticuerpo de captura produjo una razón de señal con respecto a ruido de 300 cuando se usaron los mismos patrones alto y bajo.

Los anticuerpos según la invención permitieron, por tanto, la producción de un ensayo mejorado para la detección de C4d. Por tanto, la invención también se refiere a un método *in vitro* para la detección del componente del complemento C4d en una muestra en la que la muestra se pone en contacto con un anticuerpo tal como se describió anteriormente y en el que se detecta la unión entre el anticuerpo y C4d.

En una realización ventajosa, la invención se refiere a un método tal como se describió anteriormente, en el que la muestra es una muestra de sangre, suero, plasma, líquido sinovial o licor. El método según la invención puede proporcionar resultados particularmente buenos cuando la muestra se inactiva por calor o se descongela varias veces tal como es el caso a menudo con muestras de archivo de estudios clínicos.

El anticuerpo según la invención puede usarse en varios formatos de ensayos inmunológicos. Su uso en ELISA, RIA, EIA e inmunohistoquímica se prefiere particularmente.

Además, se emprendió una evaluación de la activación de la ruta clásica del complemento en pacientes con leucemia que se someten a tratamiento con rituximab. El rituximab, cuando se une a células cancerosas que portan CD20, se une al complejo C1 y activa directamente la ruta clásica.

Se midió el nivel de C4d en las muestras obtenidas antes y después de la infusión con Rituximab y también se determinó el nivel del complejo del complemento terminal (TCC), un marcador de activación más posterior de la ruta clásica.

Se genera TCC tal como sigue. La C3-convertasa activa C3 que genera C3b, que luego se une a la C3-convertasa cambiando su especificidad para convertirse en C5-convertasa. Este complejo enzimático activa C5 a C5b, que interacciona con C6, C7, C8 y C9 para formar TCC, que se inserta en las membranas celulares provocando muerte celular. Algunos de los complejos C5b-9 permanecen en la disolución y pueden medirse mediante ELISA [10].

Cuando una molécula tal como Rituximab activa la ruta clásica se esperaría una correlación entre C4d generado (de manera temprana en la ruta) y TCC (final de la ruta).

Se obtuvieron muestras de plasma de pacientes con linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica (LCC) del Hospital universitario Karolinska de Estocolmo, que se trataron con AcM anti-CD20 (Rituximab™). Se recogieron muestras solo de pacientes sin tratamiento previo con Rituximab. Se obtuvieron muestras de 11 pacientes recogidas junto antes y después de la infusión con Rituximab y se sometieron a prueba en un C4d ELISA de C4d según la invención empleando el anticuerpo BLOK C4d, y en ensayo MicroVue™ de C4d de Quidel. El aumento en el nivel de C4d en las muestras antes y después del tratamiento con Rituximab se determinó para ambos ensayos y se comparó con el nivel de complejo del complemento terminal (TCC).

Las figuras 11 y 12 muestran el aumento de C4d tal como se mide en los dos ELISA de C4d respectivamente, representados gráficamente frente a los resultados obtenidos con el ELISA de TCC. Se encontró que los datos obtenidos en el ELISA de C4d según la invención se correlacionaban bien con el ensayo de TCC (r de Spearman = 0,88, $p = 0,0007$, figura 11) mientras que los datos de C4d obtenidos con el ensayo de Quidel no se correlacionaban con los datos de TCC (r de Spearman = -0,29, $p = 0,38$, figura 12).

Se concluye que los anticuerpos y métodos según la invención son más adecuados para detectar C4d en muestras biológicas que los anticuerpos y métodos de la técnica anterior.

El componente del complemento C4d se describió recientemente como marcador de diagnóstico y pronóstico para varias enfermedades, tales como LES, rechazo de injerto mediado por anticuerpos, artritis reumatoide, vasculitis, nefritis, síndrome antifosfolípido, esclerodermia, Síndrome de Sjögrens, miositis, cáncer de pulmón y tumores hematológicos.

El lupus eritematoso sistémico es un trastorno autoinmunitario crónico con etiología compleja e implicación de múltiples órganos. Hay evidencias de que la patología de LES está relacionada con defectos en el sistema del complemento, ya que la función de eliminación del complemento se ve comprometida (Pickering *et al.*, 2000). Por otro lado, autoantígenos, de los que el cuerpo no puede deshacerse durante el transcurso del LES, mantienen el potencial de activación de complemento exacerbando de ese modo la enfermedad (Leffler *et al.*, 2012).

LES se caracteriza por periodos repetidos de manifestaciones clínicas potenciadas denominados brotes y periodos con intensidad de la enfermedad inferior denominados remisión. Puesto que no existe tratamiento curativo para LES, el objetivo de la intervención terapéutica es minimizar el daño orgánico contrarrestando los síntomas de los brotes. Se usa una serie extensa de biomarcadores, incluyendo la medición de los niveles totales de proteínas C3 y C4 del complemento para diagnosticar y monitorizar LES, pero ninguno de ellos es fiable en la predicción de brotes.

Se investigó por tanto si los anticuerpos y métodos según la invención podían predecir brotes de LES y se encontró que de hecho podían predecir y determinar de manera precisa si un paciente con LES experimentaba un brote de la enfermedad. Estos experimentos se describen en el ejemplo 12.

La invención se refiere por tanto a un método *in vitro* para monitorizar el estado clínico de un individuo con lupus eritematoso sistémico en el que un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 o 6 se pone en contacto con una muestra del individuo. Una monitorización de este tipo puede incluir predecir o diagnosticar un brote en la actividad de la enfermedad.

Puesto que se ha establecido ahora que el anticuerpo según la invención permite un ensayo más preciso y específico para C4d, el anticuerpo según la invención puede usarse ventajosamente en un método para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en LES, rechazo de injerto mediado por anticuerpos, artritis reumatoide, esclerodermia, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, vasculitis, nefritis, síndrome antifosfolípido, síndrome de Sjögrens, miositis, cáncer de pulmón y tumores hematológicos, en el que un anticuerpo según la invención se pone en contacto con una muestra de un individuo y en el que se concluye

que el individuo tiene un riesgo aumentado de tener o desarrollar dicha enfermedad si la muestra contiene un nivel elevado de componente del complemento C4d en comparación con un nivel de referencia predeterminado. Un experto es muy consciente de los diversos modos para obtener un valor de referencia, por ejemplo a partir de una muestra de un sujeto de control.

La invención también proporciona un método para monitorizar la actividad de una enfermedad en el que la enfermedad se caracteriza por brotes de la actividad de la enfermedad. Tal enfermedad puede seleccionarse del grupo que consiste en LES, vasculitis y rechazo de injerto mediado por anticuerpos, en el que un anticuerpo tal como se describe en el presente documento se pone en contacto con una muestra de un individuo y en el que el nivel de C4d presente en la muestra se monitoriza a lo largo del tiempo.

La invención también proporciona un método para determinar la eficacia del tratamiento de una enfermedad. En particular si la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, tumores hematológicos, LES, vasculitis y rechazo de injerto mediado por anticuerpos. La determinación de la eficacia del tratamiento puede realizarse de diferentes modos. Por ejemplo, el tratamiento para tumores hematológicos hace uso del complemento como mecanismo efector, de modo que las células tumorales se destruyen mediante el complemento. Por tanto, la respuesta clínica al fármaco está asociada con la activación del complemento y en consecuencia con C4d superior. En muchas otras enfermedades, tales como las enumeradas anteriormente, niveles elevados de C4d son un rasgo distintivo de activación del complemento patológica, espontánea y el tratamiento se dirige a la eliminación del factor patógeno, lo que posteriormente da como resultado la eliminación de la activación de complemento sobre esta diana. En un método de este tipo, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento se pone en contacto con una muestra tomada de un individuo antes y después del tratamiento y se concluye que el individuo responde al tratamiento si la muestra tomada tras el tratamiento tiene un nivel disminuido o inferior de C4d en comparación con el nivel de C4d en la muestra tomada antes del tratamiento.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Procesamiento del componente del complemento C4b para dar C4c y C4d.

Figura 2: Reactividad del anticuerpo monoclonal de ratón A251 (Quidel) con los componentes del complemento inmovilizados C4, C4b y C4d.

Figura 3: Reactividad del anticuerpo monoclonal de ratón LP69 (Abcam) con los componentes del complemento inmovilizados C4, C4b y C4d.

Figura 4: Reactividad del anticuerpo monoclonal de conejo A24-T (Abcam) con los componentes del complemento inmovilizados C4, C4b y C4d.

Figura 5: Reactividad del anticuerpo monoclonal de conejo SP91 (Abcam) con los componentes del complemento inmovilizados C4, C4b y C4d.

Figura 6: Reactividad del suero del conejo n.º 3 inmunizado con un péptido que comprende el epítipo C-terminal SSTGR-COOH de C4d con los componentes del complemento inmovilizados C4, C4b y C4d. El suero del conejo n.º 4 produjo resultados idénticos y los sueros n.º 3 y n.º 4 se combinaron para formar el anticuerpo BLOK C4d.

Figura 7: Gráfico que muestra la reacción específica del anticuerpo BLOK C4d con el péptido NVTSSSTGR-COOH contenido en C4d y la ausencia de reactividad con el péptido NVTSSSTGRNGFK, que solo aparece en C4b.

Figura 8: Gráfico que muestra la reactividad del ELISA de C4d MicroVue™ de Quidel con un número creciente de ciclos de congelación/descongelación.

Figura 9: Gráfico que muestra la reactividad del ELISA de tipo sándwich empleando el anticuerpo BLOK C4d con un número creciente de ciclos de congelación/descongelación.

Figura 10: Gráfico que muestra una comparación de los resultados en el ensayo MicroVue™ de Quidel y un ELISA de tipo sándwich que emplea el anticuerpo BLOK C4d en el que se sometieron a ensayo un patrón bajo y alto (0 y 242 ng/ml respectivamente) y un suero humano normal (NHS) y un suero humano normal inactivado por calor.

Figura 11: Gráfico que muestra la correlación de los resultados del ELISA de BLOK C4d con los resultados del ELISA de TCC en 11 pacientes con leucemia tratados con Rituximab™.

Figura 12: Gráfico que muestra la correlación de los resultados del ELISA de C4d MicroVue™ de Quidel con los resultados del ELISA de TCC en 11 pacientes con leucemia tratados con Rituximab™.

Figura 13: Gráfico que muestra la reactividad del anticuerpo BLOK C4d con suero humano normal activado con IgG en presencia de cantidades crecientes (0, 0,5, 1 y 2 microlitros) de anticuerpo bloqueante del factor I.

Figura 14: Niveles de C4d en sueros de pacientes con LES tomados en remisión y en brotes de la enfermedad. Se muestran los niveles de C3 y C4 en los mismos sueros para comparación.

5 Figura 15: Comparación de los niveles de C4d en sueros de pacientes con LES apareando el resultado de brotes-remisión del mismo paciente.

Figura 16: Reactividad del anticuerpo policlonal de conejo 12-5000 de American Research Products con componentes del complemento inmovilizados C4, C4b y C4d.

10 Figura 17: Reactividad del anticuerpo policlonal de conejo 58781 de Abcam con componentes del complemento inmovilizados C4, C4b y C4d.

15 Figura 18: Reactividad del anticuerpo policlonal de conejo 15376, número de catálogo AP15376PU-S de Acris con componentes del complemento inmovilizados C4, C4b y C4d.

Figura 19: Reactividad del anticuerpo BLOK C4d con sueros de pacientes seleccionados.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de proteína C4d.

25 Una disolución de C4b 200 microgramos/ml (Complement Technology Inc. 4801 Troup Hwy, Suite 701, Tyler, Texas 75703 EE.UU., n.º de cat. A108, lote n.º 5c) mezclada con factor I purificado en plasma 20 microgramos/ml [11] y C4BP purificado en plasma 400 microgramos/ml [12] en un volumen final de 50 microlitros en solución salina tamponada con Tris pH 8,0 se incubó a 37°C durante 5 horas.

Ejemplo 2: ELISA con C4 y sus fragmentos C4b y C4d

30 Se recubrieron placas de microtitulación (Maxisorp, Nunc) durante la noche a temperatura ambiente (RT). Se añadieron a cada pocillo cincuenta microlitros de una disolución de 5 microgramos/ml de C4 en PBS (Complement Technology, n.º de cat. A105, lote n.º 22a) o preparación de C4b (Complement Technology, n.º de cat. A108, lote n.º 5c) o C4d, obtenidos tal como se describe en ejemplo 1. Entonces se lavó la placa de microtitulación con tampón de lavado (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1%), y se bloqueó con 200 microlitros de tampón de bloqueo (BSA al 1% en tampón de lavado) durante 2 horas a TA. Se añadieron sueros o anticuerpos purificados, diluidos 1:1000 en 50 microlitros de tampón de bloqueo durante 1 hora y se incubaron a TA, seguido por lavado e incubación con 50 microlitros de anticuerpo de cabra anti-conejo-HRP (Dako) diluido en el mismo tampón de bloqueo. Tras el lavado final, se añadieron 50 microlitros de la disolución de comprimidos de OPD convencionales (Dako, preparados según las instrucciones del fabricante) a los pocillos y se detuvo la reacción colorimétrica con H₂SO₄ 0,5 M una vez que se obtuvo el color satisfactorio. Se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas (Varian).

