

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 261**

21 Número de solicitud: 201830367

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

**G01N 33/531** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**12.04.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**15.10.2019**

Fecha de concesión:

**28.04.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**06.05.2020**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE  
(100.0%)**

**Avda. de Córdoba s/n CAA 6ª Planta Bloque D  
28041 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SERRANO HERNANDEZ, Antonio;  
MARTÍNEZ FLORES, José Ángel y  
SERRANO BLANCO, Manuel**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **INMUNOCOMPLEJOS ARTIFICIALES Y SU USO COMO CALIBRES EN SISTEMAS DE  
DETECCIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES B2GP1-aB2GP1**

57 Resumen:

La presente invención describe un inmunocomplejo artificial que comprende la proteína beta-2 glicoproteína 1 humana (B2GP1) unida a un fragmento de la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina, su uso como calibre, un método para calibrar un sistema analítico de detección de inmunocomplejos circulantes B2GP1-antiB2GP1 que comprende realizar una curva de calibración con inmunocomplejos artificiales y un método para determinar si un sujeto tiene riesgo de sufrir manifestaciones patológicas asociadas con el síndrome antifosfolípido (APS).

ES 2 727 261 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

**DESCRIPCIÓN**

**INMUNOCOMPLEJOS ARTIFICIALES Y SU USO COMO CALIBRES EN SISTEMAS DE DETECCIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES B2GP1-aB2GP1**

5

10

15

**SECTOR TÉCNICO**

20

La presente invención se encuadra dentro del sector técnico de la medicina, más concretamente en el campo de la inmunopatología.

25

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

30

El síndrome antifosfolípido (APS) o Síndrome de Hughes es un desorden autoinmune multisistémico caracterizado por la aparición de trombosis y/o morbilidad gestacional en pacientes que presentan anticuerpos antifosfolípido (aPL) en la sangre.

35

Los aPL son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos contra fosfolípidos, complejos de fosfolípidos asociados con proteínas o proteínas de unión a fosfolípidos de forma aislada.

40

45

Algunas de las manifestaciones asociadas APS son: coágulos sanguíneos (trombosis), abortos espontáneos, muerte fetal, parto prematuro, accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio.

50

55

En la actualidad no existen criterios diagnósticos específicos para el APS, aunque para diagnosticar la enfermedad se emplean los criterios de clasificación de pacientes para ensayos clínicos. Estos criterios de clasificación, actualmente en vigor, se establecieron en Sídney en 2004 (Miyakis S *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306). Estos criterios marcan la práctica en todos los laboratorios clínicos y se resumen en la Tabla 1.

65

**Tabla 1:** Criterios de clasificación del APS.

<b>Criterios clínicos</b>	<b>Criterios de laboratorio</b> (Dos determinaciones separadas al menos 12 semanas)
<b>Trombosis vascular</b>	Anticoagulante lúpico (AL) Anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) IgG y/o IgM  Anticuerpos anti-beta2 glicoproteína (aB2GPI) IgG y/o IgM
Arterial, venosa o de pequeño vaso en cualquier localización. Evidencia radiológica o histológica de la trombosis	
<b>Patología gestacional</b>	
Uno o más abortos antes de la semana 10 de gestación documentados. Uno o más prematuros (<34 semanas) por preclampsia o eclampsia Tres o más abortos espontáneos	

Muchos pacientes con clínica de APS quedan sin diagnosticar al no detectarse ningún aPL de consenso que cumplan los criterios de laboratorio.

Actualmente el diagnóstico de la enfermedad en laboratorios clínicos se lleva a cabo mediante la detección de aPL mediante técnicas en fase sólida como ELISA, Fluoroenzimoinmunoensayo o tecnología Multiplex, que detectan anticuerpos anticardiolipina (aCL) o anticuerpos anti beta-2 glicoproteína 1 (aB2GP1 o anti-B2GP1) en el suero o plasma. Para cumplir con el criterio de clasificación en laboratorio como sujeto con APS, los anticuerpos deben mantenerse en el suero durante al menos 12 semanas.

A pesar de la relación entre la presencia de aPL y la enfermedad, el valor de la presencia de aPL para predecir eventos relacionados con el APS (por ejemplo, trombosis o complicaciones durante el embarazo) es bajo. Por esta razón son necesarios nuevos métodos con mejor valor predictivo para la identificación de sujetos portadores de anticuerpos aPL y, por lo tanto, tienen riesgo de sufrir, por ejemplo, un evento trombótico. Un sistema eficaz para identificar a estos pacientes le permitirá ser tratado más rápidamente, minimizando el daño al sujeto y su coste derivado al sistema nacional de salud correspondiente.

La detección de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 es uno de los sistemas de identificación de pacientes con mayor riesgo de desarrollar eventos trombóticos

dentro de los que son portadores de aPL. Estos inmunocomplejos se han descrito como biomarcadores de riesgo en el estudio de la patogenia de APS (Serrano M *et al.* Beta2-Glycoprotein I/IgA Immune Complexes: A Marker to Predict Thrombosis After Renal Transplantation in Patients With Antiphospholipid Antibodies. *Circulation* 2017, 135(20):1922-34).

Estos sistemas de detección de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 detectan su concentración en el plasma o suero previamente obtenido de un sujeto. Para determinar su concentración es necesario previamente elaborar una curva de calibración (o calibrado) basada en concentraciones conocidas de los inmunocomplejos (que funcionan como calibres o calibradores), para, a partir de la ecuación de la curva de calibración, determinar la concentración de los inmunocomplejos B2GP1-aB2GP1 en la muestra del sujeto y concluir si dicho sujeto tiene una cantidad de inmunocomplejos por encima del punto de riesgo que va a determinar si tiene riesgo de sufrir alguna patología relacionada con el APS.

Los métodos actuales de determinación de inmunocomplejos circulantes en muestras de suero de pacientes emplean como calibres concentraciones conocidas de los inmunocomplejos B2GP1-aB2GP1 nativos (Martinez-Flores JA *et al.* Detection of circulating immune complexes of human IgA and beta 2 glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome symptomatology. *J Immunol Methods* 2015, 422:51-8).

El estado del arte más cercano es el documento Martinez-Flores JA *et al.* 2015, que detecta los inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1(IgA) en pacientes con sintomatología asociada a APS. Para determinar la concentración de los inmunocomplejos, se realiza una curva de calibración previa con inmunocomplejos nativos B2GP1-aB2GP1.

Los inmunocomplejos nativos o inmunocomplejos naturales son aquéllos obtenidos a partir de sujetos humanos. Los inmunocomplejos nativos tienen el inconveniente de ser lábiles e inestables, lo que hace difícil su detección, genera una gran variabilidad entre ensayos de detección y su uso además está limitado a pocos días o semanas. Para aumentar la vida útil de estos calibres, es necesario congelar los inmunocomplejos nativos, pero estas moléculas son muy sensibles a los ciclos de congelación-descongelación. Además, debido a que el número de análisis para los que se pueden usar los calibres está limitado y se precisa reponer nuevos calibres periódicamente para poder continuar los análisis a las muestras de pacientes, con el

consiguiente elemento de incertidumbre que genera la variabilidad de los lotes de calibres muestra. Por lo tanto, las curvas de calibración para la detección de  
5 inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 preparadas con concentraciones conocidas de inmunocomplejos nativos no son adecuadas para establecer la concentración real y fiable de los inmunocomplejos circulantes en la muestra del  
10 paciente.

El problema técnico objetivo es la necesidad de calibres estables y para preparar una  
15 curva de calibración en un sistema de detección de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1.

20

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

25

La presente invención se refiere a un inmunocomplejo artificial que comprende un fragmento de la proteína beta-2 glicoproteína 1 humana (B2GP1) unida a un fragmento de la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina (Fc).  
30

Los complejos inmunes o inmunocomplejos (CIC) son macromoléculas formadas por subunidades que consisten en antígeno(s) y anticuerpo(s) unidos entre ellos mediante enlaces químicos de baja energía (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas).  
35

40

A efectos de la presente invención, se distinguen varios tipos de inmunocomplejos:

- 1) inmunocomplejos circulantes: son inmunocomplejos producidos de forma natural por el organismo de un sujeto, circulan por la sangre de forma soluble y que pueden depositarse en la pared interior de los vasos sanguíneos;
- 2) inmunocomplejos nativos (o naturales): son inmunocomplejos circulantes que han sido aislados de sangre o suero de un sujeto; e
- 3) inmunocomplejos artificiales (o complejos inmunes artificiales): han sido producidos en laboratorio. La secuencia de estos inmunocomplejos no se corresponde necesariamente con la de los inmunocomplejos circulantes o la de los nativos. La unión antígeno-anticuerpo no tiene lugar mediante enlaces químicos de baja energía sino mediante enlaces peptídicos o enlaces covalentes de alta energía entre las dos subunidades del inmunocomplejo. Los inmunocomplejos artificiales son estables durante varios meses a 4°C.

65

La apolipoproteína H (Apo H), también llamada beta-2 glicoproteína 1 (B2GP1, referencia UniProtKB P02749, Referencia NCBI N°: NP\_000033.2), es una glicoproteína plasmática de 345 aminoácidos que se une a sustancias cargadas negativamente tales como la heparina, fosfolípidos y dextrán-sulfato. Esta proteína puede unirse a fosfatidilserina y prevenir la activación de la coagulación sanguínea mediante su unión a fosfolípidos en la superficie de células dañadas. Su secuencia está codificada en el gen APOH.

