(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 729 317**

(51) Int. Cl.:
A61P 37/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2014** **PCT/EP2014/064400**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015** **WO15004038**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2014** **E 14741228 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 3019525**

(54) Título: **Anticuerpos a β2-glicoproteína I y usos terapéuticos de estos**

(30) Prioridad:

10.07.2013 US 201361844505 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2019

(73) Titular/es:

ONCONOX APS (100.0%)
Ole Maaløes Vej 3
2200 Copenhagen, DK

(72) Inventor/es:

TEDESCO, FRANCESCO;
MERONI, PIER LUIGI y
SBLATTERO, DANIELE

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 729 317 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 a β2-glicoproteína I y usos terapéuticos de estos

La presente invención proporciona anticuerpos recombinantes humanos o fragmentos de estos, según se define en las reivindicaciones adjuntas, para el tratamiento de pacientes afectados por síndrome antifosfolípido (APS). Más específicamente, la invención proporciona un anticuerpo recombinante humano que tiene especificidad para la β2-glicoproteína I (β2GPI), que comprende un VH de SEQ ID NO: 1 y un VL de SEQ ID NO: 2 y carece de un dominio CH2, en la que dicho anticuerpo reconoce una región correspondiente al dominio DI de la β2-glicoproteína I (β2GPI) y se vuelve incapaz de fijarse a complemento, y el uso de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo para el tratamiento o prevención de formación de trombos, oclusión de vasos o pérdida del feto en un paciente afectado por síndrome antifosfolípido (APS).

Antecedentes de la invención

El síndrome antifosfolípido (APS) es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por trombosis arterial y/o venosa recurrente y morbilidad maternal en la presencia persistente de autoanticuerpos contra proteínas de unión a fosfolípidos (aPL). El síndrome ocurre ya sea como trastorno primario o secundario con respecto a otros trastornos autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico. El APS tiene un impacto fuerte a nivel social y económico que afecta principalmente a personas jóvenes e induce a incapacidad como una consecuencia de ataque cerebrovascular o infarto de miocardio [1]. Unos pocos pacientes manifiestan una forma mortal de APS que se caracteriza por oclusión trombótica de pequeños vasos en diferentes órganos desarrollando y conduciendo a falla multiorgánica en un breve período de tiempo [2]. La morbilidad maternal incluye abortos tempranos y tardíos recurrentes, restricción de crecimiento intrauterino, prematuridad, y preeclampsia con costes sociales y económicos altos [1,3].

Los datos obtenidos a partir de estudios clínicos y modelos animales proporcionan argumentos en cuanto a la participación de anticuerpos en formación de trombos y aborto en APS. A pesar de que varias proteínas de unión a PL se han identificado como dianas potenciales de un aPL, existe evidencia sólida en cuanto a que la β2-glicoproteína I (β2GPI) resulta el antígeno diana más relevante [4-7].

Hemos informado recientemente en cuanto a un aumento significativo de pérdida del feto en ratas preñadas que se inmunizan con β2GPI humana continuando con inyección de proteína purificada etiquetada con fluorescencia que se une selectivamente en sitios de implantación del feto [8]. Hemos descubierto también que el retiro de anticuerpos a β2GPI a partir de aPL-IgG purificada de pacientes con APS mediante cromatografía por afinidad reduce significativamente su efecto trombótico en la microcirculación mesentérica de la rata [9].

A pesar de que los anticuerpos divulgan una reactividad modesta con la molécula en la fase fluida, se acepta ampliamente que se unen preferiblemente a β2GPI presente en la membrana de diferentes tipos de células que incluyen células endoteliales, plaquetas, monocitos y el trofoblasto cumple un rol patogénico principal [10]. En particular, se ha sugerido recientemente que aPL patogénico reconoce un epítopo inmunodominante conformacional que se forma en Dominio I (DI) de β2GPI [7]. Los mecanismos de relación de aPL con respecto a coagulación sanguínea y pérdida del feto abarcan inhibición de anticoagulantes naturales y fibrinólisis, activación de células endoteliales, plaquetas y monocitos que dan como resultado una expresión de moléculas de adhesión y liberación de factor tisular, inhibición de diferenciación de sincitiotrofoblasto y promoción de inflamación decidual [10]. Sin embargo, estos efectos mediados por aPL se han propuesto principalmente sobre la base de datos *in vitro*, pero la relevancia *in vivo* de estas observaciones continúa pendiente der ser establecida por completo.