Ejemplo 3: Inmunización de conejos

45 Se inmunizaron conejos con péptidos (dos conejos por péptido) correspondientes a 5 aminoácidos de las secuencias N-terminal y C-terminal de C4d, que se alargaron con un espaciador de glicina/cisteína. La secuencia de los dos péptidos usados para la inmunización era: Parte de C4d N-terminal: NH₂-TLEIPGGGC (SEQ ID NO: 1) y parte de C4d C-terminal: CGGSSTGR-COOH (SEQ ID NO: 2).

50 Innovagen AB (Suecia) sintetizó los péptidos usando química de F-moc convencional. Entonces se acoplaron los péptidos a hemocianina de lapa californiana. Se realizó la inmunización según protocolos convencionales de Agrisera AB. En resumen, se inmunizaron conejos a t=0 con 200 microgramos de péptido en adyuvante completo de Freund (FCA) seguido por inyecciones de refuerzo de 200 microgramos de péptido en adyuvante incompleto de Freund (FIA) a t=27 días, seguido por dos inyecciones de refuerzo de 100 microgramos de péptido en FIA a t=54 y t=81 días. Se extrajo sangre de los animales y se sacrificaron a t=92 días.

55 Los sueros de los dos conejos inmunizados con el péptido C-terminal tenían una especificidad similar y se les denomina en el presente documento anticuerpo BLOK C4d.

Ejemplo 4: Especificidad del anticuerpo BLOK C4d.

60 Se estableció la especificidad de BLOK C4d determinando su reactividad con muestras en las que la formación de C4d se bloqueó mediante un anticuerpo contra el factor I (anticuerpo monoclonal de ratón frente a factor I humano (n.º 1) Quidel Corp., EE.UU.). El factor I del complemento (fi) es una proteína del sistema del complemento, aislado por primera vez en 1966 en suero de cobaya [14] que regula la activación del complemento escindiendo C3b y C4b unidos a células o en fase fluida [15]. Cuando se bloquea el factor I, la formación de C4d a partir de C4b se bloquea.

Se mezclaron dos microlitros de suero humano normal con 0, 0,5, 1 y 2 microlitros del anticuerpo frente al factor I (1,2 mg/ml) y se incubaron durante 5 minutos sobre hielo. Se añadieron dos microlitros de IgG agregada por calor (10 mg/ml) y se mezclaron con 25 microlitros de PBS que contenía Mg y Ca 1 mM y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Entonces se diluyó la mezcla con tampón EDTA-GVB 40 mM hasta 300 microlitros. Se usaron cincuenta microlitros de esta preparación por pocillo de la placa de microELISA preparada según el ejemplo 6.

Se observó que el nivel de C4d de las muestras disminuyó con la cantidad creciente de anticuerpo de bloqueo de factor I (figura 13).

Se concluyó que el anticuerpo BLOK C4d era específico para C4d puesto que no mostró ninguna reactividad con muestras que contenían todos los componentes de la ruta clásica del complemento, excepto C4d.

Experimentos de control realizados con suero humano inactivado por calor no mostraron señal, mientras que se obtuvo una señal del 100% en muestras en las que se reemplazó el anticuerpo contra el factor I por una cantidad equivalente de anticuerpo de control (MK54 contra proteína S).

Ejemplo 5: Preparación de reactivos

Se preparó suero humano normal (NHS) inactivado por calor mediante incubación de NHS a 56°C durante 60 min con el fin de inactivar el complemento.

Se preparó IgG inactivada por calor calentando una disolución de IgG (Immuno, Austria) de 10 mg/ml en PBS a 63°C durante 30 minutos. Tras la centrifugación a 15.000 x G durante 5 minutos, se desechó el sedimento.

Se preparó un patrón mezclando 2 microlitros de NHS con 2 microlitros de IgG agregada por calor (10 mg/ml), se diluyó hasta 25 microlitros con tampón PBS que contenía Mg y Ca 1 mM y se incubó durante 1 h a 37°C. Entonces se diluyó la mezcla hasta 200 microlitros con EDTA-GVB 40 mM (tampón veronal 2,075 mM pH 7,3, EGTA 10 mM, MgCl₂ 7 mM, gelatina al 0,083%, glucosa 116 mM, NaCl 60 mM). Se cargaron cincuenta microlitros de tal muestra por pocillo de ELISA y se definió que contenía 1 unidad arbitraria (UA) de C4d mientras que diluciones en serie de este patrón completaron la curva patrón. El tampón solo (EDTA-GVB 40 mM) se consideró como valor 0.

Ejemplo 6: Ensayo de captura de C4d

Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) durante la noche con 50 microlitros de anticuerpo BLOK C4d diluido 10 veces en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 que contenía azida de sodio al 0,02%. Se bloqueó la placa de microtitulación con 200 microlitros de tampón de bloqueo (gelatina de pescado al 3% (Nordic) en tampón de lavado) durante 1 h a 37°C. Tras lavar, se cargaron 50 microlitros de muestra y se incubaron durante 1 h a 37°C. Tras lavar, se aplicaron 50 microlitros de anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal de ratón anti-C4d, Quidel, n.º A213, diluido 1:1500 en tampón de bloqueo) seguido por otro ciclo de lavado y 50 microlitros de anticuerpo de cabra anti-ratón-HRP (Dako) diluido 1:1000 en tampón de bloqueo. Se añadieron cincuenta microlitros de la disolución de comprimidos de OPD convencional (Dako, preparada según las instrucciones del fabricante) a los pocillos y se detuvo la reacción colorimétrica con H₂SO₄ 0,5 M una vez que se obtuvo un color satisfactorio. Se midió la absorbancia a 490 nm en lector de microplacas. Se realizaron experimentos de control con anticuerpos purificados por afinidad tal como se describe en ejemplo 11, diluidos hasta una concentración final de IgG 3,5 microgramos/ml. Los anticuerpos purificados por afinidad dieron resultados idénticos que el anticuerpo BLOK C4d.

Ejemplo 7: Reactividad de anticuerpos anti-C4d comerciales y anticuerpo BLOK C4d.

Los anticuerpos comerciales usados en el presente documento fueron A251 de Quidel, n.º de lote 910499, clon LP69 de Abcam, n.º de producto ab167093, n.º de lote GR126509-6, clon A24-T de Abcam, n.º de producto ab136921, n.º de lote GR161597-2, clon SP91 de Abcam, n.º de producto ab183311, n.º de lote GR181800-1, anticuerpo policlonal de conejo anti-C4d 12-5000 de American Research Products, n.º de lote 41200, anticuerpo policlonal de conejo anti-C4d 58781 de Abcam, n.º de lote GR173176-3 y Ac policlonal de conejo anti-C4d CPAMD2, n.º de catálogo AP15376PU-S de Acris, n.º de lote 130618MC.

Se prepararon ensayos ELISA y se realizaron tal como se detalla en el ejemplo 2. Todos los anticuerpos se sometieron a prueba a 10 microgramos/ml, excepto por el anticuerpo SP91, que se diluyó 1:50, y Ac policlonal de conejo anti-C4d 58781 de Abcam, que el fabricante diluyó previamente y estaba listo para usar.

Se incubaron anticuerpos (50 microlitros), diluidos apropiadamente en tampón de bloqueo durante 1 h a 37°C seguido por lavado y 1 h de incubación con 50 microlitros de anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti - conejo-HRP de Dako diluidos 1:1000 para A24-T, SP91 y BLOK C4d o anticuerpo de cabra anti-ratón-HRP de Dako diluido 1:1000 para LP69 y A251, respectivamente). Tras el lavado final, se añadieron a los pocillos 50 microlitros de la disolución de comprimidos de OPD convencional (Dako, preparado según las instrucciones del fabricante) y se detuvo la reacción colorimétrica con H₂SO₄ 0,5 M una vez que se obtuvo un color satisfactorio. Se midió la absorbancia a 490 nm en lector de microplacas. Se calculó el resultado final restando de la lectura el control

negativo (medición a 490 nm cuando no se añadió Ac primario). Los resultados se muestran en las figuras 2 - 6 y 16 - 18.

Ejemplo 8: ELISA de péptidos

Se preparó un ELISA para la parte de C4d C-terminal recubriendo placas Maxisorp (Nunc) con 50 microlitros de PBS que contenía péptido 50 microgramos/ml con la secuencia Cys-NVTLSSTGR-COOH (SEQ ID NO: 3) o Cys-NVTLSSTGRNGFK (SEQ ID NO: 4) a 37°C durante 1 h.

Entonces se lavó la placa de microtitulación con tampón de lavado (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1%), y se bloqueó con 200 microlitros de tampón de bloqueo (BSA al 1% en tampón de lavado) durante 2 horas a RT. Se incubaron anticuerpos (50 microlitros) diluidos en tampón de bloqueo durante 1 h a 37°C seguido por lavado y 1 h de incubación con 50 microlitros de anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-conejo-HRP de Dako diluido 1:1000 para A24-T, SP91 y BLOK C4d o anticuerpo de cabra anti-ratón-HRP de Dako diluido 1:1000 para LP69 y A251, respectivamente). Tras el lavado final, se añadieron a los pocillos 50 microlitros de la disolución de comprimidos de OPD convencional (Dako, preparada según las instrucciones del fabricante) y se detuvo la reacción colorimétrica con H₂SO₄ 0,5 M una vez que se obtuvo un color satisfactorio. Se midió la absorbancia a 490 nm en lector de microplacas. Se calculó el resultado final restando de la lectura el control negativo (medición a 490 nm cuando no se añadió Ac primario).

Ejemplo 9: Grupo de pacientes con leucemia/linfoma.

Se diagnosticó a pacientes que padecen linfomas no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica (LLC) en el hospital universitario Karolinska en Estocolmo, Suecia y los gestionó el prof. Anders Österborg. De los pacientes cualificados para el tratamiento con rituximab (como terapia de un solo agente o junto con regímenes de quimioterapia), se recogieron muestras de EDTA-plasma inmediatamente antes y después de la primera infusión del fármaco a dosis terapéutica convencional (375 mg/m²).

Algunas de las muestras de plasma muestras se sometieron a prueba para determinar la estabilidad de la lectura de C4d a lo largo de los ciclos de congelación-descongelación. Para este fin, se tomaron alícuotas de 10 microlitros y se congelaron posteriormente a -80°C y se descongelaron a TA hasta alcanzar el estado líquido. Se repitió la congelación-descongelación según el número de ciclos deseado.

Ejemplo 10: Ensayo de TCC

Se realizó el ensayo de TCC se realizó con anticuerpo monoclonal de ratón anti C9-neoepítipo clon ae11 como anticuerpo de captura y anticuerpo monoclonal biotinilado anti-C6 clon 9C4 como anticuerpo de detección, tal como se describió anteriormente [13]. Se inmovilizaron cien microlitros de anticuerpo de captura por pocillo diluido en PBS que contenía azida de sodio al 0,02% en una placa Maxisorp (Nunc) a TA durante la noche. La detección del anticuerpo secundario se realizó con 100 microlitros de conjugado de estreptavidina-HRP (R&D, EE.UU.) por pocillo, después de eso se reveló el ensayo con comprimidos de OPD (Dako) y se midió la absorbancia a 490 nm.

Ejemplo 11: Purificación por afinidad del anticuerpo BLOK C4d

A pesar del hecho de que el anticuerpo BLOK C4d proporcionó excelentes resultados en cuanto a especificidad y sensibilidad, el anticuerpo puede purificarse incluso adicionalmente mediante purificación por afinidad usando péptidos tal como se describe en el presente documento. Un método particularmente ventajoso fue el siguiente.

Se usaron tres ml de antisuero BLOK C4d del conejo n.º 3 para purificar anticuerpos específicos de C4d con cromatografía de afinidad. Se conjugaron perlas Sulpholink (10 ml de perlas, Thermo Scientific) con 12 mg del péptido según SEQ ID NO: 3 (GenScript, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. Se equilibró la columna con tampón PBS y se cargó la muestra de antisuero. Después de lavar con PBS, se eluyó la fracción de unión a péptido con glicina 0,1 M, pH 2,5, y se neutralizó inmediatamente con 1/10 de volumen de Tris 1 M, pH 8,0. Las fracciones neutralizadas del eluato se cargaron sobre otra columna Sulpholink conjugada con un péptido según SEQ ID NO: 4 (GenScript, EE.UU.). Se usó esta columna para la selección negativa de anticuerpos, que potencialmente podían unirse a epítomos de los límites C4d-C4c (si los hubiera) y, por tanto, no son específicos para C4d. Se recogió la fracción no unida, se dializó frente a tampón PBS y se concentró usando un dispositivo de corte de 10 kDa (Vivaspin, EE.UU.).