Los inmunocomplejos artificiales de la invención están formados por dos subunidades: una subunidad se corresponde con la proteína B2GP1 descrita anteriormente (antígeno) y la otra subunidad se corresponde con un fragmento de la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina (anticuerpo). El fragmento de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina del inmunocomplejo artificial se une mediante un enlace peptídico, un enlace covalente, al extremo amino o carboxilo terminal de la proteína B2GP1. En una realización preferida, el fragmento de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina se une al extremo carboxilo terminal de la proteína B2GP1. La unión de las subunidades de los inmunocomplejos mediante enlaces peptídicos o enlaces covalentes tiene la ventaja de que, al tratarse de un enlace químico de alta energía, es muy estable a cambios de fuerza iónica, pH o temperatura. Por el contrario, la unión antígeno-anticuerpo de los inmunocomplejos naturales se realiza mediante enlaces químicos de baja energía, como son puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. Estos enlaces son débiles y las uniones mediadas por ellos son inestables.

En una realización, los inmunocomplejos artificiales pueden tener al menos un aminoácido enlazador entre la secuencia de la proteína B2GP1 y el fragmento de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

En una realización preferida. El fragmento de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina se seleccionada entre los isotipos IgM, IgG o IgA.

El primer inmunocomplejo artificial de la invención se caracteriza porque comprende la secuencia SEQ ID NO:1. La secuencia SEQ ID NO:1 se corresponde con la proteína quimérica B2PG1-IgM, compuesta por la secuencia de B2PG1 humana definida anteriormente en la que el codón de parada se ha sustituido el aminoácido lisina (K) y mediante un enlace peptídico están unidos los aminoácidos 240 a 590 de la cadena

pesada de la región constante de la inmunoglobulina M humana (Nº Acceso NCBI AAS01769.1).

5 Se considera que el primer inmunocomplejo artificial de la invención tiene al menos un 98%, un 99% o un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:1.

10 El primer inmunocomplejo artificial de la invención puede estar codificado en cualquier secuencia de ADN cuya traducción de lugar a la SEQ ID NO:1, o de lugar a una  
15 proteína cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 98%, un 99% o un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:1. Como ejemplo, y sin por ello limitar la presente invención, la secuencia nucleotídica del primer inmunocomplejo artificial  
20 comprende la secuencia SEQ ID NO:2.

El segundo inmunocomplejo artificial de la invención se caracteriza porque comprende  
25 la secuencia SEQ ID NO:3. La secuencia SEQ ID NO:3 se corresponde con la proteína quimérica B2PG1-IgG, compuesta por la secuencia de B2PG1 humana definida anteriormente, en la que el codón de parada se ha sustituido por un péptido enlazador  
30 compuesto por los aminoácidos lisina (K), asparagina (D) y prolina (P), unidos mediante enlace peptídico a los aminoácidos 31 a 246 de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina G humana (Nº Acceso NCBI AAW65947.1).

35 Se considera que el segundo inmunocomplejo artificial de la invención tiene al menos un 98%, un 99% o un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:3.  
40

El segundo inmunocomplejo artificial de la invención puede estar codificado en  
45 cualquier secuencia de ADN cuya traducción de lugar a la secuencia SEQ ID NO:3, o de lugar a una proteína cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 98%, un 99% o un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:3. Como ejemplo, y sin por ello  
50 limitar la presente invención, la secuencia nucleotídica del segundo inmunocomplejo artificial comprende la SEQ ID NO:4.

55 El tercer inmunocomplejo artificial de la invención se caracteriza porque comprende la secuencia SEQ ID NO:5. La secuencia SEQ ID NO:5 se corresponde con la proteína quimérica B2PG1-IgA, compuesta por la secuencia de B2PG1 humana definida  
60 anteriormente en el que el codón de parada se ha sustituido por un péptido enlazador compuesto por los aminoácidos lisina (K) y asparagina (D), unido mediante enlace peptídico a los aminoácidos 117 a 352 de la región constante de la cadena pesada de

65

la inmunoglobulina A (Nº Acceso NCBI AAC82528.1).

5 Se considera que el tercer inmunocomplejo artificial de la invención tiene al menos un 98%, un 99% o un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:5.

10 El tercer inmunocomplejo artificial de la invención puede estar codificado en cualquier secuencia de ADN cuya traducción de lugar a la SEQ ID NO:5, o de lugar a una  
15 proteína cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 98%, un 99% o un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO:5. Como ejemplo, y sin por ello limitar la presente invención, la secuencia nucleotídica del tercer inmunocomplejo artificial  
20 comprende la SEQ ID NO:6.

En una realización preferida, el inmunocomplejo artificial que comprende la proteína  
25 beta-2 glicoproteína 1 humana (B2GP1) unida a un fragmento de la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina, está caracterizado porque la secuencia de dicho inmunocomplejo comprende una secuencia identificada por la SEQ ID NO:1,  
30 la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:5.

Es objeto de la presente invención un método para calibrar un sistema analítico de  
35 detección de inmunocomplejos B2GP1-aB2GP1 que comprende:

- a) diluir un inmunocomplejo artificial al menos a tres concentraciones distintas  
40 conocidas;
- b) determinar la densidad óptica de cada concentración de la etapa anterior;
- c) realizar una curva de calibración que relacione cada concentración de la  
45 etapa a) con su respectiva densidad óptica obtenida en la etapa b);
- d) obtener una función matemática que defina la curva de calibración de la  
etapa c).

50 La curva de calibración se realiza con al menos tres concentraciones conocidas del mismo tipo de inmunocomplejos artificiales (B2GP1-IgG, B2GP1-IgM o B2GP1-IgA) en  
55 el paso a). La curva se realiza con al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 o al menos 7 concentraciones conocidas del mismo tipo de inmunocomplejos artificiales.

60 Los calibres o calibradores son concentraciones conocidas de determinadas moléculas que sirven para establecer una curva patrón (o curva de calibración) que relaciona una propiedad física cuantificable (ej. Concentración) y una respuesta o propiedad física de  
65 las mismas (ej. Densidad óptica). En una realización preferida, la curva de calibración

relaciona la densidad óptica (DO) de la media de varias medidas de un mismo calibre frente a la concentración conocida de dicho calibre.

5 El valor de densidad óptica es proporcional a la concentración de la sustancia de  
 interés en una muestra (inmunocomplejos artificiales), lo que permite realizar la curva  
 10 de calibración que relacione la densidad óptica y la concentración de los  
 inmunocomplejos. En una realización preferida, la densidad óptica de una muestra se  
 detecta una absorbancia a 450 nm.

15 La detección de la densidad óptica puede realizarse mediante cualquier método  
 conocido en el estado de arte, como por ejemplo colorimetría o turbidez. Los sistemas  
 20 analíticos de detección de inmunocomplejos se refieren a cualquier sistema de  
 detección y cuantificar proteínas, tales como espectrometría, inmunoensayos o  
 inmunotransferencia. Un sistema analítico de detección es ELISA (*Enzyme-Linked*  
 25 *ImmunoSorbent Assay*) que, por ejemplo, puede estar basado en fosfatasa alcalina o  
 peroxidasa.

30 La función matemática, función de la curva o ecuación de la curva es una ecuación  
 cuadrática de tipo  $y = ax + bx^2 + c$ , en la que la variable “y” es la concentración  
 conocida de inmunocomplejos artificiales en una muestra calibre, la variable “x” es el  
 35 valor de densidad óptica para dicha muestra y los valores a, b y c son los coeficientes  
 de la curva de calibración. Los valores a, b y c son específicos para cada curva de  
 calibración y se pueden determinar manualmente o automáticamente mediante un  
 40 software instalado en el sistema analítico de detección.

A efectos de la presente invención, la concentración de inmunocomplejos en una  
 45 muestra se represente en unidades por mililitro (U/mL).

Otra realización de la presente invención es un método para determinar la  
 50 concentración de un inmunocomplejo circulante B2PG1-aB2GP1 en una muestra  
 obtenida de un sujeto que comprende:

- 55 a) diluir un inmunocomplejo artificial al menos a tres concentraciones distintas;
- b) determinar la densidad óptica de cada concentración de inmunocomplejos  
 de la etapa anterior;
- 60 c) realizar una curva de calibración que relacione cada concentración de la  
 etapa a) con su respectiva densidad óptica obtenida en la etapa b);
- d) obtener una función matemática que defina la curva de calibración de la

65

etapa c);

e) medir la densidad óptica de una muestra biológica obtenida de un sujeto; y

5 f) determinar la concentración de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 en la muestra a partir de la función obtenida en el paso d).

10 En una realización preferida, la muestra biológica del sujeto es suero o plasma. En una realización más preferida, la muestra biológica del sujeto es suero. El suero es un líquido sin células que se obtiene a partir de la sangre después del proceso de  
15 coagulación. El suero se diferencia del plasma fundamentalmente por carecer de fibrinógeno y plaquetas.

20 Para la determinación de la concentración de un inmunocomplejo circulante en una muestra de un sujeto se debe realizar previamente una curva de calibración, como se ha indicado anteriormente, que relacione la concentración conocida de  
25 inmunocomplejos respecto a una característica física cuantificable, como la densidad óptica.