Se ha obtenido evidencia convincente en cuanto el rol crítico que ejerce un complemento en APS en modelos animales a partir del descubrimiento de Holers y colegas [11] en cuanto a que ratones deficientes de C3 o tratados con un inhibidor de la C3 convertasa se encuentran protegidos de reabsorción fetal mediada por aPL y retraso del crecimiento. Estudios posteriores condujeron a la identificación de los productos de activación de los C5a y MAC de vía terminal como mediadores de pérdida del feto y formación de trombos usando animales con deficiencias de complemento selectivas o tratados con inhibidores específicos [12]. A pesar de que la mayoría de estas observaciones se realizaron con aPL de especificidad indefinida, el rol del complemento en inducción de coagulación sanguínea mediada por aPL y reabsorción fetal se ha confirmado también usando anticuerpos específicos a β2GPI [8,9].

En los últimos años se han realizado mayores esfuerzos para controlar los efectos patológicos de aPL impidiendo el desarrollo de trombos y abortos. Anticoagulantes tales como heparina o warfarina se usan actualmente para impedir trombos vasculares y la combinación de aspirina de dosis baja y heparina de bajo peso molecular representa el tratamiento de primera línea para complicaciones obstétricas de APS. Sin embargo, a pesar del éxito de estos enfoques terapéuticos en varios pacientes con APS, existe todavía una buena proporción de pacientes que varía entre el 20 y 30% que no se benefician de estos tratamientos [13-14,15].

El documento WO0001729 divulga péptidos que se unen a anticuerpos anti-β2GPI humanos aislados de pacientes humanos e inhiben su unión a β2GPI. Los péptidos bloquean la capacidad de anticuerpos anti-β2GPI para mejorar la

adhesión de monocitos con respecto a células endoteliales, impiden l inducción de APS en ratas preñadas sin tratamiento y se establece que resultan útiles en el tratamiento de APS.

Di Simone N. et al (American Journal of Reproductive Immunology, 70, 299-308, 2013) divulga anticuerpos antifosfolípidos dependientes de β2GPI policlonales, un anticuerpo anti-β2GPI monoclonal humano aislado de paciente humano con APS y un péptido sintético que deriva a partir de citomegalovirus humano que imita el sitio de unión a fosfolípido de β2GPI y resulta capaz de impedir la reducción de angiogénesis que se induce a partir de anticuerpos anti-β2GPI. Se sugirió el uso potencial de este péptido para el tratamiento de APS.

Descripción de la invención

La invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a la β2-glicoproteína I (β2GPI) y su uso para el tratamiento o prevención de formación de trombos y pérdida del feto en un paciente afectado por síndrome antifosfolípido (APS).

Los anticuerpos recombinantes humanos o fragmentos de acuerdo con la invención reconocen una región correspondiente al dominio DI de β2GPI (véanse referencias bibliográficas 40 y 41 para una definición del dominio DI) y se vuelven incapaces de activar complemento a continuación de la unión a β2GPI.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de este resulta capaz de desplazar unión de autoanticuerpos del paciente a β2GPI en ensayos de unión competitiva in vitro.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de este contiene cadenas VH y VL que tienen secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2, respectivamente.

En otra realización, dichas cadenas VH y VL se codifican mediantes las secuencias de polinucleótidos que se identifican por SEQ ID NOs: 4 y 5, respectivamente.

En una realización preferida, dicho anticuerpo es una inmunoglobulina IgG humana.

En una otra realización, el fragmento de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo de cadena única (scFv), en la que VL y VH se fijan de manera operativa mediante un enlace.

En una realización todavía adicional, el fragmento de anticuerpo es un scFv-Fc que comprende, además, una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o un subdominio de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, en la que dicha región constante de cadena pesada de inmunoglobulina se selecciona preferiblemente a partir de la cadena pesada de IgG humana.

El anticuerpo de acuerdo con la invención o un fragmento de este, particularmente el fragmento scFv-Fc, se vuelve incapaz de fijar complemento mediante eliminación del dominio CH2 de IgG.

En otra realización preferida, los fragmentos scFv y scFv-Fc se codifican mediante las SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:3 de polinucleótidos, respectivamente. La secuencia de aminoácidos correspondiente del fragmento scFv-Fc se identifica mediante SEQ ID NO: 6.