Ejemplo 12: El anticuerpo BLOK C4d predice y diagnostica brotes de LES.

Noventa y ocho pacientes con LES que cumplían cuatro o más criterios de clasificación del American College of Rheumatology (Tan *et al.*, 1982), se incluyeron en el estudio. El plasma de los pacientes se había recogido en el Departamento de reumatología de Lund, Suecia, de 1984 a 2009. Se eligieron muestras de dos puntos de tiempo: un punto de tiempo en el que los pacientes tenían su índice de actividad de enfermedad de LES más alto 2000 (SLEDAI-2K, Gladmann, D., *et al.*, J. Rheumatol (2002) 29: 288-291), esto se definió como "brote", y muestras de

otro punto de tiempo, cuando los pacientes tenían la actividad de enfermedad más baja tal como evaluó un médico con experiencia, que se definió como “remisión”.

Estaba disponible un conjunto de datos con análisis de laboratorio de rutina (incluyendo mediciones de C3 y C4) para todas las muestras. Se incluyeron muestras de plasma de 77 donantes sanos como controles. Se midió el nivel de C4d en los pacientes y controles usando el ELISA de C4d basado en el anticuerpo BLOK tal como se describió en el ejemplo 6. Se usaron diluciones de C4d purificado del kit MicroVue de C4d de Quidel como patrón.

Cuando se analizaron todos los pacientes, pudo detectarse una fuerte diferencia significativa entre los niveles de C4d en el brote y la remisión (figura 14, $p = 0,0005$ mediante la prueba de Mann Whitney t , ***), en contraste con las diferencias en los niveles totales de C3 y C4. ($p = 0.063$ y 0.2065 , n.s.).

Cuando se realizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (en la que se tuvo en cuenta el apareamiento del resultado brote-remisión del mismo paciente) en el mismo conjunto de datos, pudo detectarse una fuerte diferencia significativa entre los niveles de C4d en el brote y la remisión (figura 15, $p = <0,0001$ ***). En contraste con eso, los niveles de C3 disminuyeron levemente durante el brote en comparación con la remisión y se volvieron significativos a un nivel mucho más bajo ($p = 0,0275$ *). Los niveles de C4 no fueron significativamente diferentes en absoluto ($p = 0,1085$, n.s.).

Se concluye que los anticuerpos frente a C4d y los métodos según la invención proporcionan un ensayo mejorado, que podía distinguir significativamente ($p < 0,05$) los brotes de LES de la remisión o bien cuando se realizó un análisis para toda la cohorte o bien con el apareamiento de los resultados de pacientes individuales.

Ejemplo 13: El anticuerpo BLOK C4d distingue a pacientes con artritis reumatoide, esclerodermia, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante de controles sanos.

Se obtuvieron muestras de 20 individuos que padecían o bien artritis reumatoide, esclerodermia, artritis psoriásica o bien espondilitis anquilosante. Un grupo de 20 individuos sanos sirvieron como controles. Estos sueros se sometieron a prueba en el ELISA de BLOK C4d tal como se describe en el presente documento. Se encontró que el anticuerpo BLOK C4d podía distinguir los grupos de pacientes de los controles normales (tabla 1 y figura 19).

Tabla 1: Reactividad del anticuerpo BLOK C4d con sueros de pacientes.

GRUPO	Tamaño del grupo N =	Media	Desv. est.	Valor de p *
Control normal	20	1,87	3,96	
Artritis reumatoide	20	38,05	28,02	< 0,001
Esclerodermia	20	20,10	13,73	< 0,001
Artritis psoriásica	20	34,86	19,72	< 0,001
Espondilitis anquilosante	20	24,07	12,88	< 0,001

* calculado para la comparación con el grupo de control sano (normal), según la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunn.

Bibliografía

1. Janeway CAJ, Traves P, Walport M: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5ª edición. The Immune System in Health and Disease 2001, Nueva York.

2. Walport MJ: Complement. First of two parts. The New England journal of medicine 2001, 344:1058-1066.

3. Ajona D, Pajares MJ, Corrales L, Perez-Gracia JL, Agorreta J, Lozano MD, Torre W, Massion PP, de-Torres JP, Jantus-Lewintre E, et al: Investigation of complement activation product c4d as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer. Journal of the National Cancer Institute 2013, 105:1385-1393.

4. Kalunian KC, Chatham WW, Massarotti EM, Reyes-Thomas J, Harris C, Furie RA, Chitkara P, Putterman C, Gross RL, Somers EC, et al: Measurement of cell-bound complement activation products enhances diagnostic performance in systemic lupus erythematosus. Arthritis and rheumatism 2012, 64:4040-4047.

5. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M: Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2014, 14:255-271.

6. Nuijens JH, Huijbregts CC, Eerenberg-Belmer AJ, Abbink JJ, Strack van Schijndel RJ, Felt-Bersma RJ, Thijs LG,

Hack CE: Quantification of plasma factor XIIa-Cl(-)-inhibitor and kallikrein-Cl(-)-inhibitor complexes in sepsis. Blood 1988, 72:1841-1848.

7. Garred P, Mollnes TE, Lea T, Fischer E: Characterization of a monoclonal antibody MoAb bH6 reacting with a neoeptope of human C3 expressed on C3b, iC3b, and C3c. Scandinavian journal of immunology 1988, 27:319-327.

8. Mollnes TE, Lea T, Harboe M, Tschopp J: Monoclonal antibodies recognizing a neoantigen of poly(C9) detect the human terminal complement complex in tissue and plasma. Scandinavian journal of immunology 1985, 22:183-195.

9. Bergseth G, Ludviksen JK, Kirschfink M, Giclas PC, Nilsson B, Mollnes TE: An international serum standard for application in assays to detect human complement activation products. Molecular immunology 2013, 56:232-239.

10. Deppisch R, Schmitt V, Bommer J, Hansch GM, Ritz E, Rauterberg EW: Fluid phase generation of terminal complement complex as a novel index of bioincompatibility. Kidney international 1990, 37:696-706.

11. Blom AM, Kask L, Dahlbäck B: CCP1-4 of the C4b-binding protein a-chain are required for Factor I mediated cleavage of C3b. Mol Immunol 2003, 39:547-556.

12. Dahlbäck B: Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. Biochem J 1983, 209:847-856.

13. Mollnes TE, Redl H, Hogasen K, Bengtsson A, Garred P, Spielberg L, Lea T, Oppermann M, Gotze O, Schlag G: Complement activation in septic baboons detected by neoeptope-specific assays for C3b/iC3b/C3c, C5a and the terminal C5b-9 complement complex (TCC). Clinical and experimental immunology 1993, 91:295-300.

14. Nelson R, Jensen J, Gigli I, Tamura N (1966). "Methods for the separation, purification and measurement of nine components of hemolytic complement in guinea-pig serum". Immunochemistry 3 (2): 111-35.

15. Lachmann P, Müller-Eberhard H (1968). "The demonstration in human serum of "conglutinin-activating factor" and its effect on the third component of complement". Journal of Immunology 100 (4): 691-8.

16. Leffler J., Martin M., Gullstrand B., Tyden H., Lood C., Truedsson L., Bengtsson A. A. and Blom A. M., 2012. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. J Immunol 188, 3522-31.

17. Pickering M. C., Botto M., Taylor P. R., Lachmann P. J. and Walport M. J., 2000. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. Advances in immunology 76, 227-324.

18. Tan E. M., Cohen A. S., Fries J. F., Masi A. T., McShane D. J., Rothfield N. F., Schaller J. G., Talal N. and Winchester R. J., 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis and rheumatism 25, 1271-7.

19. Gladmann D.D., Ibanez D. and Urowitz M.B., Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. J. Rheumatol., 2002 29(2): 288-291.

20. Ali, S.A. *et al.*, Frequent expression of C4d in hepatic graft-versus-host disease: Potential clue for diagnosis and distinguishing acute and chronic form, Transplant Immunology, 23: 77-80 (2010).

Lista de secuencias

<110> Euro-Diagnostica AB

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA EL COMPONENTE DEL COMPLEMENTO C4d Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 291 WO

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 1

Thr Leu Glu Ile Pro Gly Gly Gly Cys

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> *Homo Sapiens*

 <400> 2
 Cys Gly Gly Ser Ser Thr Gly Arg
 1 5
 10 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 15 <400> 3
 Asn Val Thr Leu Ser Ser Thr Gly Arg
 1 5

 <210> 4
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

 <400> 4
 Asn Val Thr Leu Ser Ser Thr Gly Arg Asn Gly Phe Lys
 1 5 10
 25

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo específicamente reactivo con el componente del complemento C4d y no con el componente del complemento C4b o C4, en el que el anticuerpo reacciona con un péptido que comprende un epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos NVTLSSTGR-COOH y no con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos NVTLSSTGRNGFK-COOH, caracterizado porque dicho anticuerpo puede unirse específicamente a un epítipo en el extremo C-terminal de C4d que comprende la secuencia de aminoácidos SSTGR-COOH.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo policlonal.
4. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, que es un anticuerpo de ratón, rata o conejo.
5. Método para generar un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que se inmuniza un animal no humano con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SSTGR-COOH.
6. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que puede obtenerse mediante un método según la reivindicación 5.
7. Método *in vitro* para la detección del componente del complemento C4d en una muestra, en el que la muestra se pone en contacto con un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 o 6 y en el que la unión entre el anticuerpo y C4d se detecta.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la muestra es una muestra de sangre, suero, plasma, líquido sinovial o licor.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que la muestra se inactiva por calor.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 9, que se selecciona del grupo que consiste en ELISA, RIA, EIA e inmunohistoquímica.
11. Método *in vitro* para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en LES, rechazo de injerto mediado por anticuerpos, artritis reumatoide, esclerodermia, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, vasculitis, nefritis, síndrome antifosfolípido, síndrome de Sjogrens, miositis, cáncer de pulmón y tumores hematológicos, en el que un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 o 6 se pone en contacto con una muestra de un individuo y en el que se concluye que el individuo tiene un riesgo aumentado de tener o desarrollar dicha enfermedad si la muestra contiene un nivel elevado de componente del complemento C4d en comparación con un nivel de referencia predeterminado.
12. Método *in vitro* método para monitorizar la actividad de una enfermedad en un individuo, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en LES, vasculitis y rechazo de injerto mediado por anticuerpos, en el que un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 o 6 se pone en contacto con una muestra del individuo y en el que el nivel de C4d presente en la muestra se monitoriza a lo largo del tiempo.
13. Método *in vitro* método para determinar la eficacia del tratamiento de una enfermedad en un individuo, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, LES, vasculitis y rechazo de injerto mediado por anticuerpos y en el que un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 o 6 se pone en contacto con una muestra tomada de un individuo antes y después del tratamiento y en el que se concluye que el individuo responde al tratamiento si la muestra tomada tras el tratamiento tiene un nivel disminuido o inferior de C4d en comparación con el nivel de C4d en la muestra tomada antes del tratamiento.
14. Kit para la detección del componente del complemento C4d, que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 o 6 inmovilizado sobre un soporte sólido y un reactivo para la detección de complejos inmunitarios.
15. Método *in vitro* para predecir o diagnosticar un brote en la actividad de una enfermedad en un individuo con lupus eritematoso sistémico, en el que un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 o 6 se pone en contacto con una muestra del individuo.