30 La determinación de la concentración de los inmunocomplejos circulantes en el paso d) se realiza sustituyendo en la ecuación obtenida en el paso d) la variable "x" por el  
35 valor de la densidad óptica obtenido en el paso e).

Otra realización de la presente invención está dirigida a un método para determinar si  
40 un sujeto tiene riesgo de sufrir manifestaciones asociadas con el síndrome antifosfolípido (APS). Este método comprende determinar la concentración de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 en una muestra de un sujeto de  
45 acuerdo con cualquiera de los métodos definidos anteriormente, en el que un valor de concentración de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 igual o superior a 20,5 U/mL es indicativo de que el sujeto tiene alto riesgo de sufrir manifestaciones  
50 patológicas asociadas con APS. En otra realización, se considera que un valor inferior a 20,5 U/mL de inmunocomplejos circulantes es indicativo de que el sujeto tiene riesgo bajo de sufrir manifestaciones asociadas con APS, riesgo que es igual al de la  
55 población sana, a población portadora de anticuerpos aPL o población portadora de anticuerpos aB2GP1 que no forman inmunocomplejos circulantes.

60 La determinación de la concentración de inmunocomplejos en las muestras de los pacientes permite identificar a los sujetos con anticuerpos antifosfolípido (aPL) que  
65 tienen alto o bajo riesgo de sufrir un evento trombótico u otras manifestaciones

patológicas asociadas con APS. El riesgo viene determinado por la presencia de inmunocomplejos por encima de un valor numérico correspondiente a un punto de corte que determinado por análisis de curvas ROC.

Una persona tiene riesgo de desarrollar una manifestación asociada a APS cuando la probabilidad de sufrir la patología asociada es al menos el doble del riesgo de la población general. Por ejemplo, las personas que tienen una concentración de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 (isotipos IgA o IgG) igual o superior a 20,5 U/mL tienen un riesgo de desarrollar una manifestación asociada a APS de al menos un 3 %, frente a la población general que tiene un riesgo del 0,6% (cinco veces superior). Se han descrito estudios en los que el riesgo de los portadores de inmunocomplejos es superior al 30% (Serrano *et al.*, 2017).

En una realización preferida, el sujeto que tiene riesgo de sufrir manifestaciones asociadas con el síndrome antifosfolípido (APS) es portador de anticuerpos antifosfolipídicos (aPL). Un sujeto portador de aPL es una persona a la que se le ha detectado al menos un aPL de cualquier diana: anticoagulante lúpico (aAL), anti-cardiolipina (aCL) o anti-beta2 glicoproteína (aB2GP1), de cualquier isotipo (IgG, IgM o IgA). Un sujeto portador de anticuerpos aPL puede manifestar signos y síntomas de alguna de las manifestaciones patológicas asociadas con el APS o ser un portador asintomático.

En una realización preferida, el método determina si el sujeto tiene riesgo de sufrir síndrome antifosfolípido o cualquiera de sus manifestaciones patológicas asociadas, tales como coágulos sanguíneos (trombosis), abortos espontáneos, muerte fetal, parto prematuro, accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio.

Trombosis o un evento trombótico es cualquier incidente en el que se desarrolla un trombo (coágulo) en una arteria. Puede manifestarse como angina de pecho, accidente cerebrovascular isquémico o enfermedad arterial periférica. De la definición de eventos trombóticos se excluye trombosis menores como las tromboflebitis y hemorroides.

Otra realización de la invención se refiere al uso de cualquiera de los inmunocomplejos artificiales de la invención B2GP1-IgG, B2GP1-IgM o B2GP1-IgGA como calibre en un sistema de detección de inmunocomplejos circulantes que comprenden al menos un fragmento de la proteína B2GP1 unida a un fragmento de anticuerpo aB2GP1

(B2GP1-aB2GP1).

5 Un sistema de calibrado estable y fiable permite la detección de inmunocomplejos  
circulantes de un sujeto permite determinar con más precisión la concentración de  
10 dichos inmunocomplejos y favorece que un paciente con riesgo de sufrir síndrome  
antifosfolípido o cualquiera de sus manifestaciones asociadas, sea tratado con una  
mayor rapidez minimizando el daño al paciente.

15 Los inmunocomplejos artificiales tienen las mismas propiedades de reconocimiento  
antigénico anti-B2GP1 que los anticuerpos aBGP1 nativos o los anticuerpos  
20 monoclonales anti-B2GP1. Además, son más de 100 veces más estables que los  
inmunocomplejos naturales, lo que permite utilizarlos como calibres en sistemas de  
detección de inmunocomplejos circulantes durante semanas gracias a su estabilidad y  
25 reproducibilidad entre ensayos.

Las ventajas de los inmunocomplejos artificiales y su uso como calibres en sistemas  
30 de detección de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 son:

- Estables durante varios meses a 4°C;
- Reproducibilidad entre ensayos (poca variabilidad interensayo e intraensayo);
- 35 - Facilidad de obtención mediante técnicas estándar de biología molecular;
- Reconocimiento antigénico por anticuerpos monoclonales anti-B2GP1 idéntico  
al reconocimiento por inmunocomplejos nativos.

40

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45

**Figura 1:** muestra la detección de los complejos artificiales mediante ELISA revelado  
con peroxidasa (A, B) o fosfatasa alcalina (C). Las diluciones empleadas fueron: 1:1  
50 (dilución -); 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 (Dilución +); blanco (C-). **A:** B2GP1-IgM, **B:**  
B2GP1-IgG, **C:** B2GP1-IgA.

55

**Figura 2:** Variabilidad interensayo de 10 ensayos con 8 diluciones de la construcción  
B2GP1-IgM. En el eje X se representa la concentración de inmunocomplejo artificial y  
60 en el eje Y el valor de densidad óptica medida a 450 nm. **A:** media, **B:** mediana.

65

**Figura 3:** Variabilidad interensayo de 10 ensayos con 8 diluciones de la construcción B2GP1-IgG. En el eje X se representa la concentración de inmunocomplejo artificial y en el eje Y el valor de densidad óptica medida a 450 nm. **A:** media, **B:** mediana.

5 **Figura 4:** Variabilidad interensayo de 10 ensayos con 8 diluciones de la construcción B2GP1-IgA. En el eje X se representa la concentración de inmunocomplejo artificial y en el eje Y el valor de densidad óptica medida a 450 nm. **A:** media, **B:** mediana.

10 **Figura 5:** Curva de calibración y ecuación correspondiente para los calibres B2GP1-IgM (**A**), B2GP1-IgG (**B**) y B2GP1-IgA (**C**), calculada con los valores medios para cada punto de los 10 experimentos referidos en las figuras 2 a 4 respectivamente. A la derecha de cada curva se representa la ecuación de la curva, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor de P del estudio para cada calibre.

15 **Figura 6.** Comparación entre sistemas de calibración de inmunocomplejos B2GP1. A (blanco), B-H diluciones seriadas 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64 en PBS respectivamente de concentraciones de inmunocomplejos artificiales B2GP1-IgA (por duplicado, muestras a y b) y de tres muestras de inmunocomplejos nativos B2GP1-IgA(aB2GP1) obtenidas de tres pacientes (muestras #1, #2 y #3).

## 35 EJEMPLOS

40 Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo, aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

### 45 **Ejemplo 1: Obtención de los inmunocomplejos artificiales**

50 Las proteínas de fusión, proteínas quiméricas o inmunocomplejos artificiales se generaron fusionando la secuencia de la proteína B2GP1 a un fragmento de la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas IgM, IgG o IgA.

55 Las secuencias que codifican para las construcciones B2GP1-IgM (SEQ ID NO:1), B2GP1-IgG (SEQ ID NO:3) e B2GP1-IgA (SEQ ID NO:5) se amplificaron mediante PCR (30 ciclos con una temperatura de cebado de 60°C 1 min y un tiempo de expansión de un minuto a 72 °C). A continuación, las secuencias amplificadas se

5 introdujeron en el plásmido pLVX-IRES-tdTomato (Clontech, Takara Bio USA, Inc.,  
Mountain View, CA 94043, USA). Se obtuvieron 3 plásmidos, en el que cada uno de  
ellos contiene respectivamente las secuencias nucleotídicas B2GP1-Mu-C2C3C4  
10 (B2GP1 fusionada a los dominios constante 2, 3 y 4 de la cadena pesada de IgM, SEQ  
ID NO:2), B2GP1-FcIgG (SEQ ID NO:4) y B2GP1-FcIgA (SEQ ID NO:6). Cada uno de  
los plásmidos se introdujo en las bacterias "*Stellar competent E.Coli cells*" (Clontech,  
Takara Bio USA, Inc.) por choque térmico según el protocolo del fabricante. Se  
15 seleccionaron las colonias positivas mediante selección antibiótica y se cultivaron en  
durante 24 - 48h a 37°C. El DNA plasmídico de las colonias transformantes se extrajo  
y se purificó mediante un kit de purificación, según las indicaciones del fabricante  
20 (Clontech, Takara Bio USA, Inc.).

A continuación, se transfectaron las células humanas HEK-293 (riñón embrionario) con  
25 Lipofectamina 2000 según especificaciones del fabricante (Thermofisher Scientific).

Durante el cultivo se expresa la proteína de fusión codificada en la construcción génica  
30 respectiva. Las proteínas expresadas se secretan en el sobrenadante del cultivo  
celular. Una vez acumulados 500 ml de sobrenadante, la proteína de fusión se purificó  
mediante columnas de afinidad.