El anticuerpo o fragmento de este de acuerdo con la invención puede comprender además una etiqueta de péptido que se posiciona en el terminal C, en la que dicha etiqueta no altera la especificidad de unión a la β2GPI de dicho anticuerpo.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene, como el ingrediente activo, el anticuerpo recombinante o fragmento de este según se define en la presente y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Aislamiento y caracterización de anticuerpo recombinante anti-β2GPI de humano.

El barrido de biblioteca de exhibición de fagos humanos contra β2GPI humana nos permitió seleccionar un scFv específico que se diseñó además en el formato scFv-Fc (MBB2) para contener la región bisagra, los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana. Análisis adicionales de MBB2 que se une a β2GPI inmovilizada mediante ELISA revelaron una fuerte reactividad del anticuerpo que resultó todavía capaz de detectar el antígeno diana a una concentración de 20 ng/ml (Fig. 1A) y una interacción modesta con β2GPI soluble (Fig. 2). El MBB2 no reaccionó con protrombina de unión de fase sólida. Debido a que nuestro objetivo consistió en usar el scFv-Fc en modelos animales, el anticuerpo se evaluó también en cuanto a su capacidad para reconocer β2GPI de ratón y se probó su reacción con la molécula de

murina de igual manera como con la contraparte humana, lo que sugirió el reconocimiento de un epítopo compartido (Fig. 1A). La reactividad de MBB2 con β2GPI a partir de otras especies de animales se evaluó también usando el ensayo de anticuerpo anticardiolipina convencional en el que las placas recubiertas de cardiolipina se tratan con regulador de bloqueo que contiene suero a partir de varios animales. Los resultados que se presentan en la Fig. 4 muestran que el anticuerpo reacciona en varios grados con β2GPI de unión a cardiolipina a partir de varias especies que incluyen rata, ratón, cerdo, cabra y bovino fetal. Dominios únicos recombinantes de la proteína β2GPI se usaron luego para identificar el epítopo diana del MBBA, y evaluando cuatro de cinco dominios, descubrimos que el anticuerpo se une al dominio DI (Fig. 1B). La unión de MBB2 a DI se confirmó posteriormente usando DI recombinante de unión de fase sólida según se describe por Ioannou et al. [16].

Para determinar si MBB2 interactúa con β2GPI de unión a células, HUVECs y BeWo se expusieron en primer lugar a β2GPI purificada para permitir que la superficie se una a la proteína y se incubaron luego con el scFv-Fc. Según se muestra en las Figs. 1C y D, el MBB2, a diferencia del anticuerpo no relacionado, resultó capaz de unirse a los dos tipos de células cargadas con β2GPI. La señal modesta que se observó en BeWo con la mayor concentración del anticuerpo de control resulta compatible con la expresión del receptor de IgG en estas células [17].

Efecto *in vivo* de MBB2 en formación de trombos y pérdida del feto.

Al descubrir que el MBB2 interactúa con D1 de β2GPI, buscamos investigar la capacidad del anticuerpo para generar coágulos sanguíneos y pérdida del feto en modelos animales en vista de la relevancia clínica de anticuerpos con esta especificidad en pacientes con APS. Con este fin, el anticuerpo se inyectó en ratas cebadas con LSP y su efecto procoagulante se monitoreó en microvasos mesentéricos mediante microscopía intravital. Según se muestra en la Fig. 3A, MBB2 indujo la formación de coágulos que siguieron un patrón bifásico con una fase temprana caracterizada por microagregados de plaqueta-leucocito ya visibles 10 min después de infusión de anticuerpo. La oclusión de vaso transitoria que se originó mediante estos agregados continuó con una segunda fase caracterizada por un aumento progresivo de tamaño de trombo que dio como resultado una oclusión permanente de los vasos sanguíneos (Fig. 3A y B). El MBB2 inyectado en ratas no cebadas originó conjugados leucocito-plaqueta pequeños que desaparecieron después de 60 minutos, mientras que el anticuerpo de control resultó completamente inefectivo (Fig. 3A y B).

En un segundo conjunto de experimentos, buscamos el efecto de MBB2 en resultado de embarazo en ratas. Una inyección única de 10 µg de anticuerpo resultó suficiente para inducir una tasa significativa de reabsorción fetal con un valor medio del 60%, que resultó significativamente mayor que el valor del 10% que se observó en animales que se trataron con una cantidad similar de scFv-Fc de control. Asimismo, se descubrió que el anticuerpo anti-β2GPI afecta el crecimiento fetal originando una reducción sustancial de peso fetal (Fig. 3C-D).