Figura 1

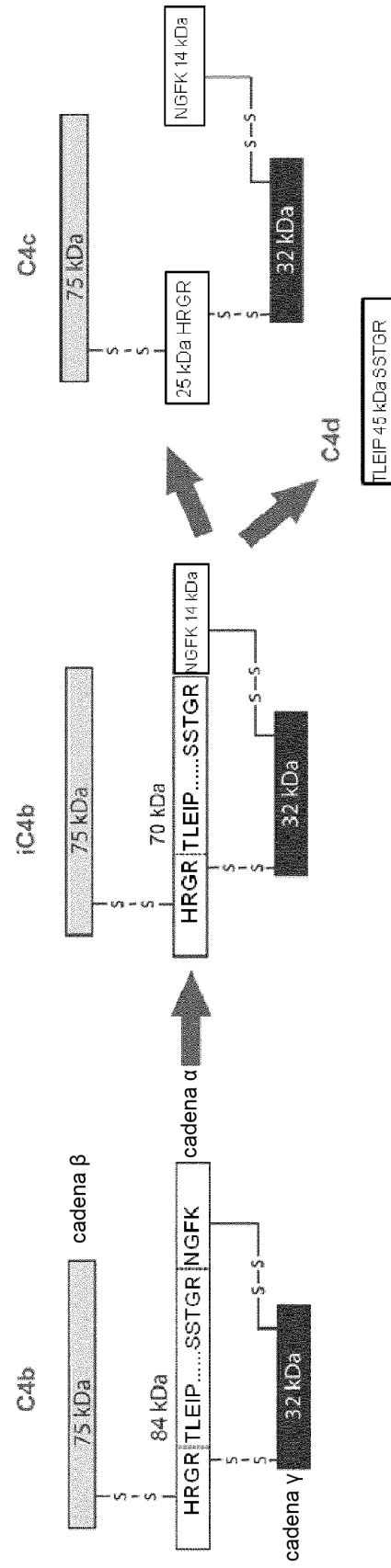


Figura 2

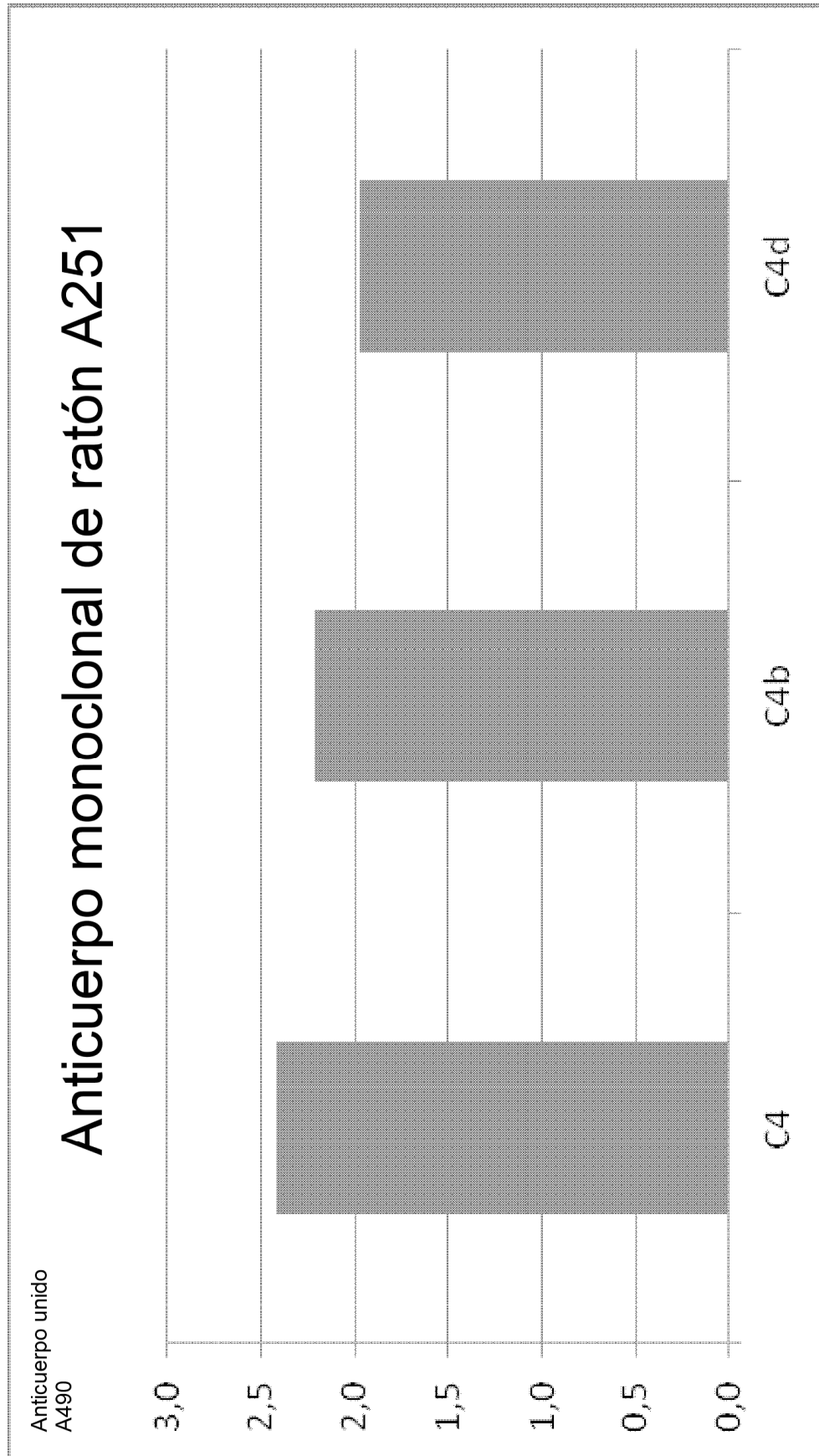


Figura 3

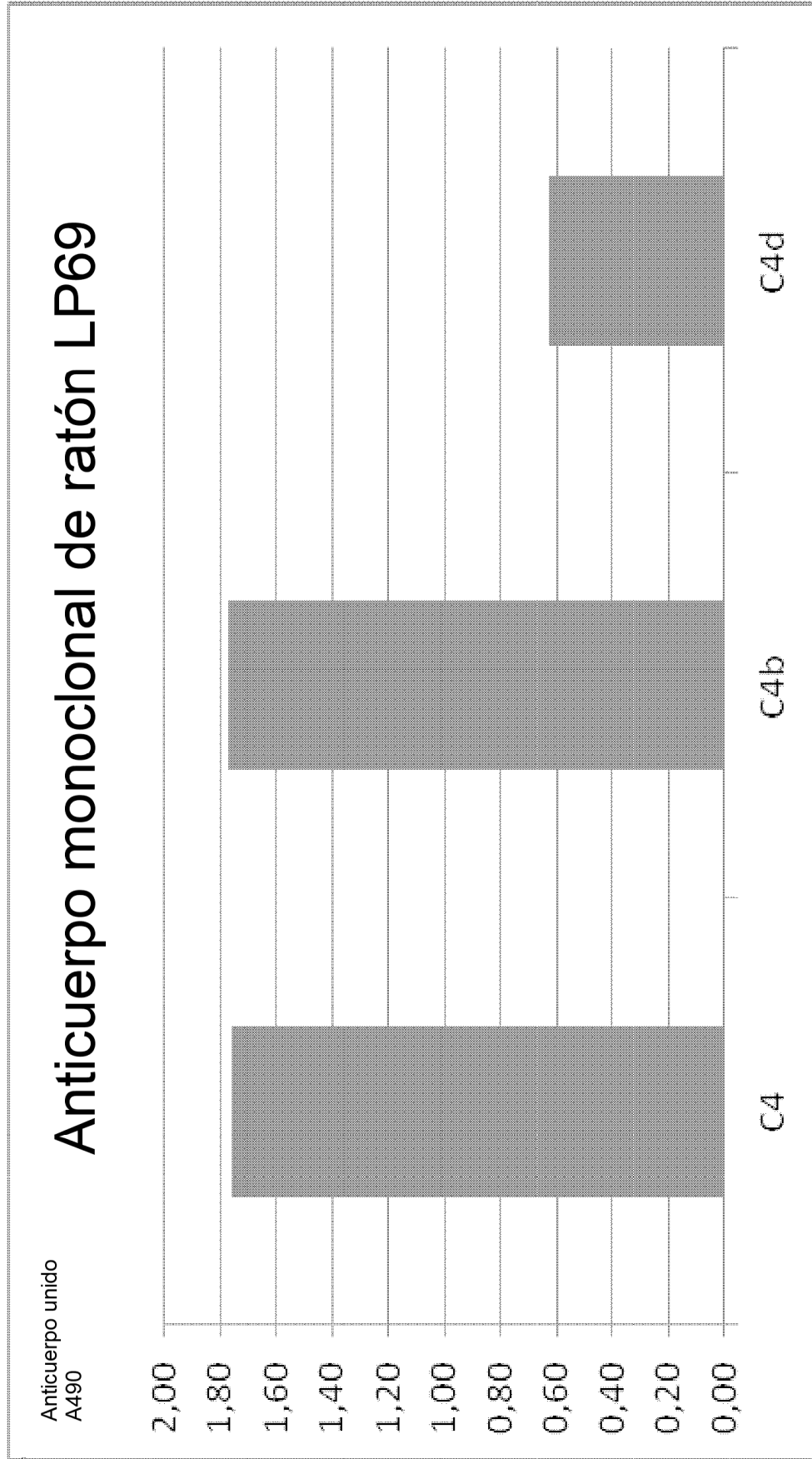


Figura 4

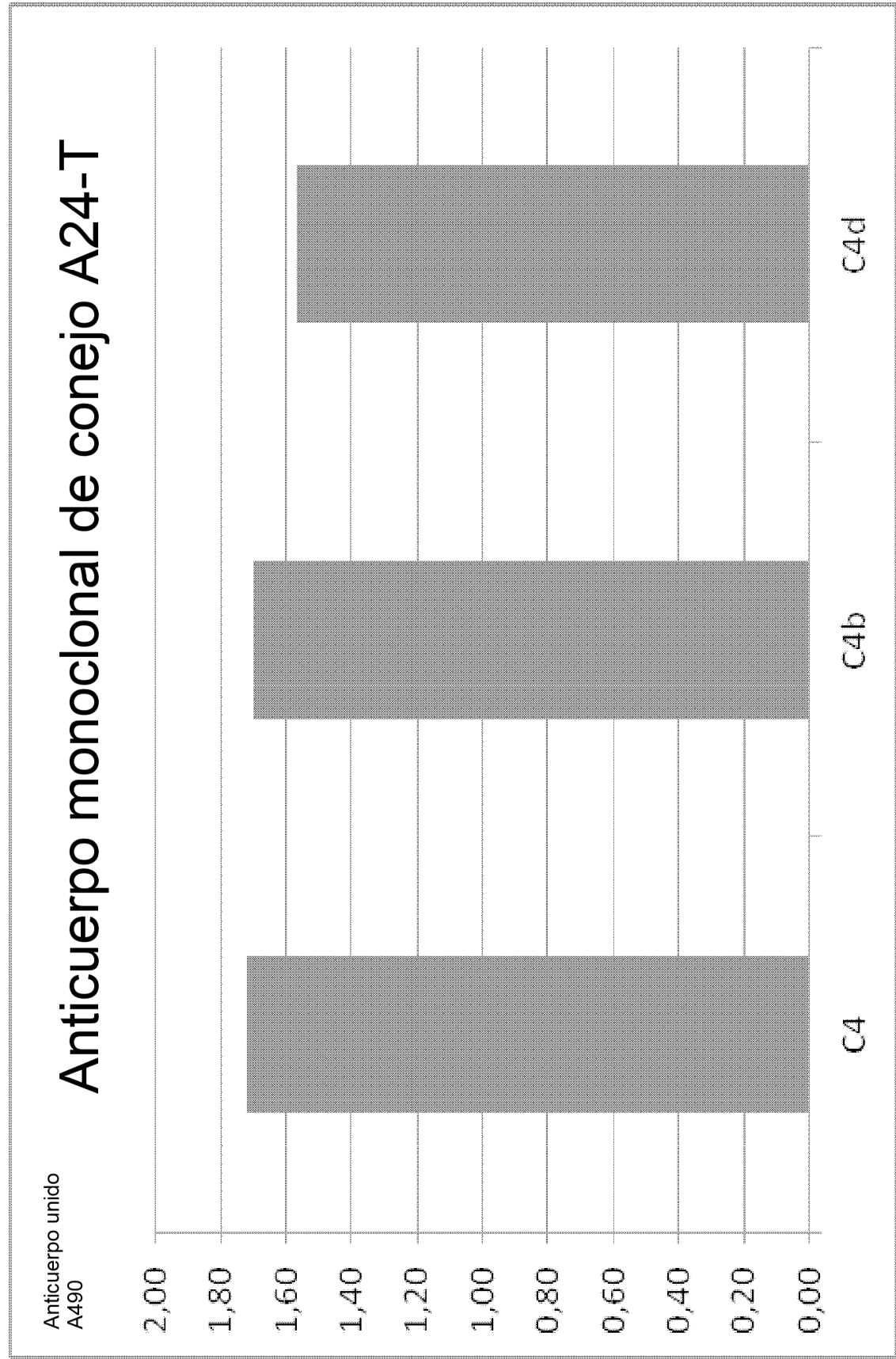