35 Este procedimiento se realizó para cada una de las tres construcciones. Una vez  
purificadas, se obtuvieron las proteínas de fusión (o proteínas quiméricas o  
40 inmunocomplejos artificiales B2GP1-IgM (SEQ ID NO:1), B2GP1-IgG (SEQ ID NO:3) y  
B2GP1-IgA (SEQ ID NO:5).

45 La **Figura 1** muestra la detección de las construcciones mediante ELISA revelado con  
el sustrato peroxidasa (A, B) o fosfatasa alcalina (C). El experimento se realizó por  
50 cuadruplicado usando varias diluciones de la proteína de fusión purificada. Las  
diluciones empleadas fueron: 1:1 (dilución -); 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 (Dilución +);  
blanco (C-). A: B2GP1-IgM, B: B2GP1-IgG, C: B2GP1-IgA.

55 La zona de fusión entre la proteína B2GP1 y el fragmento de la cadena pesada de la  
inmunoglobulina correspondiente es esencial para que la proteína de fusión sea  
60 estable y, por lo tanto, pueda emplearse como calibre en sistemas de detección de  
inmunocomplejos circulantes.

65

Los aminoácidos seleccionados para la fusión del fragmento de las cadenas pesadas de inmunoglobulina en cada isotipo, tiene como objetivo que la molécula quimérica generada conserve el plegamiento fisiológico de las dos subunidades fusionadas. El  
5 mantenimiento de la estructura es clave en el diseño de los inmunocomplejos artificiales. La zona seleccionada de la cadena pesada de cada inmunoglobulina que se une a la secuencia de B2GP1 es crítica para que en el producto de fusión  
10 mantenga la estructura tridimensional de ambas subunidades (B2GP1 y fragmento de cadena pesada de la inmunoglobulina correspondiente) y, por tanto, sus características antigénicas.  
15

Se ha comprobado que, si la unión entre B2GP1 y la cadena pesada de IgG tiene  
20 lugar, por ejemplo, al principio de la región bisagra de la cadena pesada, la proteína resultante tiene el tamaño adecuado, pero esta construcción no es reconocida por anticuerpos anti-B2GP1 H219 (Mabtech, Estocolmo, Suecia) ni por los anticuerpos  
25 policlonales anti-IgG1 humana (Sigma, Jackson e Inova).

Por el contrario, estos anticuerpos anti-B2GP1 H219 (Mabtech, Estocolmo, Suecia) y  
30 los tres anticuerpos policlonales anti-IgG1 humana (Sigma, Jackson e Inova) reconocen perfectamente a su molécula diana en la forma nativa (B2GP1 o IgG1, respectivamente).  
35

En el caso en el que la fusión entre B2GP1 y IgG tenga lugar excluyendo de la cadena pesada 21 aminoácidos de la región bisagra de IgG1, se ha comprobado que el  
40 producto de fusión resultante puede ser reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-B2GP1 H219 y por los tres anticuerpos policlonales anti IgG1 anteriormente mencionados.  
45

Con estos experimentos se demuestra que las fusiones entre B2GP1 y fragmentos de  
50 la cadena pesada de las inmunoglobulinas deben realizarse en determinadas posiciones de la secuencia. A partir de los datos obtenidos con B2GP1-IgG, se identificaron las regiones homólogas en las secuencias de la cadena pesada de IgM e  
55 IgA.

60

65

**Ejemplo 2: Calibración de sistemas de detección de inmunocomplejos circulantes con los inmunocomplejos artificiales.**

5

A continuación, se determinó si las construcciones pueden usarse en la calibración sistemas de detección de inmunocomplejos circulantes.

10

La detección de los inmunocomplejos se llevó a cabo como se describe en siguiendo los protocolos escritos en Martínez-Flores *et al.* 2015.

15

Se preparó una solución stock de cada proteína de fusión (calibre) a 400 U/ml diluyendo en PBS. A continuación, se añadió 0,1% de Proclin a cada solución stock (preservativo para soluciones de anticuerpos). A partir de la solución stock de cada construcción, se prepararon diluciones en PBS con valores conocidos de concentración para emplearse como calibres: 1,5 U/mL, 3,1 U/mL, 6,3 U/mL, 12,5 U/mL, 25 U/mL, 25 U/mL, 50 U/mL, 100 U/mL y 200 U/mL.

20

25

Se realizaron 10 ensayos independientes (curvas de calibración) para cada concentración (calibre) de cada uno de los inmunocomplejos artificiales por triplicado. Los coeficientes de variación siempre fueron menores del 5%, para todos puntos de todos los experimentos, lo que indica que la variabilidad intraensayo de los triplicados paca cada dilución es muy baja.

30

35

La variabilidad interensayo para los 10 ensayos de 8 puntos (diluciones de cada construcción) también fue muy baja. En la Figuras 2-4 se muestra la variabilidad de las mediciones de cada inmunocomplejo artificial (**Figura 2:** B2GP1-IgM, **Figura 3:** B2GP1-IgG, **Figura 4:** B2GP1-IgA) en los que la gráfica A muestra la media y la gráfica B muestra la mediana, de los valores de densidad óptica (DO) a 450 nm para cada concentración. Las determinaciones fueron realizadas de forma automatizada en un autoanalizador Triturus® (Grifols, Barcelona, España).

40

45

50

Para determinar la fortaleza y reproducibilidad de los ensayos, se analizaron los coeficientes de correlación intraclase de los datos de las 10 curvas de calibración para cada inmunocomplejo artificial (Figuras 2, 3 y 4). El coeficiente de correlación intraclase para la proteína de fusión B2GP1-IgM es de 0,985 (95% IC: 0.964-0.997;  $p < 0,0001$ ), para la proteína de fusión B2GP1-IgG es de 0,991 (95% IC: 0,978-0,998;  $p < 0,0001$ ) y para la proteína de fusión con IgA 0,988 (95% Intervalo confianza 0,970-0,997;  $p < 0,0001$ ). Estos datos indican que las curvas de calibración realizadas

55

60

65

utilizando los inmunocomplejos artificiales de la invención tienen una variabilidad muy baja. El análisis estadístico se realizó con el programa MedCalc V. 14.12 (MedCalc Software Bvba, Oostende, Bélgica).

5

La **Figura 5** muestra las curvas de calibración de los valores medios de los 10 ensayos para cada uno de los inmunocomplejos artificiales (A-C). A la derecha de cada curva se indica la función (o ecuación) de la curva correspondiente, su coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor P de cada ensayo, que expresa la probabilidad de que los resultados obtenidos sean debidos al azar. Valores de  $p < 0,01$  son indicativos de que los resultados no son debidos al azar. Las fórmulas se obtienen automáticamente a partir del software del autoanalizador. Las funciones de las curvas de calibración se corresponden a una ecuación tipo  $y = ax + bx^2 + c$  ( $U/mL = aOD + bOD^2 + c$ ). Sustituyendo en la curva de calibración los valores de densidad óptica de la muestra de un paciente se obtiene la concentración de inmunocomplejos circulantes.

10

15

20

25

### **Ejemplo 3. Comparación entre sistemas de calibración.**

30

Con el fin de mostrar las diferencias entre los calibres B2GP1-aB2GP1 nativos y los calibres B2GP1-Ig artificiales, se realizó un experimento en el que se compararon los dos sistemas de calibración.

35

40

Para ello se realizaron diluciones seriadas 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64 en PBS de concentraciones conocidas de tres muestras de inmunocomplejos nativos B2GP1-IgA(aB2GP1) obtenidas de tres pacientes (muestras #1, #2 y #3) y otra de una muestra de inmunocomplejos artificiales B2GP1-IgA. El ensayo con el inmunocomplejo artificial se realizó por duplicado (a, b).

45

50

Las muestras de los pacientes se obtuvieron en el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre a partir de muestras remitidas para realizar un examen de salud. Se usaron únicamente como muestras para los ensayos el suero sobrante de las muestras de forma anónima.

55

Las concentraciones de inmunocomplejos empleados como calibres fueron las indicadas en la **Tabla 2**.

60

65

**Tabla 2: Calibres de inmunocomplejos**

	Dilución	B2GP1-IgA (U/mL)	Paciente #1 (U/mL)	Paciente #2 (U/mL)	Paciente #3 (U/mL)
5	A	Blanco	0	0	0
10	B	1	800	204	156
	C	1:2	400	102	78
	D	1:4	200	56	39
15	E	1:8	100	28	20
	F	1:16	50	14	10
	G	1:32	25	7	5
20	H	1:64	12,5	3,5	2,5

25 La determinación de los niveles de inmunocomplejos se realizó siguiendo el protocolo descrito en Martínez-Flores *et al.* (2015), en el que en vez de sueros se añadieron los calibres: inmunocomplejos nativos (pacientes #1, #2 y #3) e inmunocomplejos artificiales (B2GP1-IgA).

30 La **Figura 6** muestra el resultado del experimento en el que se observan las diferencias en la concentración de inmunocomplejos en relación a la intensidad de color en cada pocillo. Las filas A-H se corresponden a la concentración de inmunocomplejos de indicada en la Tabla 1. Se observa que los inmunocomplejos artificiales B2GP1-IgA (por duplicado, muestras a y b) pueden emplearse como calibres en la determinación de inmunocomplejos circulantes de la misma forma que hasta la fecha se empleaban los inmunocomplejos nativos B2GP1-IgA(aB2GP1). Este experimento se repitió con los inmunocomplejos artificiales B2GP1-IgG y B2GP1-IgM, obteniéndose el mismo resultado que con B2GP1-IgA.