Se requiere complemento para el efecto *in vivo* de MBB2.

Para investigar la contribución de complemento con respecto al efecto patogénico de MBB2, analizamos en primero lugar la capacidad de unión de scFv-Fc a β2GPI inmovilizada para activar el complemento en la presencia de NHS como una fuente de complemento. Se descubrió que el MBB2 activa la vía clásica según se sugiere por la unión de C1q y C4 y que promueve el montaje del complejo terminal que se revela mediante la deposición de C9 (Fig. 5). El rol de la fase efectora de activación de complemento en el desarrollo de trombos inducido por MBB2 se evaluó en ratas deficientes de C6 cebadas con LPS. El anticuerpo tuvo un efecto procoagulante insignificante en estas ratas y el análisis de los vasos mesentéricos revelaron depósitos de IgG y C3 en la ausencia de C9 (Fig. 6A, E). La contribución de complemento a pérdida del feto inducida por MBB2 se analizó en ratas preñadas que recibieron anticuerpo de neutralización de C5 antes de la administración del scFv-Fc anti-β2GPI. Este tratamiento dio como resultado inhibición de deposición de C9 en sitios de implante que se asocian con una reducción significativa de pérdida del feto y aumento de peso fetal (Fig. 6 C-D).

Falla para inducir efecto *in vivo* de anticuerpo a β2GPI que no se fija a complemento.

Debido a que el dominio CH2 de IgG1 contiene el sitio de unión para C1q, generamos una versión modificada de MBB2 scFv-Fc que carece de este dominio (MBB2ΔCH2) con el objetivo de confirmar además el rol de complemento en la mediación del efecto patogénico del anticuerpo matriz. Los resultados de ELISA en la Fig. 7A muestran que MBB2ΔCH2 interactúa con β2GPI de la misma manera que MBB2 pero, una vez unido, resulta incapaz de activar complemento (Fig. 7B). La molécula modificada que se inyectó en ratas normales que se pretrataron con LPS tuvo actividad procoagulante insignificante con un patrón de efecto protrombótico que se asemeja al observado en ratas deficientes de C6, haciendo énfasis en la contribución importante de activación de complemento con respecto a los eventos trombótic os (Fig. 7C). Asimismo, MBB2ΔCH2 no afectó el resultado de embarazo en cuanto a peso fetal y pérdida del feto, que resultaron, en cambio, severamente comprometidos por MBB2 (Fig. 7E).

MBB2ΔCH2 impide el efecto *in vivo* inducido por Igs de pacientes.

El descubrimiento que el anticuerpo con CH2 eliminado falla en la activación de complemento a pesar de la fuerte interacción con β2GPI inmovilizada nos condujo a considerar la posibilidad de que MBB2ΔCH2 puede competir con

los anticuerpos a β2GPI de pacientes con APS, impidiendo, de este modo, su efecto patogénico. Con este fin, la actividad procoagulante de IgG de pacientes en ratas cebadas con LPS se comparó con aquella de una mezcla de MBB2ΔCH2 e IgG anti-β2GPI. Según se muestra en las Fig. 8A-B, el anticuerpo con CH2 eliminado resultó capaz de reducir la formación de trombos y oclusión de vasos a niveles que se obtuvieron previamente con IgG de control [9]. La diferencia en formación de trombos y oclusión de vasos entre ratas que reciben IgG aPL$^+$ solamente y el animal que recibe tanto IgG aPL$^+$ como MBB2ΔCH2 alcanzó significado estadístico después de 45 min a partir de infusión. Se descubrió que la misma molécula que se administra a ratas preñadas reduce significativamente la muerte fetal que se induce por IgG anti-β2GPI de pacientes con APS (Fig. 8C). No pudimos evaluar el efecto beneficioso del anticuerpo en peso fetal debido a que este parámetro clínico quedó sin efecto mediante la inyección de IgG de pacientes que se evaluaron en la presente investigación.