Figura 5

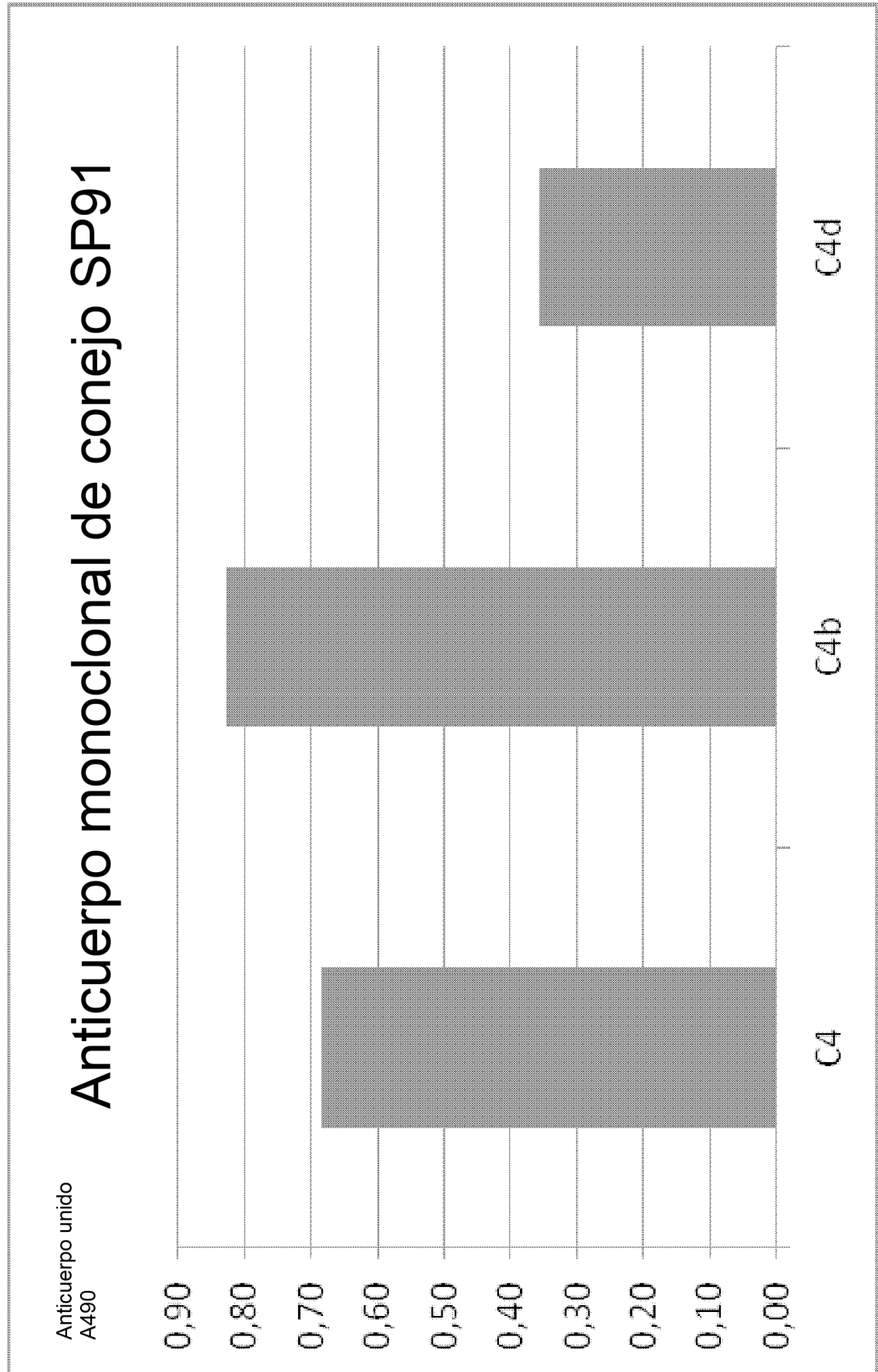


Figura 6

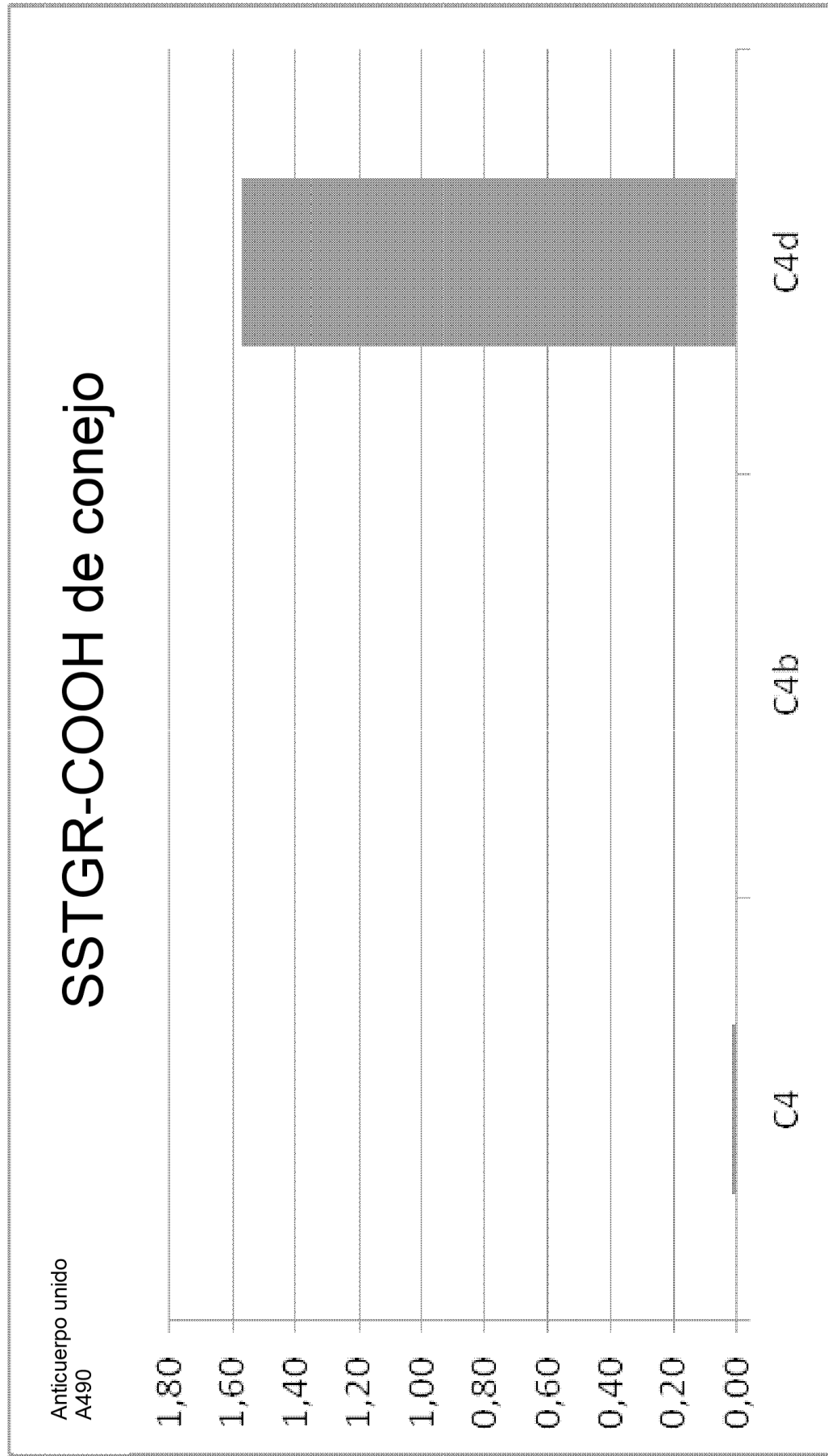


Figura 7

Anticuerpo unido A490

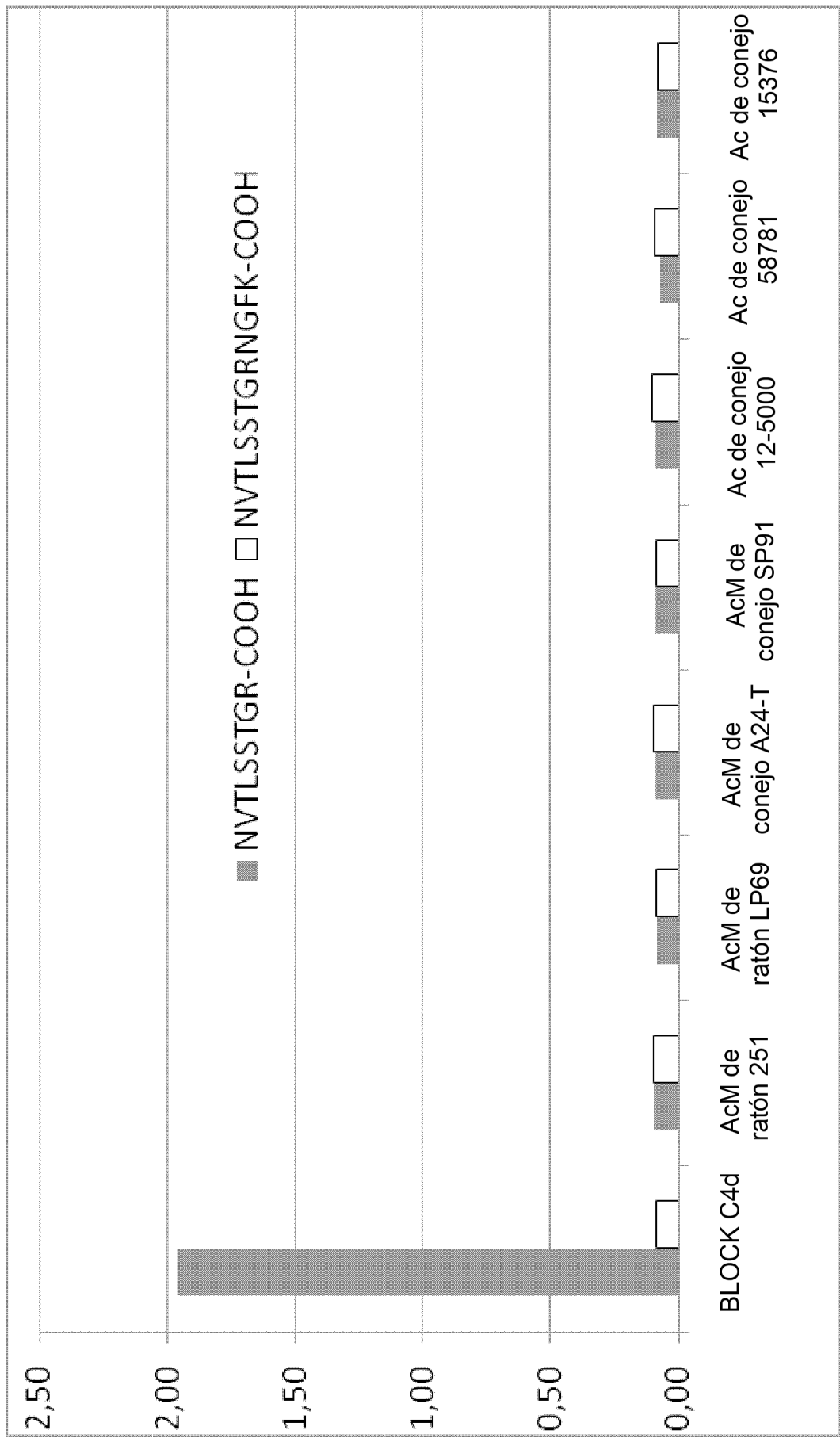