50 La función para calcular las unidades de cada paciente a partir de la densidad óptica del ensayo basándose en los valores de referencia de la curva de calibración la realiza de forma automática el software del autoanalizador. La función de la curva la calcula el autoanalizador para cada ensayo de calibración de forma independiente.

#### 60 **Ejemplo 4: Detección de los inmunocomplejos circulantes en suero**

65 Con el fin de determinar si los inmunocomplejos artificiales pueden usarse como calibres en sistemas de detección de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1,

se realizó un ELISA de captura en el que se detectó la presencia de los inmunocomplejos circulantes en el suero de los pacientes.

5 Se obtuvieron 86 muestras consecutivas de la seroteca del Hospital 12 de Octubre (España) y se determinó la concentración de inmunocomplejos circulantes tal y como se describe en Martínez-Flores *et al.* (2015), usando como calibres las  
10 concentraciones 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,1 y 1,5 de los inmunocomplejos artificiales B2GP1-IgM, B2GP1-IgG e B2GP1-IgA.

15 Placas de 96 pocillos Nunc maxisorp™ (A/S Nunc, Kamstrup, Roskilde, Dinamarca) se cubrieron con 100 µl por pocillo de solución de 2 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-B2GP1 humano H219 (Mabtech AB, Nacka Strand, Suecia) en PBS a pH 7,4. Las  
20 placas se incubaron durante 16 horas a 4 °C y a continuación se lavaron tres veces con PBS-Tween-20 0,05% (PBS-T). Posteriormente los pocillos se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino 0,1% (Sigma-Aldrich, St.  
25 Louis, MO, EEUU) en PBS.

30 Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y a continuación se añadieron 100 µL de los sueros problema diluidos en PBS 1:100 en PBS. Se incubaron 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T tres veces y se detectó la presencia de cada isotipo del anticuerpo aB2GP1 con 100 µL de anticuerpo de cabra anti-IgG, anti-  
35 IgM o anti-IgA humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EE. UU.) conjugado con peroxidasa de rábano picante, diluido 1:1000 en PBS. Las placas se incubaron 30 minutos con el anticuerpo anti-Ig humana a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS-T.  
40

45 La reacción se reveló con una solución de tetrametilbenzidina (TMB) durante 30 minutos y finalmente se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. La densidad óptica (DO) de cada pocillo se leyó con un filtro de 450 nm (filtro de referencia, 620 nm) y se restó la  
50 absorbancia de los pocillos que contienen el blanco. Los valores de DO obtenidos para cada muestra se usaron para calcular la cantidad de cada tipo de inmunocomplejos de acuerdo con los valores de calibración obtenidos previamente. Todo el procedimiento  
55 se realizó en Triturus Analyzer (Diagnostics Grifols S.A., Barcelona, España).

60 La Tabla 3 muestra los valores de DO de las curvas de calibración para cada concentración de inmunocomplejo artificial. Los valores de la tabla corresponden al valor registrado por el autoanalizador menos el valor del blanco en cada caso.

65

**Tabla 3. Densidad óptica (DO) de los calibres de cada inmunocomplejo**

Concentración (U/mL)	DO B2GP1-IgM	DO B2GP1-IgG	DO B2GP1-IgA
0 (blanco)	0,066	0,047	0,043
200	3,150	2,417	2,944
100	2,223	1,425	2,485
50	1,384	0,906	1,599
25	0,752	0,529	0,882
12,5	0,363	0,309	0,490
6,3	0,205	0,226	0,260
3,1	0,103	0,092	0,130
1,5	0,054	0,012	0,064

La **Tabla 4** muestra la concentración para las muestras en función de su DO a 450 nm, calculada a partir de la función de la curva de calibrado obtenida a partir de los resultados de la Tabla 3 para cada uno de los inmunocomplejos artificiales. Para que un sujeto se considere que tiene riesgo es necesario que el valor de concentración de inmunocomplejos al menos uno de los isotipos analizados (IgM, IgG o IgA) sea superior a 20,5 U/mL.

**Tabla 4: Determinación de inmunocomplejos circulantes en sueros de pacientes**

Muestra	DO 450 nm			Concentración (U/mL)			Interpretación
	B2GP1-aB2GP1 IgM	B2GP1-aB2GP1 IgG	B2GP1-aB2GP1 IgA	B2GP1-aB2GP1 IgM	B2GP1-aB2GP1 IgG	B2GP1-aB2GP1 IgA	
1	0,097	0,061	0,019	5,1	2,9	<2	Negativo
2	0,183	0,091	0,063	6,3	4,3	2,5	Negativo
3	0,378	0,116	0,155	10	5,6	4,9	Negativo
4	0,043	0,065	0,159	4,5	3,1	5	Negativo
5	0,085	0,1	0,079	5	4,8	2,9	Negativo
6	0,056	0,063	0,049	4,6	3	2,1	Negativo
7	0,144	0,09	0,136	5,8	4,3	4,4	Negativo
8	0,086	0,427	0,08	5	<b>22,5</b>	2,9	<b>Positivo IgG</b>
9	0,075	0,074	0,075	4,9	3,5	2,8	Negativo
10	1,952	0,156	0,467	<b>85,3</b>	7,6	16,1	<b>Positivo IgM</b>
11	0,105	0,125	0,118	5,2	6	3,9	Negativo
12	0,071	0,059	0,083	4,8	2,8	3	Negativo
13	0,135	0,118	0,054	5,6	5,7	2,3	Negativo

ES 2 727 261 B2

	14	0,218	0,082	0,058	6,9	3,9	2,4	Negativo
5	15	0,121	0,102	0,024	5,4	4,9	<2	Negativo
	16	0,027	0,076	0,098	4,3	3,6	3,3	Negativo
	17	0,049	0,065	0,036	4,6	3,1	<2	Negativo
	18	0,259	0,082	0,043	7,6	3,9	2	Negativo
10	19	0,095	0,061	0,099	5,1	2,9	3,4	Negativo
	20	0,142	0,061	0,022	5,7	2,9	<2	Negativo
	21	0,064	0,143	0,162	4,7	6,9	5,1	Negativo
15	22	0,341	0,094	0,18	9,2	4,5	5,6	Negativo
	23	0,056	0,088	0,059	4,6	4,2	2,4	Negativo
	24	0,066	0,145	0,123	4,8	7	4	Negativo
	25	0,387	0,177	0,177	10,2	8,7	5,5	Negativo
20	26	0,06	0,04	0,021	4,7	<2	<2	Negativo
	27	0,032	0,123	0,02	4,4	5,9	<2	Negativo
	28	0,072	0,11	0,037	4,8	5,3	<2	Negativo
	29	0,44	0,057	0,026	11,4	2,7	<2	Negativo
25	30	0,041	0,056	0,072	4,5	2,6	2,7	Negativo
	31	0,029	0,071	0,017	4,3	3,4	<2	Negativo
	32	0,225	0,045	0,074	7	2,1	2,7	Negativo
30	33	0,1	0,063	0,093	5,2	3	3,2	Negativo
	34	0,245	0,072	0,12	7,4	3,4	3,9	Negativo
	35	0,24	0,057	0,027	7,3	2,7	<2	Negativo
	36	0,125	0,064	0,099	5,5	3	3,4	Negativo
35	37	0,114	0,123	0,15	5,4	5,9	4,7	Negativo
	38	0,051	0,11	0,116	4,6	5,3	3,8	Negativo
	39	0,072	0,107	0,131	4,8	5,1	4,2	Negativo
	40	0,031	0,137	0,046	4,4	6,6	2,1	Negativo
40	41	0,043	0,015	0,017	4,5	<2	<2	Negativo
	42	0,073	0,055	0,057	4,8	2,6	2,3	Negativo
	43	0,047	0,036	0,237	4,5	<2	7,4	Negativo
	44	0,035	0,024	0,027	4,4	<2	<2	Negativo
45	45	0,145	0,048	0,582	5,8	2,2	<b>21,4</b>	<b>Positivo IgA</b>
	46	0,052	0,065	0,051	4,6	3,1	2,2	Negativo
	47	0,64	0,094	0,069	16,9	4,5	2,6	Negativo
50	48	0,08	0,067	0,048	4,9	3,2	2,1	Negativo
	49	0,568	0,053	0,099	14,8	2,5	3,4	Negativo
	50	0,256	0,043	0,036	7,6	2	<2	Negativo
	51	0,076	0,281	0,05	4,9	14,2	2,2	Negativo
55	52	0,044	0,058	0,035	4,5	2,7	<2	Negativo
	53	0,035	0,077	0,022	4,4	3,6	<2	Negativo
	54	3,7	0,124	0,872	<b>264,6</b>	6	<b>37,6</b>	<b>Positivo IgM, IgA</b>
	55	0,049	0,036	0,167	4,6	<2	5,2	Negativo
60	56	0,57	0,076	0,082	14,8	3,6	2,9	Negativo
	57	0,227	0,105	0,062	7,1	5	2,5	Negativo
	58	0,217	0,024	0,062	6,9	<2	2,5	Negativo
65	59	0,05	0,055	0,024	4,6	2,6	<2	Negativo
	60	0,043	0,062	0,029	4,5	2,9	<2	Negativo
	61	0,059	0,041	0,024	4,7	<2	<2	Negativo