El uso de MBB2ΔCH2 como un agente terapéutico para impedir pérdida del feto mediada por APL debería considerar la observación clínica en cuanto a que el APL circula en sangre al momento del implante embriónico cuando β2GPI se detecta en la superficie de trofoblasto y células endoteliales deciduales [8]. Esto sugiere que el MBB2ΔCH2 debe desplazar anticuerpos ya unidos a β2GPI para ejercer su efecto beneficioso en pacientes con APS. Para lograr esta cuestión, se incubó en primer lugar β2GPI inmovilizada con IgG de pacientes durante 30 min y se expuso posteriormente a NDB2ΔCH2. El APL residual todavía unido a β2GPI se midió usando un anticuerpo secundario dirigido contra el dominio CH2 de IgG que reconoce los anticuerpos de pacientes mientras que falla al revelar el anticuerpo con CH2 eliminado. Los resultados que se presentan en la Fig. 8C muestran que el anticuerpo mutante resultó capaz de retirar aproximadamente el 40-50% de IgG de pacientes. La falla para desplazar la totalidad de anticuerpos de unión puede explicarse mediante el hecho de que los anticuerpos policlonales que circulan en pacientes con APS se dirigen probablemente contra otros epítopos de β2GPI.

Materiales y métodos

Purificación y caracterización de β2GPI humana y murina.

β2GPI se purificó a partir de suero humano agrupado que se obtuvo de donantes de sangre y suero de ratón mediante tratamiento con ácido perclórico que continuó con purificación por afinidad en columna de heparina (HiTrap Heparin HP, GE Healthcare, Milán, Italia) y mediante cromatografía de intercambio iónico (Resource-S, GE Healthcare). La inmunodifusión radial se usó para identificar β2GPI, que se analizó adicionalmente para pureza mediante SDS-PAGE y coloración con azul de Coomassie y se evaluó para actividad de cofactor aPL mediante ELISA [29].

El clon de ADNc de cadena completa de β2GPI humana [38] que se clonó en pBacPAK9 [39] se usó para la construcción de los dominios individuales I, II, IV y V de β2-GPI [40]. Un dominio 1 recombinante (D1) se produjo también usando un gen DI sintético que se obtuvo empleando un programa de ordenador denominado Juniper. El gen se clonó en el plásmido de expresión pET (26b) y se expresó en BL21(DE3) *Escherichia coli (E. coli)*[41].

Anticuerpos recombinantes.

La biblioteca Ab de exposición de fagos que se usó para selección se derivó a partir de linfocitos sanguíneos periféricos que se obtuvieron de donantes sanos y se describieron anteriormente [30]. La selección se realizó en placas de 96 pozos recubiertas con β2GPI (véase a continuación para detalles experimentales) durante incubación a la noche a 4 ºC según se informa anteriormente [30]. El procedimiento de panning se repitió dos veces. Después de la selección, se seleccionaron 96 clones al azar y los fagos a partir de colonias únicas se cultivaron en placas de 96 pozos. Un clon positivo (B2) se identificó mediante ELISA de fago y los genes V se secuenciaron y las familias VH y VL, así como también los segmentos de genes que se usaron, se evaluaron para identificación usando la herramienta IMGT/V-QUEST en the-IMGT®, the ImMunoGeneTics information system® http://imgt.cines.fr.

Clonado y purificación de anticuerpos recombinantes

El scFv B2 positivo se convirtió en un formato scFv-Fc humano (MBB2) mediante subclonaje de este en el vector [31] pMB-SV5 que contiene el dominio bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana. Un procedimiento similar se siguió para generar un scFv-Fc de ratón que contiene TSA12/22 (Adienne, Pharma & Biotech) [32] anticuerpo anti-C5 (MBC5) y anti-CD20 de humano se usaron como un MB de control. Una versión de CH2 eliminado del scFv-Fc (ΔCH2) se creó de acuerdo con [33]. Con este fin, la región CH3-SV5 de IgG1 humana se amplificó con cebadores de sentido Hu_CH3

5'ACGTGCTAGCCACACATGCCCACCGTGCGGTGGAGGCGGTTCA

GGCGGAGGTGGCTCTGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG3'

y anti Hu_CH3 TGCTAAGCTTTTAAGTACTATCCAGGCCCAGCAGTGGGTTTGG. Fragmento de PCR se cortó con NheI y HindIII y se clonó en B2 que contiene vector PMB-SV5 que se corta con las mismas enzimas creando un vector pMB ΔCH2.