Figura 8

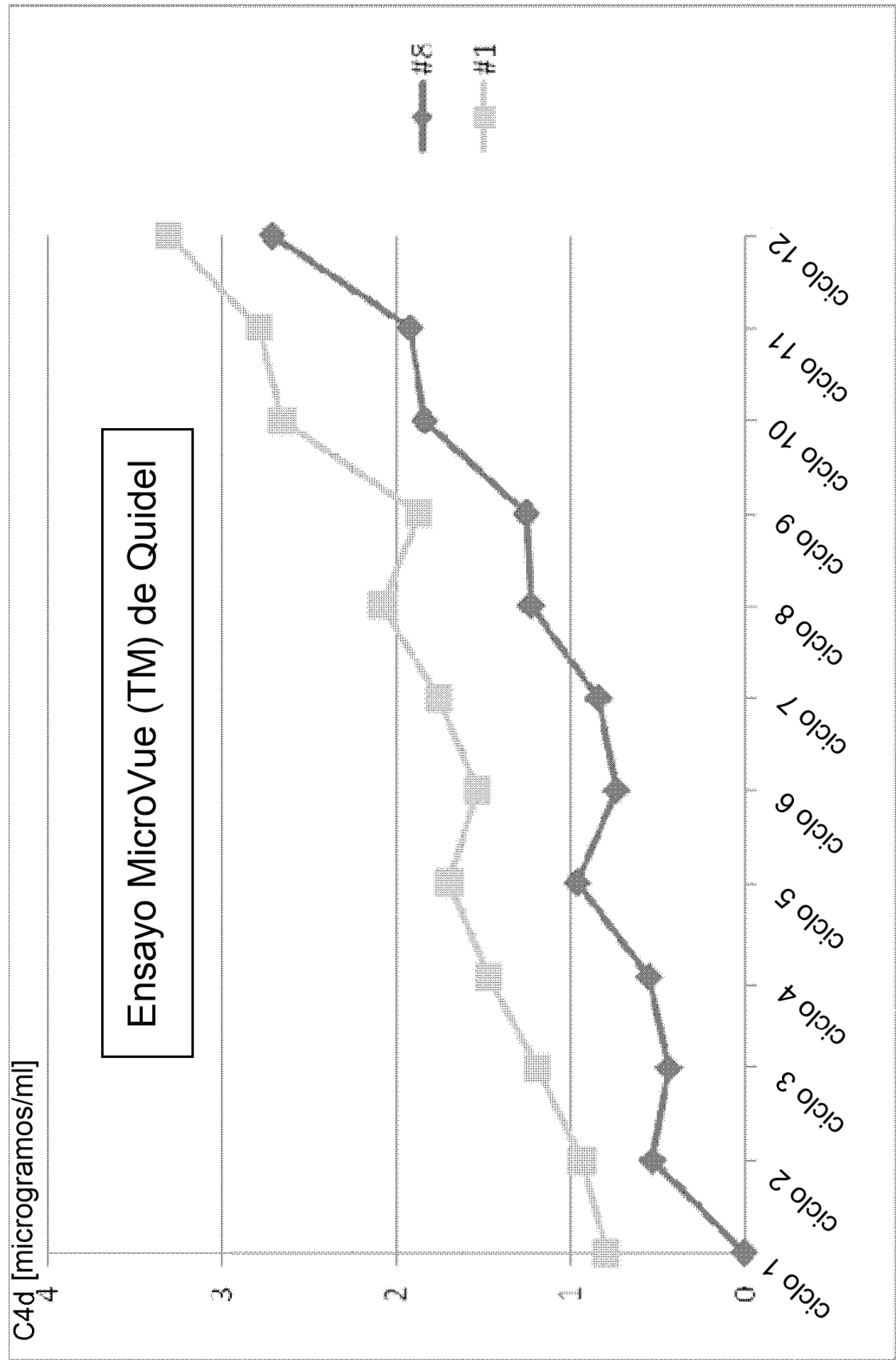


Figura 9

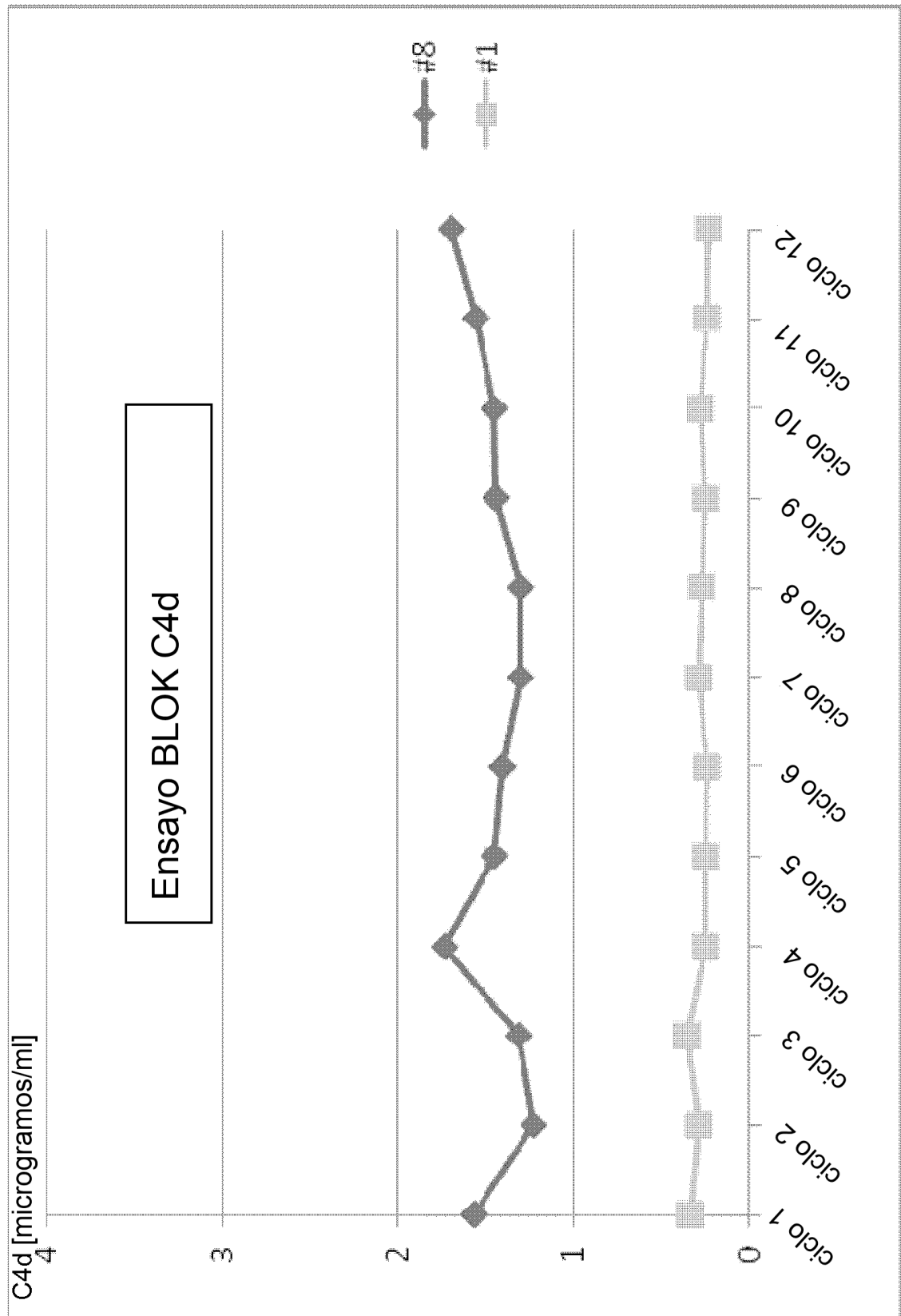


Figura 10

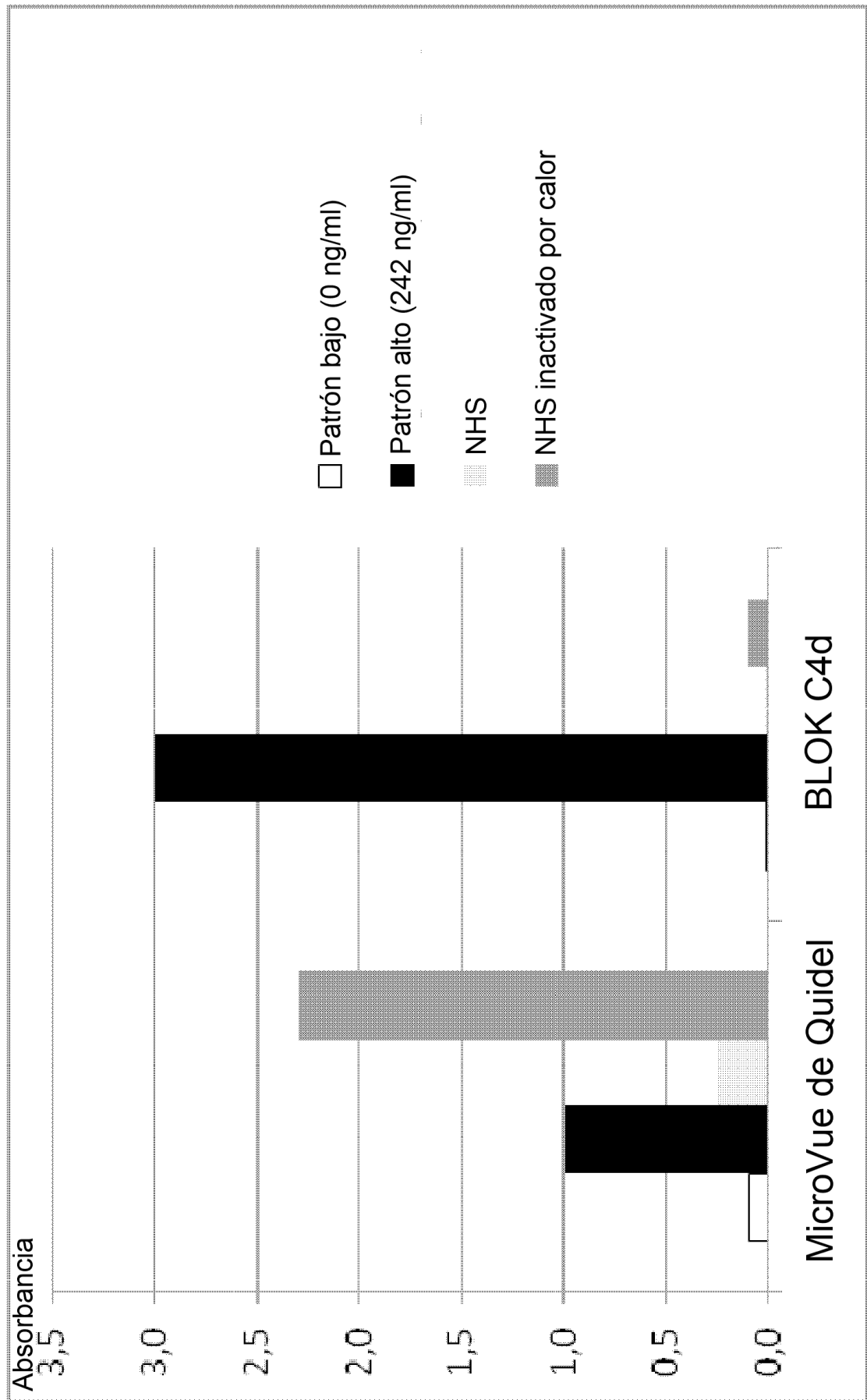


Figura 11

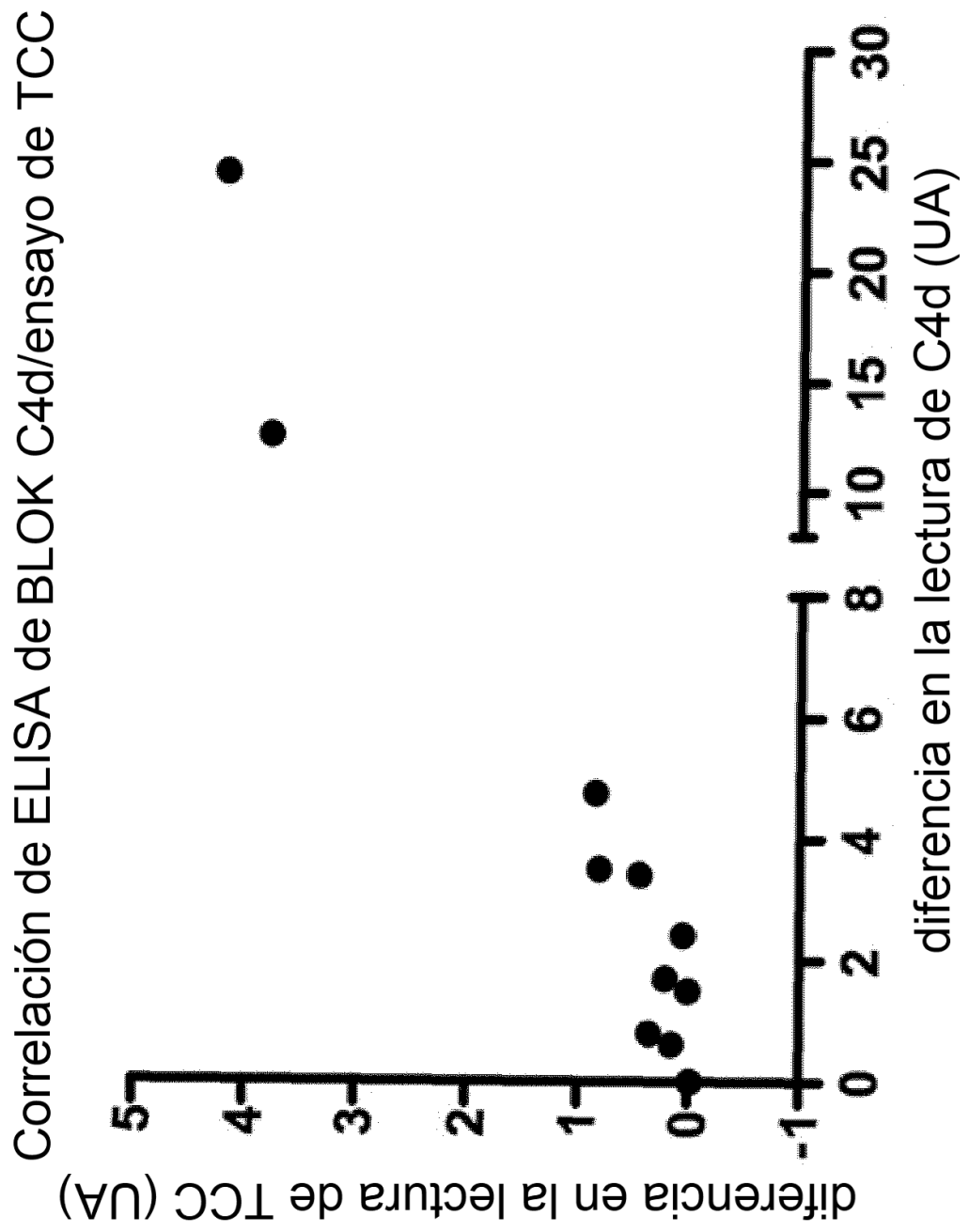