	62	0,22	0,046	0,022	6,9	2,2	<2	Negativo
	63	0,054	0,057	0,046	4,6	2,7	2,1	Negativo
5	64	0,125	0,063	0,544	5,5	3	19,6	Negativo
	65	0,086	0,23	0,021	5	11,4	<2	Negativo
	66	0,125	0,041	0,093	5,5	<2	3,2	Negativo
	67	0,087	0,067	0,107	5	3,2	3,6	Negativo
10	68	0,042	0,059	0,048	4,5	2,8	2,1	Negativo
	69	0,164	0,038	0,123	6,1	<2	4	Negativo
	70	0,073	0,105	0,07	4,8	5	2,6	Negativo
	71	0,018	0,05	0,027	4,2	2,3	<2	Negativo
15	72	0,089	0,045	0,029	5	2,1	<2	Negativo
	73	0,207	0,059	0,036	6,7	2,8	<2	Negativo
	74	0,08	0,058	0,06	4,9	2,7	2,4	Negativo
20	75	0,145	0,033	0,041	5,8	<2	2	Negativo
	76	0,011	0,054	0,021	4,2	2,5	<2	Negativo
	77	0,063	0,051	0,076	4,7	2,4	2,8	Negativo
	78	0,128	0,06	0,025	5,5	2,8	<2	Negativo
25	79	0,12	0,109	0,367	5,4	5,2	12	Negativo
	80	0,092	0,082	0,07	5,1	3,9	2,6	Negativo
	81	0,091	0,084	0,097	5,1	4	3,3	Negativo
	82	0,077	0,048	0,075	4,9	2,2	2,8	Negativo
30	83	0,615	0,214	0,004	16,1	10,6	<2	Negativo
	84	0,049	0,099	0,069	4,6	4,7	2,6	Negativo
	85	0,177	0,076	0,036	6,3	3,6	<2	Negativo
35	86	1,22	0,052	0,018	<b>40,1</b>	2,4	<2	<b>Positivo IgM</b>

40 De este experimento se concluye que la curva de calibrado preparada con  
 inmunocomplejos artificiales B2GP1-IgM, B2GP1-IgG y B2GP1-IgA sirve para realizar  
 curvas de calibrado con una alta reproductibilidad para usarse en la detección de  
 45 inmunocomplejos circulantes de pacientes.

## 50 LISTADO DE SECUENCIAS

Se describen las siguientes secuencias como parte de la invención:

- 55
- SEQ ID NO:1 Secuencia proteica del inmunocomplejo artificial B2GP1-IgM.
  - SEQ ID NO:2 Secuencia nucleotídica del inmunocomplejo artificial B2GP1-IgM.
  - 60 - SEQ ID NO:3 Secuencia proteica del inmunocomplejo artificial B2GP1-IgG.
  - SEQ ID NO:4 Secuencia nucleotídica del inmunocomplejo artificial B2GP1-IgG.
  - SEQ ID NO:5 Secuencia proteica del inmunocomplejo artificial B2GP1-IgA.
  - 65 - SEQ ID NO:6 Secuencia nucleotídica del inmunocomplejo artificial B2GP1-IgA.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un inmunocomplejo artificial que comprende la proteína beta-2 glicoproteína 1 humana (B2GP1) unida a un fragmento de la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina, caracterizado porque la secuencia de dicho inmunocomplejo comprende una secuencia identificada por la SEQ ID NO:1, la
- 10 SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:5.
- 15 2. Método para calibrar un sistema analítico de detección de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 que comprende:
- 20 a) diluir el inmunocomplejo artificial de la reivindicación 1 al menos a dos concentraciones distintas conocidas;
- 25 b) determinar la densidad óptica de cada concentración de la etapa anterior;
- 30 c) realizar una curva de calibración que relacione cada concentración de la etapa a) con su respectiva densidad óptica obtenida en la etapa b);
- 35 d) obtener una función matemática que defina la curva de calibración de la etapa c).
- 40 3. Método para determinar la concentración de un inmunocomplejo circulante B2GP1-aB2GP1 en una muestra, que comprende:
- 45 a) diluir el inmunocomplejo artificial de la reivindicación 1 al menos a dos concentraciones distintas;
- 50 b) determinar la densidad óptica de cada concentración de la etapa anterior;
- 55 c) realizar una curva de calibración que relacione cada concentración de la etapa a) con su respectiva densidad óptica obtenida en la etapa b);
- 60 d) obtener una función matemática que defina la curva de calibración de la etapa c);
- 65 e) medir la densidad óptica de una muestra biológica obtenida de un sujeto,
- 70 f) determinar la concentración de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1 en la muestra a partir de la función obtenida en el paso d).
- 75 4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la muestra biológica del sujeto es suero o plasma.

5  
10  
15

5. Método para determinar si un sujeto tiene riesgo de sufrir manifestaciones patológicas asociadas con el síndrome antifosfolípido (APS), que comprende determinar la concentración de inmunocomplejos circulantes en una muestra de un paciente de acuerdo con el método de las reivindicaciones 3 o 4, en el que un valor de concentración igual o superior a 20,5 U/mL es indicativo de que el sujeto tiene alto riesgo de sufrir manifestaciones patológicas asociadas con el APS.

20  
25

6. Uso de cualquiera de los inmunocomplejos artificiales de la reivindicación 1 como calibre en un sistema de detección de inmunocomplejos circulantes B2GP1-aB2GP1.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