Todos los anticuerpos recombinantes (MBB2, MBB2ΔCH2, MBC5 y MB de control) se subclonaron finalmente en vector pUCOE [34] para expresión. Líneas celulares CHO-s estables transfectadas se obtuvieron mediante selección con Hygromic B (500 µg/ml, Invitrogen). La producción a gran escala de ambos fusión de scFv-Fc se llevaron a cabo mediante cultivo de clones celulares seleccionados de manera estable en medio de CHO-SFM-II libre de suero, que se complementa con L-glutamina, antibióticos e Higromicina B en el CELLine System biorreactor desechable (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. El scFv-Fc se purificó a partir de al menos 40 ml de sobrenadante de cultivo celular mediante el uso de una columna HiTrap Proteína G (GE Healthcare), cromatografía por afinidad de columna en el sistema cromatográfico de baja presión AKTAprime (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra). Después de elución, las preparaciones de scFv-Fc purificado se dializaron en regulador de fosfato BupHTM (Thermo Scientific, Rockford, IL), se alicuotaron y se almacenaron a -80 ºC.

Suero

El suero se obtuvo de pacientes con un historial de trombosis arterial y venosa o ambas y contenía alta titulación de anticuerpos anti-β2GPI de medio. Un grupo de suero fresco de 10 donantes de sangre se usó como una fuente de complemento. Las muestras de suero se recolectaron además de diversas especies animales incluyendo ratón, rata, cabra, cerdos, y bovino fetal. Las IgG se purificaron a partir de suero de paciente en una columna HiTrap Proteína G (Pharmacia, Milán, Italia).

Ensayos de unión de anticuerpos

La interacción de anticuerpos con β2GPI se midió mediante ELISA usando placas de poliestireno irradiado con γ (Maxi-Sorp Nunc-Immunoplates; VWR International) recubierta con β2GPI purificada de humano o ratón (10 µg/ml) en regulador de bicarbonato durante la noche. Después de bloqueo con BSA al 1% (Sigma-Aldrich), se agregaron diluciones de anticuerpos en serie a las placas y se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente (RT). Los anticuerpos de unión se revelaron mediante IgG anti-humana conjugada con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma-Aldrich) diluida en 1:4.000 y la reacción se desarrolló usando p-nitrofenilfosfato (PNPP) como sustrato (Sigma-Aldrich) y se leyó a 405 nm.

Un enfoque similar se siguió para investigar la especificidad de dominio del scFv-Fc anti-β2GPI usando dominios recombinantes provistos amablemente por el Dr. P.G. De Groot (Ámsterdam, NL).

Anticuerpos anti-cardiolipina se detectaron según se describe por Tincani et al [35] con las únicas modificaciones referidas a que la cardiolipina de unión de fase sólida se expuso a suero al 10% de diversos animales continuando con incubación con MBB2 o MB de control (1µg/ml). Los anticuerpos de unión se detectaron según se indica anteriormente.

Los anticuerpos anti-protrombina se revelaron usando el QUANTA Lite® aPS/PT IgG y IgM semicuantitativo (INOVA Diagnostics) que detecta anticuerpos contra complejo fosfatidilserina/protrombina.

Desplazamiento de unión de anticuerpos de pacientes a β2GPI mediante MBB2ΔCH2

β2GPI humana (10 µg/mL) inmovilizada en placas de poliestireno irradiado con γ se expuso en primer lugar a suero de pacientes (1:200) durante 30 min a RT continuando con incubación con MBB2ΔCH2 (2 µg/100 µl) durante 30 min a RT. La cantidad de unión de anticuerpo de paciente residual a β2GPI se midió mediante ELISA usando una IgG monoclonal murina (Clon MK1A6 AbD Serotec Raleigh USA; 1:1,000) que reconoce el dominio CH2 que se presenta en el anticuerpo del paciente pero que se ausenta en MBB2ΔCH2 y se detectó por incubación con IgG de cabra anti-ratón conjugada con AP 1:10.000 (Sigma-Aldrich) durante 60 min a RT.

Unión de MBB2 a β2GPI de superficie celular

HUVECs y el BeWo de línea celular de trofoblasto recubiertos con β2GPI se usaron como dianas celulares para evaluar la reactividad del anticuerpo con la molécula de unión a célula. HUVECs se aislaron y se cultivaron según se publica anteriormente [36]. Las células de BeWo (European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, UK) se cultivaron a 37 ºC y aire al 95%/CO_2 al 5% en medio de RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) que se complementó con FCS al 10% (Gibco, Invitrogen).