Figura 12

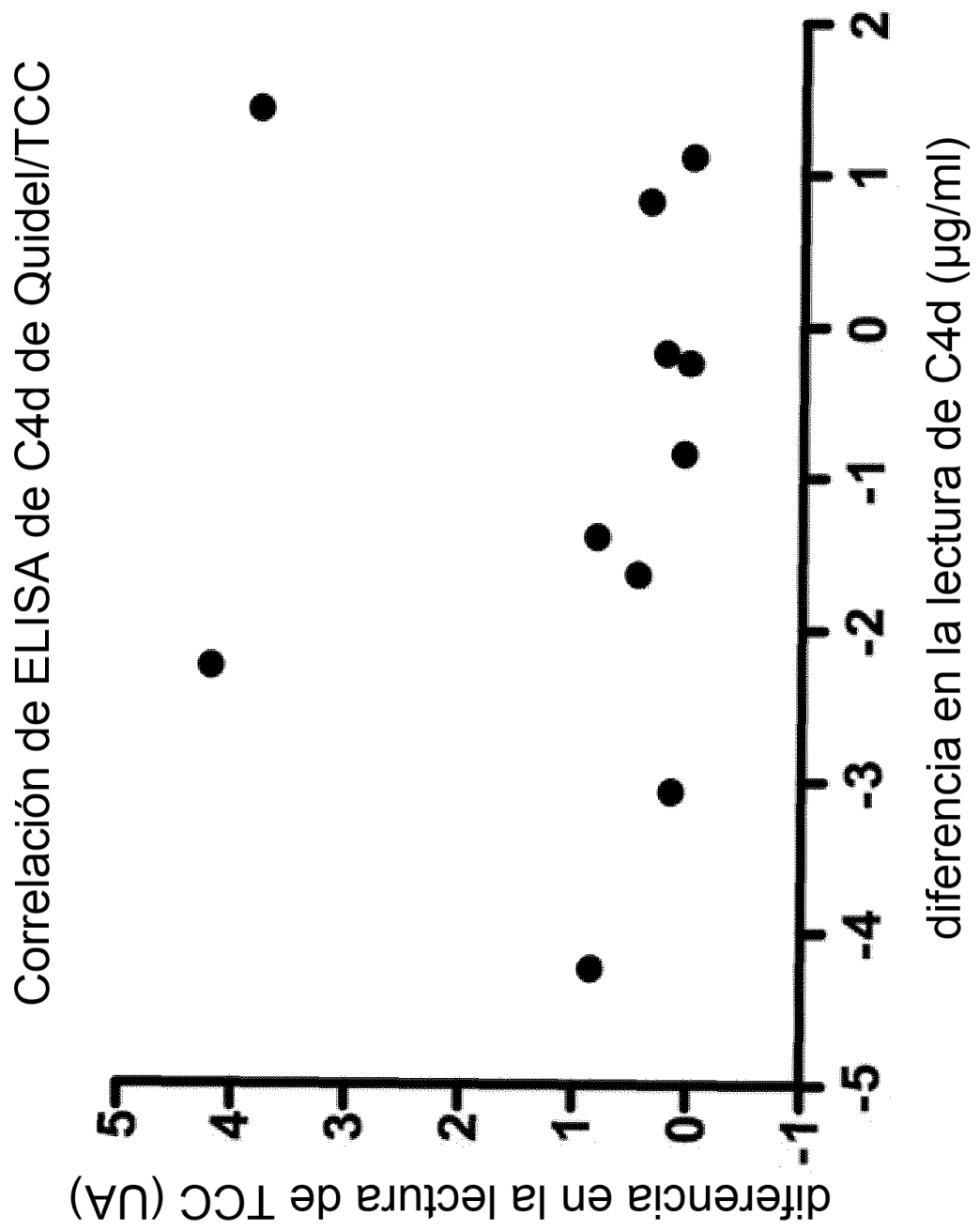


Figura 13

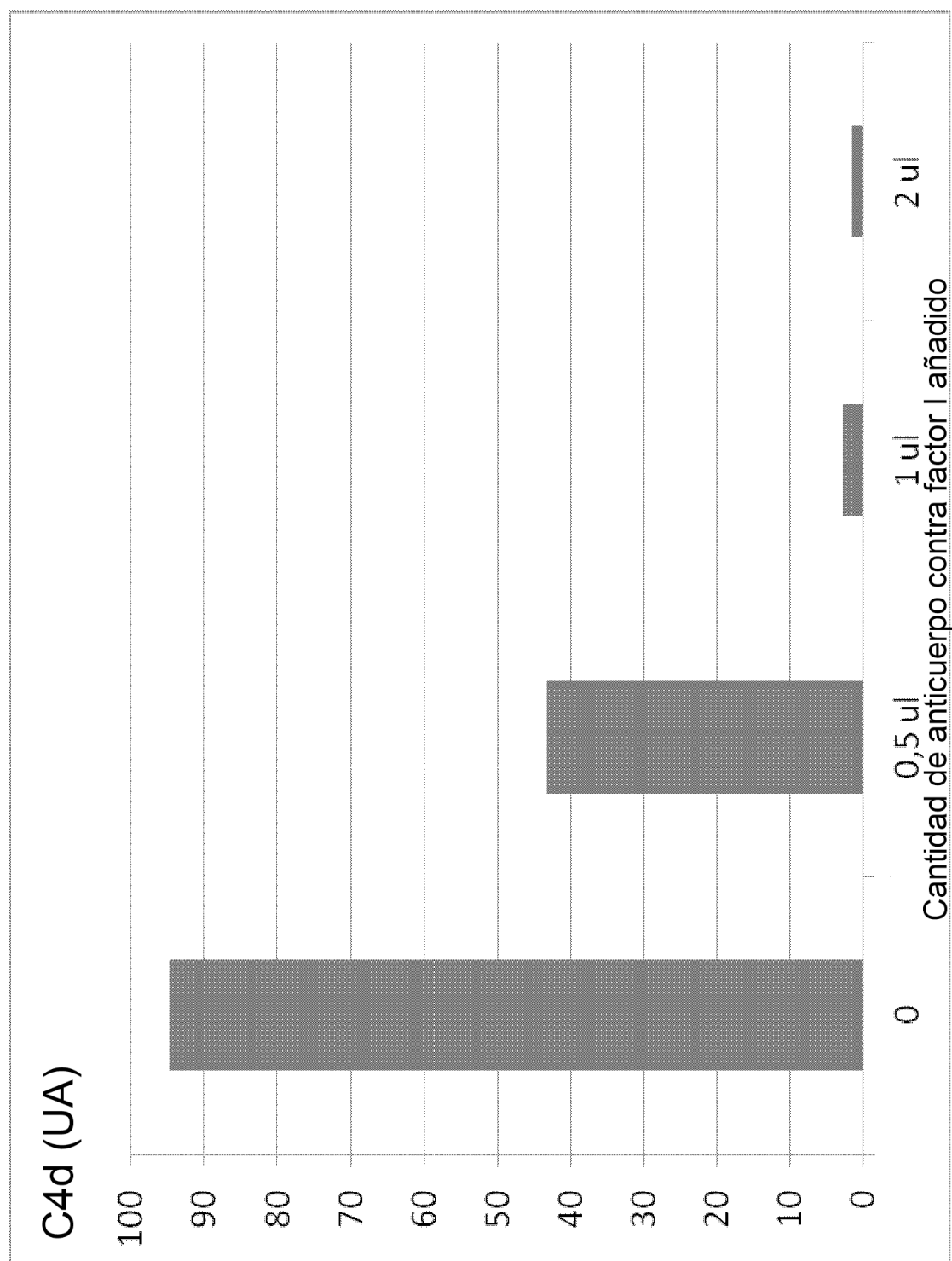


Figura 14

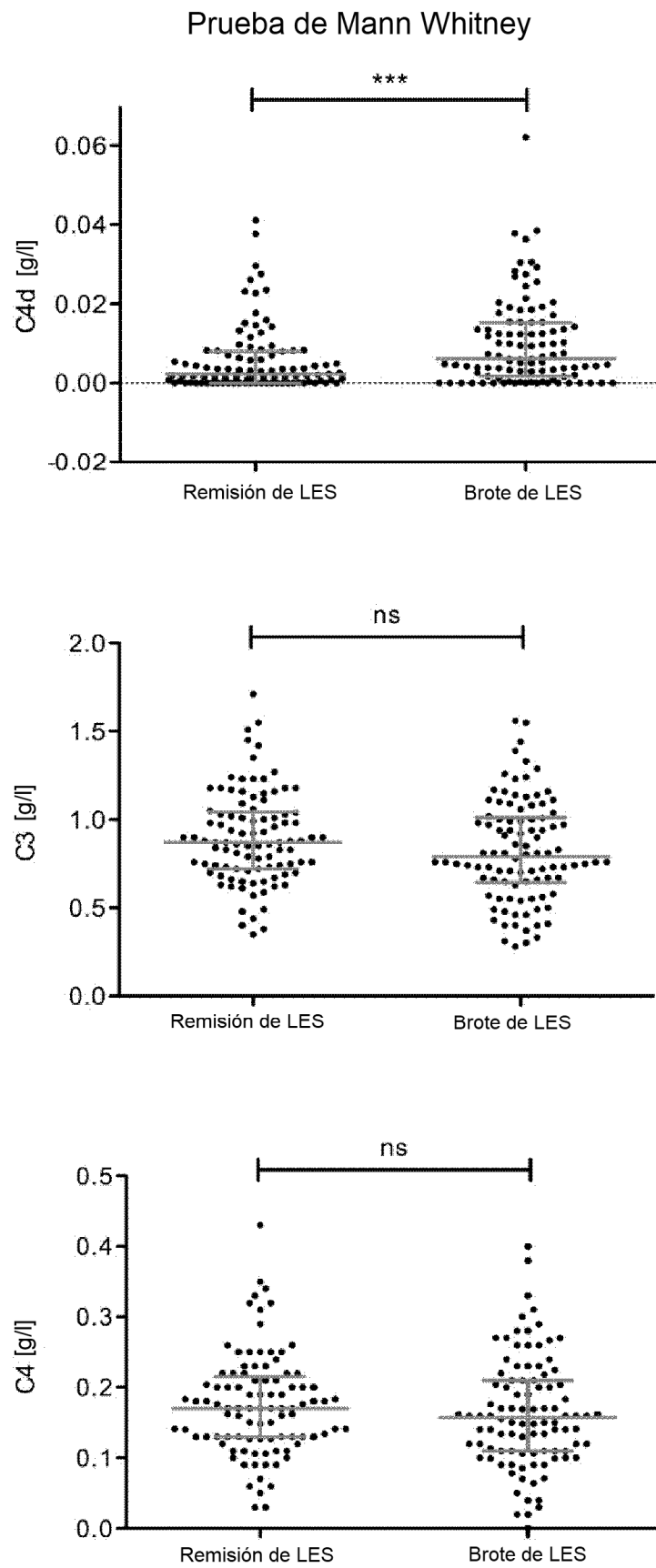


Figura 15