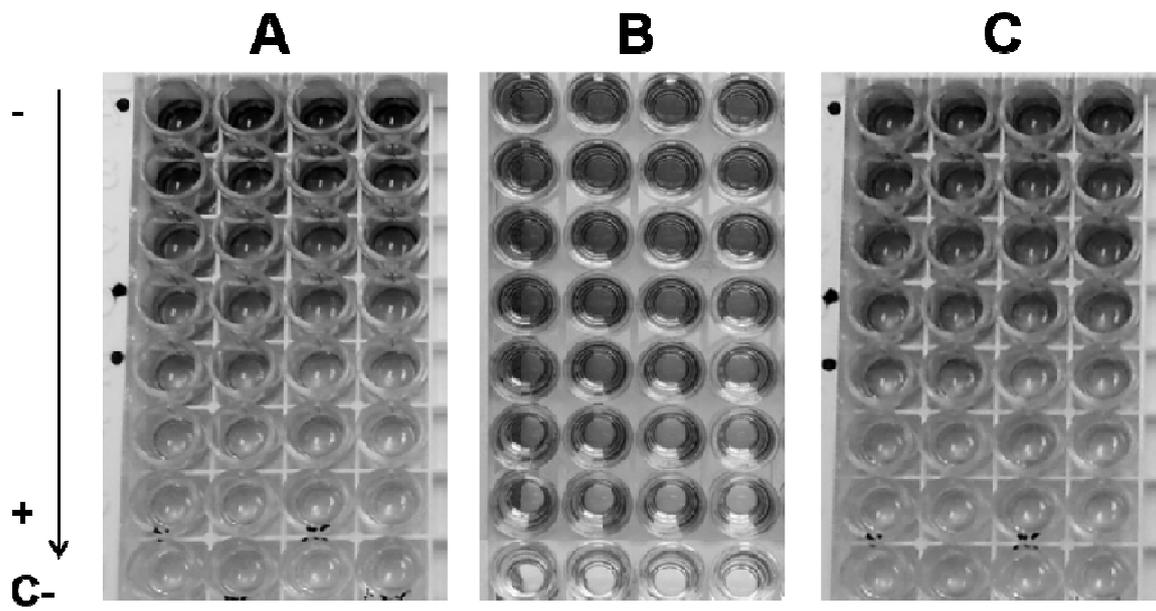


FIGURA 2

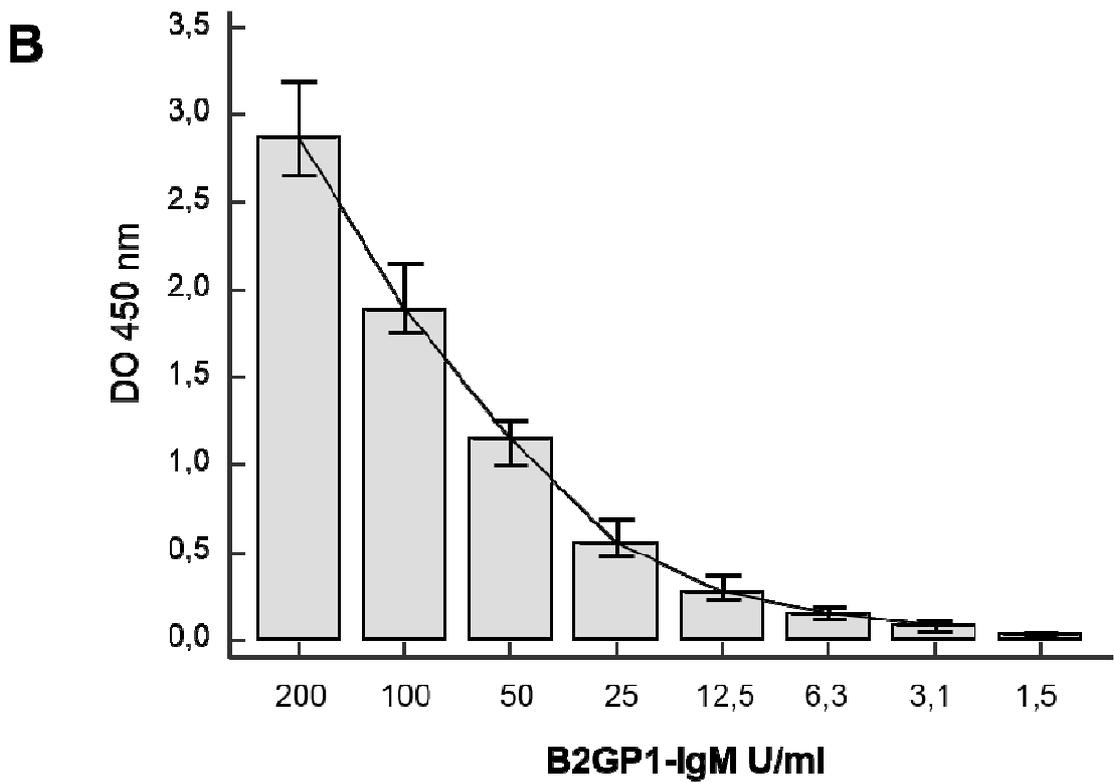
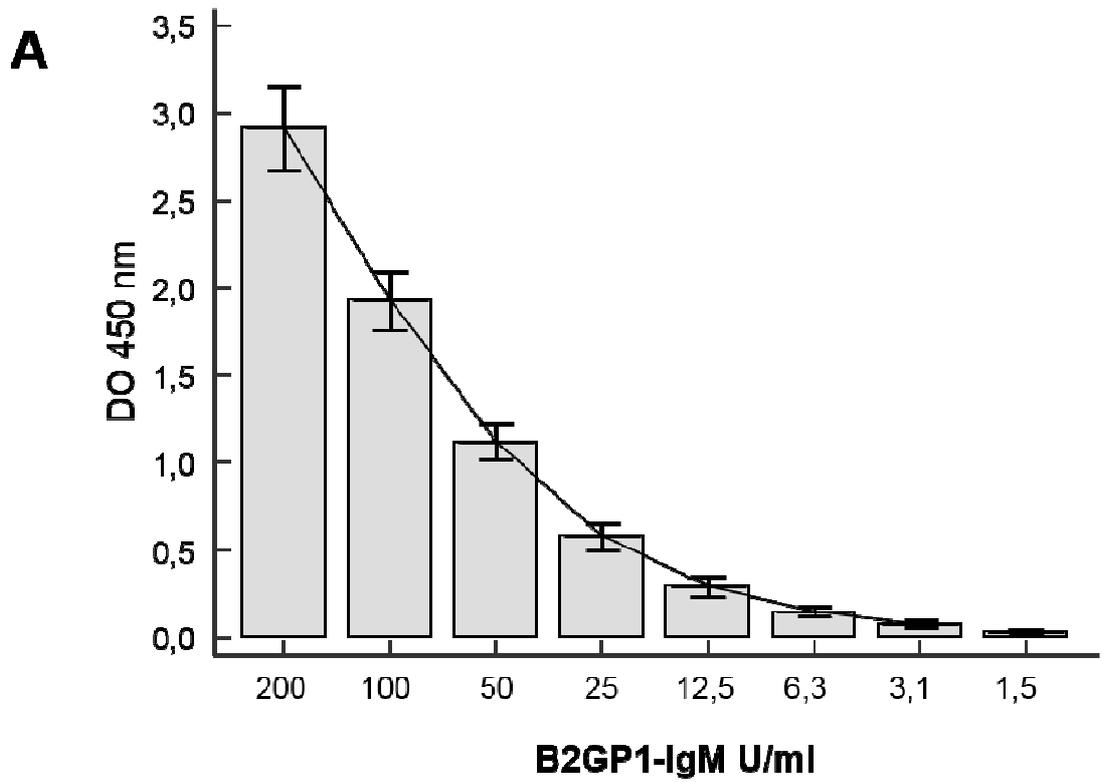


FIGURA 3

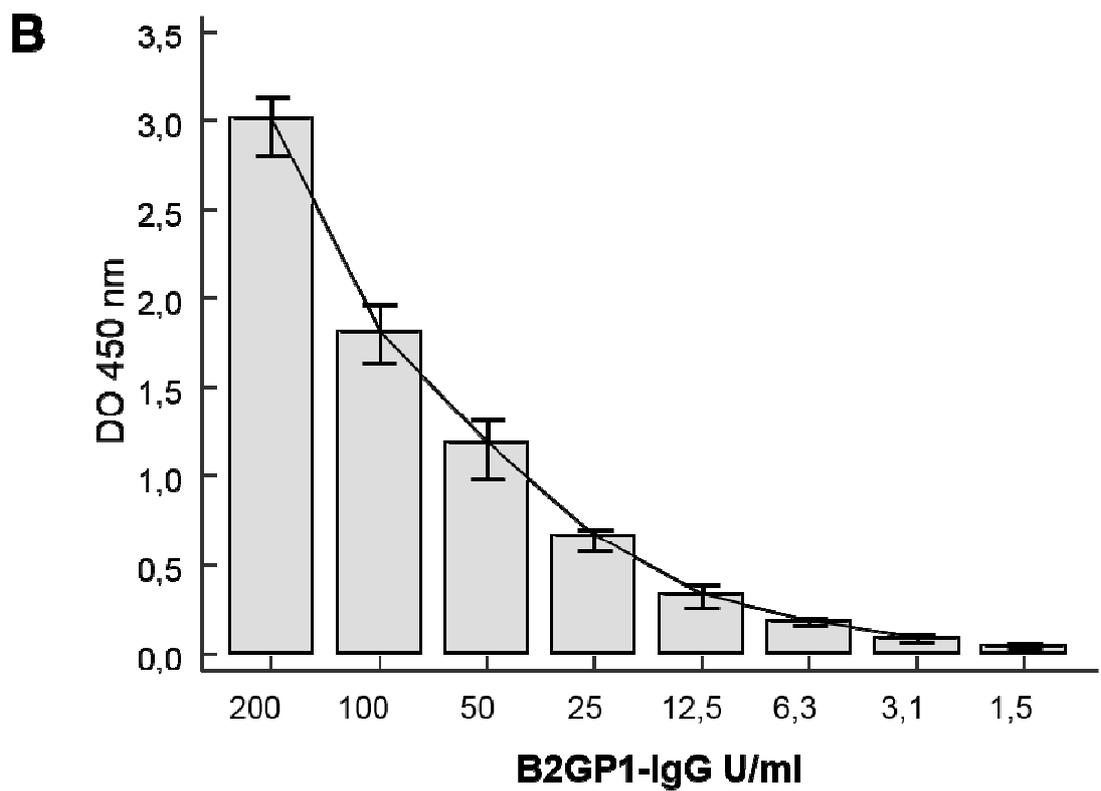
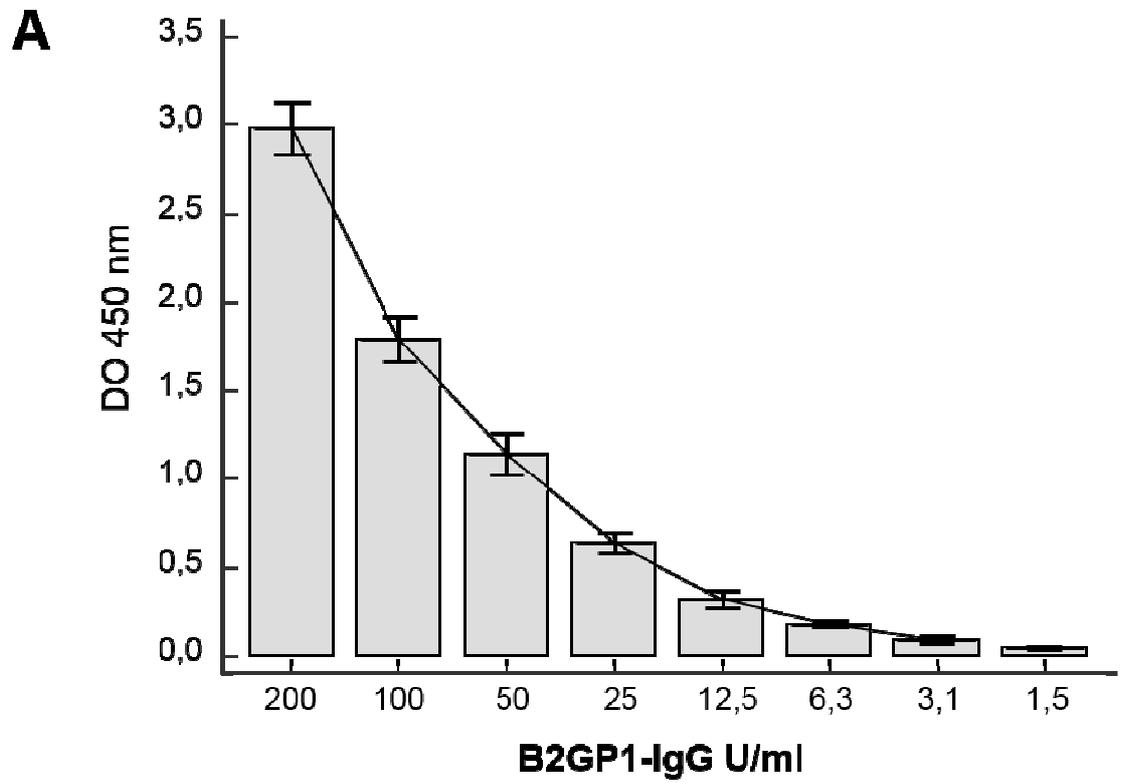