La unión de MBB2 se evaluó en crecimiento celular para converger en placas de cultivo tisular de 96 pozos (Costar, Milán, Italia) y se expuso a β2GPI humana purificada (5 µg/ml) o FCS al 20% durante 90 min a 37 ºC y aire al 95%/CO_2 al 5%. Las células se incubaron luego con 100 µl de concentraciones en aumento de anticuerpo durante 1 h a RT continuando con IgG de cabra anti-humana conjugada con AP (1:4.000) o Peroxidasa de rábano (HRP) (1:4.000) (Sigma-Aldrich) para HUVEC y BeWo respectivamente. La reacción enzimática se desarrolló usando PNPP o 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) ambos de Sigma-Aldrich como sustrato y se leyó a 405 nm o 450 nm con un lector de ELISA Titertek Multiskan (Flow Labs, Milán, Italia).

Evaluación de activación de complemento

La capacidad de scFv-Fc de unión para activar la vía clásica de activación de complemento se evaluó con placas recubiertas de poliestireno irradiado con γ con β2GPI humana (10 µg/mL) continuando con incubación con MBB2 (10 µg/mL) durante 90 min a RT. El anticuerpo de unión a β2GPI se expuso luego a 100 µl de suero fresco AB+ en 1:100 durante 30 min a 37 ºC. La deposición de C1q y C4 se detectó usando C1q o C4 de cabra anti-humano en 1:8.000 que se adquirió de Quidel (M-Medical, Milán, Italia). La unión de C9 se reveló usando el anticuerpo monoclonal murino aE11 a neoantígeno de C9 (1:1.000) provisto amablemente por Prof. T.E. Mollnes (Oslo, Noruega). La IgG anti-cabra conjugada con AP (1:4.000) o IgG anti-ratón (1:10.000) ambas de Sigma-Aldrich se emplearon como anticuerpos secundarios. La reacción enzimática se desarrolló usando PNPP como sustrato y se leyó a 405 nm.

Animales

Ratas masculinas (270-300 g) se usaron para los experimentos in vivo. Ratas Wistar se obtuvieron a partir de colonia local conservada en la University Animal House. Ratas $C6^{+}/^{+}$ PVG se adquirieron a partir de Harlan Italy (San Pietro al Natisone, Italia), y ratas $C6^{-}/^{-}$ PVG fueron a partir de una colonia de ratas anteriormente informada [37] que se estableció en nuestra Animal House. Ratones BALB/c se adquirieron de Harlan Italy (San Pietro al Natisone, Italia).

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en cumplimiento de las normativas de leyes europeas (86/609/EEC) y las italianas (D.L.116/92) y se aprobaron por la Italian Ministry of University and Research así como también por la Administration of the University Animal House.

Modelos de rata de trombosis

La formación de trombos inducida por anticuerpos se evaluó en ratas según se describe anteriormente en detalles [9]. Brevemente, los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de LPS de Escherichia coli O55:B5 (2,5 mg/kg de peso corporal; Sigma-Aldrich) o solución salina estéril, como un control, y 3 h después se anestesiaron con tiobarbital sódico (Inactina; 80 mg/kg). La Rodamina 6G de coloración vital fluorescente (Sigma-Aldrich), que tiñe leucocitos y plaquetas, se infundió lentamente en la vena femoral a una concentración de 0,025 mg/kg/min y a una velocidad de 0,25 ml/h 30 min antes de infusión de 30 min de scFv-Fc (1 mg/ml de solución salina) o IgG purificada de pacientes con APS (10 mg/ml de solución salina) en la arteria carótida. La capacidad de MBB2ΔCH2 para impedir la formación de trombos inducida por APL se investigó inyectando el scFv-Fc con CH2 eliminado (2 mg/ml de solución salina/30 min) continuando con infusión de 30 min de IgG de paciente (10 mg/ml de solución salina).

Al menos 3 áreas microvasculares que contienen arteriolas, capilares, y vénulas postcapilares se analizaron en cuanto a la formación de agregados fluorescentes de leucocitos y plaquetas que ocluyen parcialmente o completamente los vasos. Los resultados se expresan como una proporción entre el número de trombos y el número total de microvasos examinados y también como un porcentaje de microvasos ocluidos.

Análisis de resultado de embarazo.