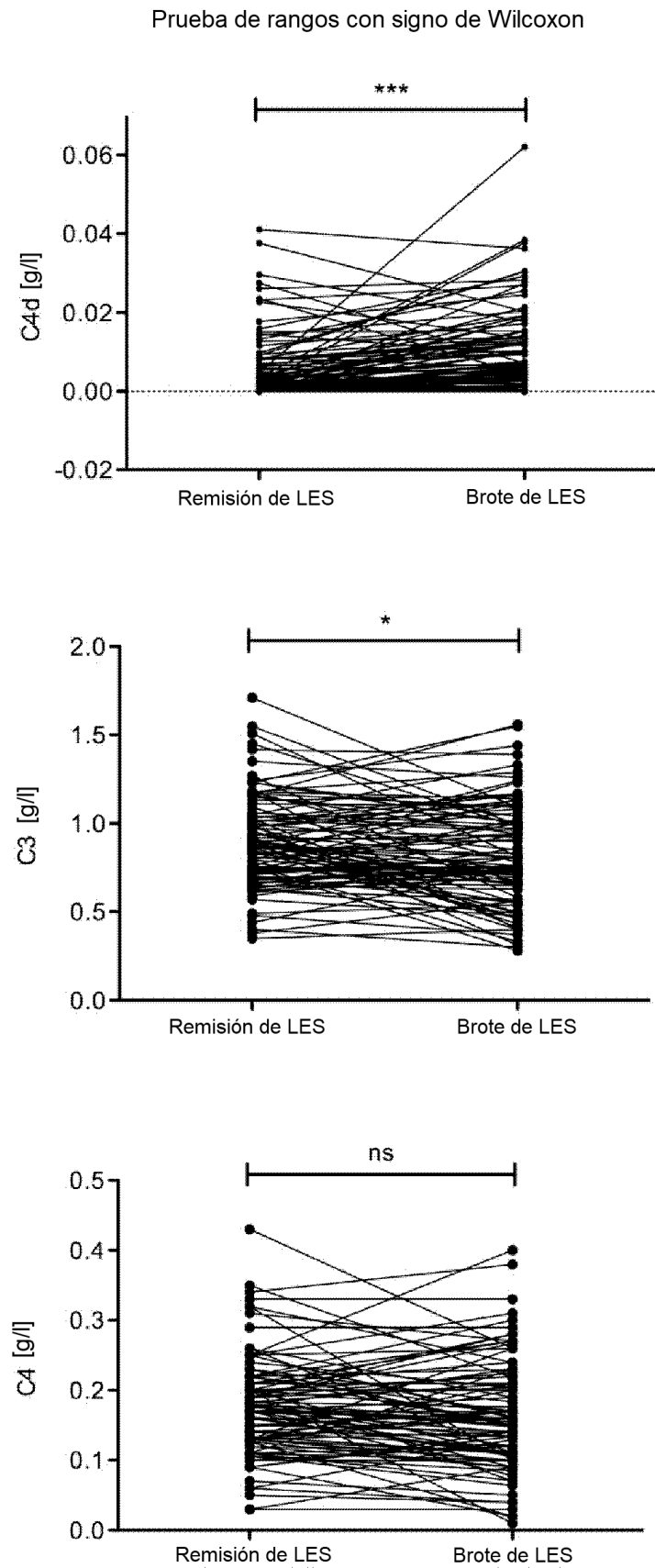


Figura 16

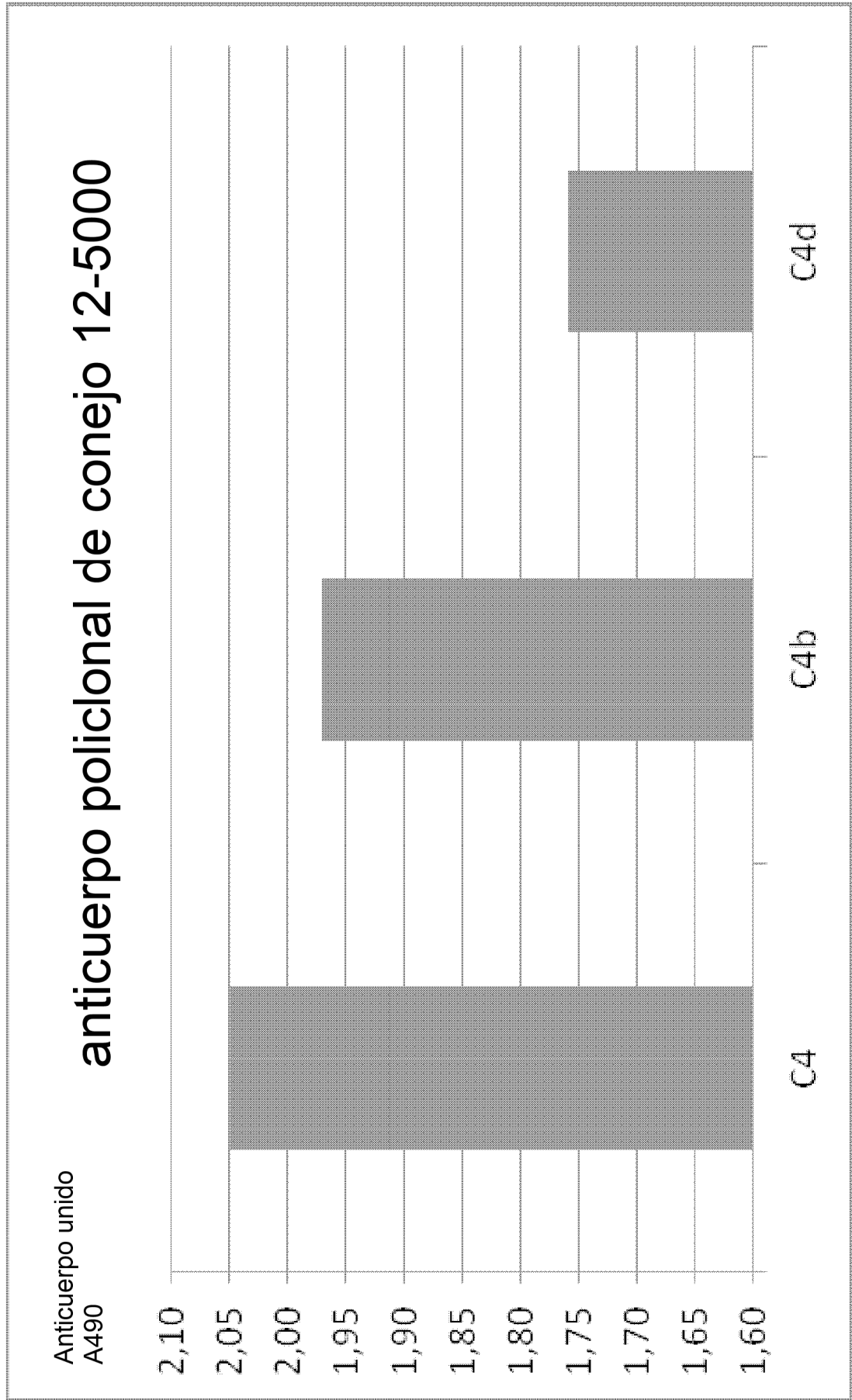


Figura 17

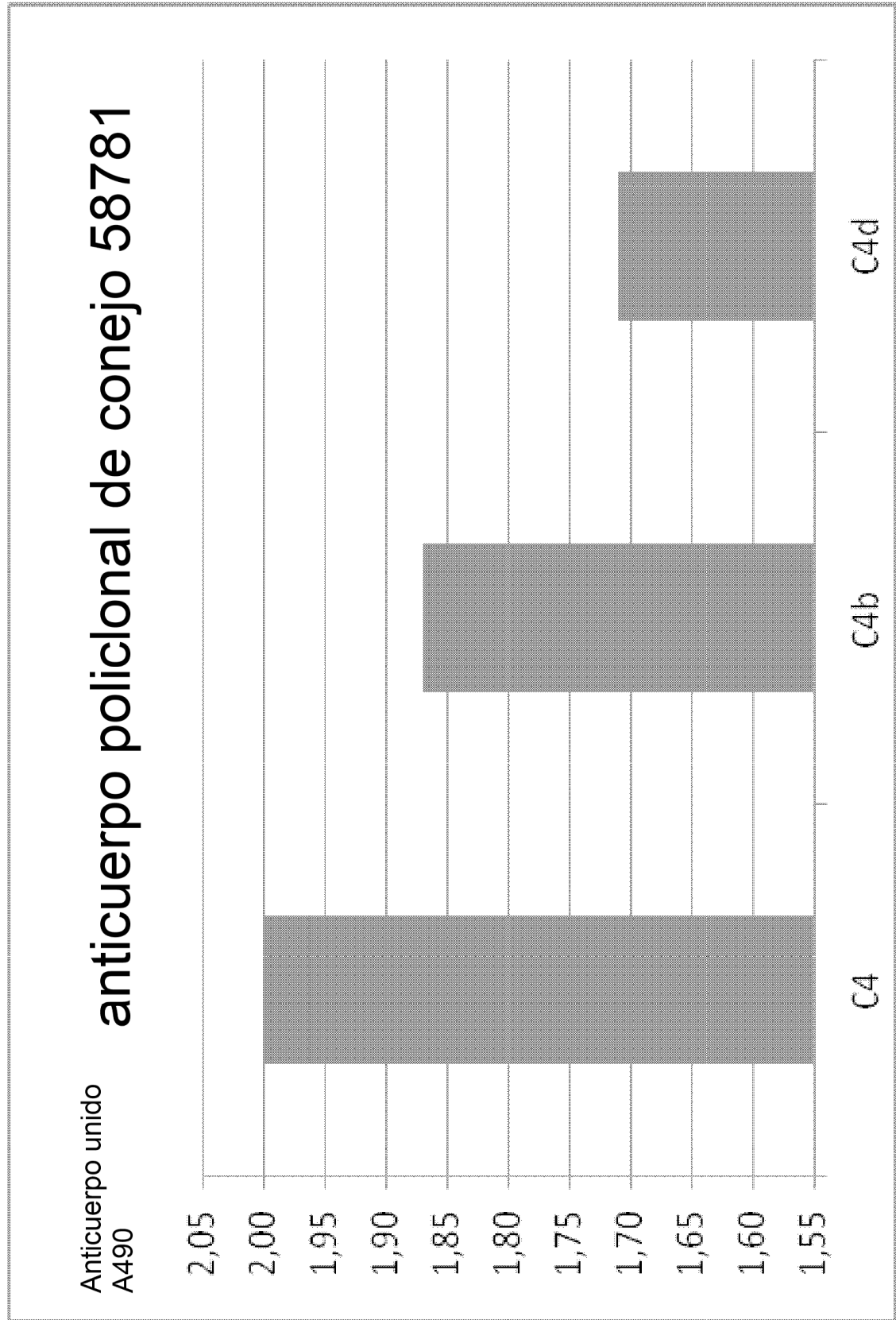


Figura 18

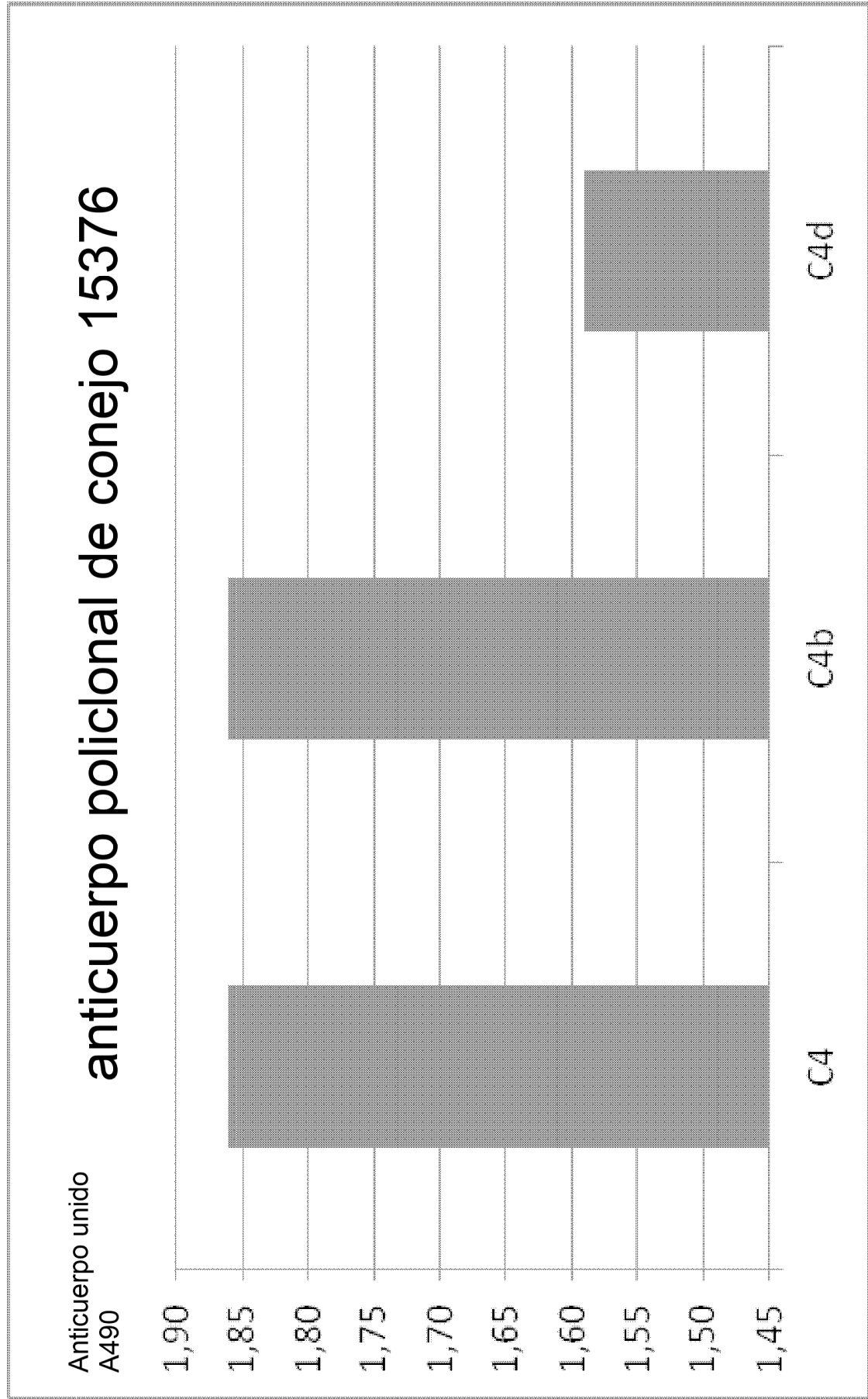


Figura 19