FIGURA 4

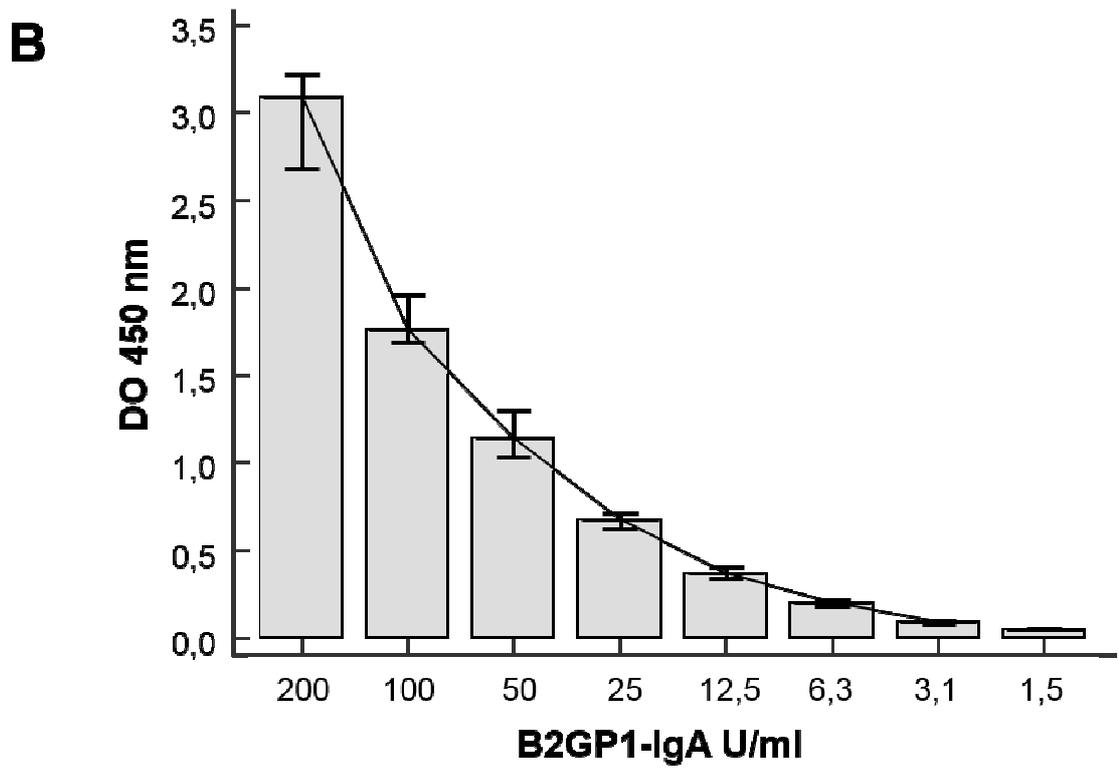
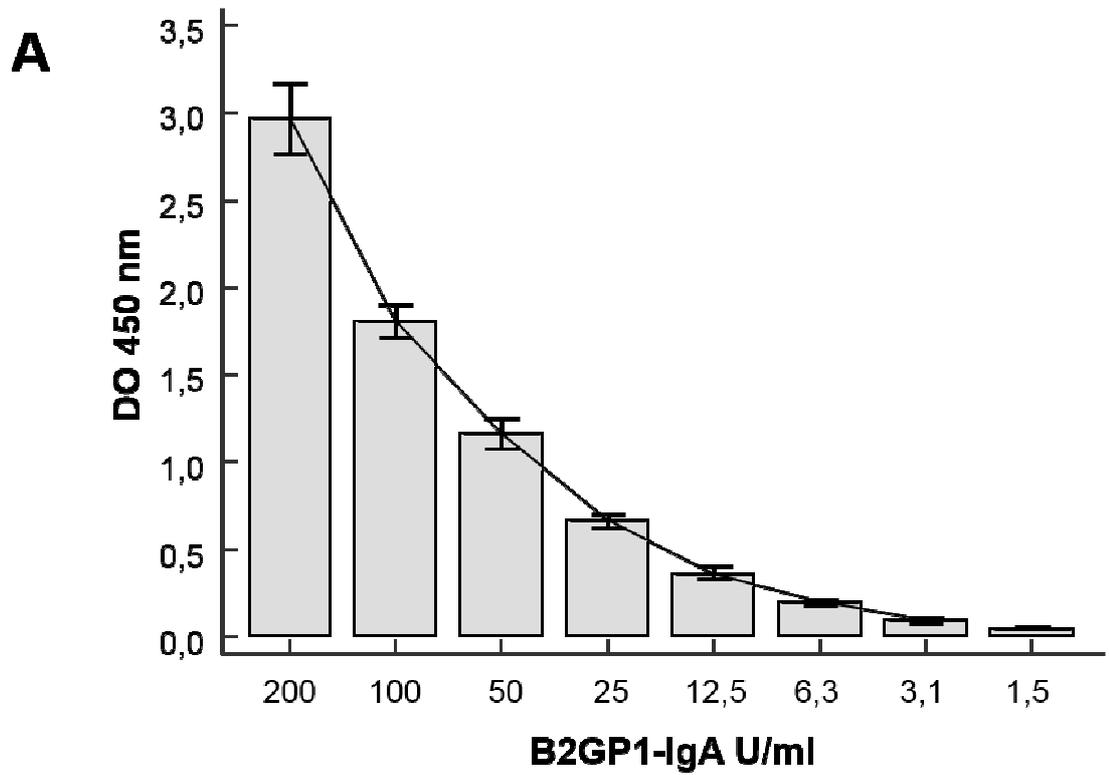
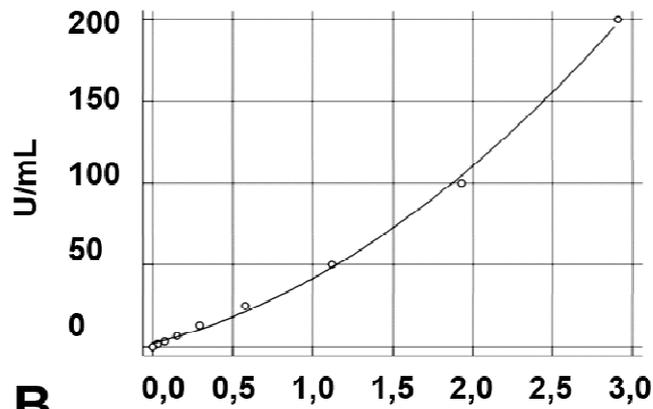


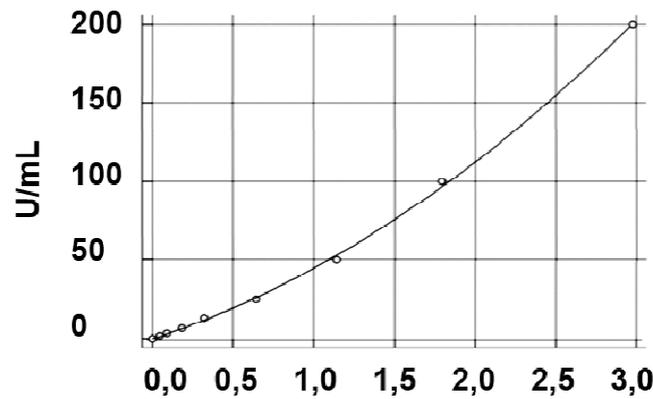
FIGURA 5

**A**



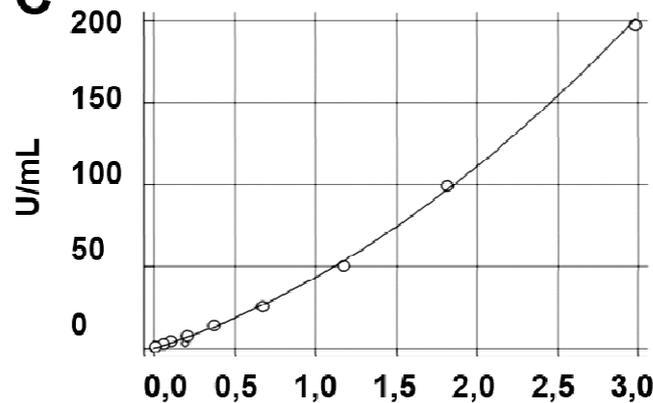
**B2GP1-IgM**  
 $U/mL = 24,4DO + 14,4DO^2 + 2,1$   
 $R^2 = 1,00; P < 0,001$

**B**



**B2GP1-IgG**  
 $U/mL = 33,7DO + 11,3DO^2 - 0,1$   
 $R^2 = 1,00; P < 0,001$

**C**



**B2GP1-IgA**  
 $U/mL = 31,7DO + 12,1DO^2 - 0,3$   
 $R^2 = 1,00; P < 0,001$

FIGURA 6