Las ratas hembras BALB/c (6-8 sem de vida) se alojaron con machos sementales adultos en una proporción de 3:1 y se permitió el apareamiento de manera natural. El día 0 de embarazo se define como el día en el que se encontró un tapón vaginal. El efecto proabortivo de anticuerpos se evaluó en ratones que recibieron infusión en la vena de la cola de ya sea scFv-Fc (10 µg/100 µl de solución salina/ratón) o IgG de pacientes (50 µg/100 µl de solución salina/ratón) en el día 0 y se sacrificaron en el día 15. La eliminación de complemento se logró en ratones mediante inyección intraperitoneal de MBC5 de neutralización (100 µg/400 µl de solución salina/ratón) tres veces por semana. Los fetos reabsorbidos se identificaron por su tamaño pequeño y apariencia necrótica o hemorrágica en comparación con los embriones normales. Los resultados se presentan como porcentaje de pérdida del feto. El peso de útero y fetos individuales con placenta respectiva se registraron también. En experimentos dirigidos a evaluar el control de pérdida del feto inducida por APL mediante MBB2ΔCH2, las ratas hembras recibieron IgG de pacientes i.v. (50 µg/100 µl de solución salina/ratón) en el día 0 de embarazo e inyecciones intraperitoneales de MBB2ΔCH2 (50 µg/200 µl de solución salina/ratón) en los días 0, 5 y 10. Los fetos reabsorbidos se identificaron y se contaron. Los resultados se presentan como porcentaje de pérdida del feto y peso de útero y fetos individuales.

Análisis de inmunofluorescencia

El tejido mesentérico se cosechó a partir de ratas asesinadas el final del experimento in vivo después de infusión intracarótida de solución salina estéril para retirar sangre según se describe anteriormente [9]. El tejido disecado se cortó en pequeñas piezas y se estiró en portaobjetos de vidrio tratados con polilisina (BDH Laboratory Supplies, Poole, Reino Unido).

Se usaron secciones (7 µm) de muestras congeladas instantáneamente de placenta de ratón incluidas en medio de OCT (Diagnostic Division, Miles, Inc.). La deposición de tejido de C3 y C9 de ratón se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta usando C3 de cabra anti-ratón en 1:400 (MP Cappel, Solon, USA), y C9 de conejo anti-ratón en 1:200 (un amable regalo de Prof. M.D Daha, Leiden, NL) continuando con anticuerpos secundarios

conjugados con FITC (Dako, Milán, Italia). Los portaobjetos se examinaron en microscopio DM2000 Leica fluorescente (Leica, Milán, Italia).

Análisis estadístico

Análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism 5.0 para Windows. Los datos de reabsorción fetal y oclusión de vasos y los resultados de ELISA se analizaron con el ensayo de Mann-Whitney. Los pesos fetales se analizaron usando el ensayo t-Student, Los datos se expresaron como desviación estándar ± media y un valor P menor que 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Descripción de las Figuras

Figura 1. Análisis de unión de MBB2 a β2GPI purificada. (A) β2GPI de humano o ratón (10 µg/mL) inmovilizada en placas de poliestireno irradiado con γ se incubaron con diferentes concentraciones de MBB2 o MB de control y el scFv-Fc de unión se reveló mediante ELISA. (B) Unión de MBB2 a dominios de β2GPI humana (10 µg/mL) se analizó como se informa en A. Los gráficos en C y D muestran unión de MBB2 o MB de control a HUVEC o BeWo que se cultivan para converger en placas de cultivo tisular de 96 pozos. Las células se incubaron con β2GPI (5 µg/ml) o FCS al 20% antes de exposición al scFv-Fc. Los anticuerpos de unión se revelaron mediante ELISA. Los resultados se expresan como SD ± media de experimentos que corren por triplicado.

Figura 2. Análisis del efecto inhibitorio de β2GPI soluble en la unión de MBB2 a molécula de unión de fase sólida. MBB2 (100 ng/100 µl) se incubó con porcentaje en aumento de suero durante 2 h a 37 ºC y la cantidad residual de anticuerpo que resultaba todavía capaz de unirse a β2GPI inmovilizada se evaluó mediante ELISA.

Figura 3. Análisis de los efectos procoagulantes y proabortivos de MBB2. (A) Formación de trombos y (B) oclusión de vasos se monitorearon mediante microscopía intravital en diferentes intervalos de tiempo en ratas tratadas o sin tratar con LPS y perfundidas con MBB2 o MB de control. (C) Porcentaje de pérdida del feto y (D) peso fetal en ratones que se trataron con MBB2 o MB de control. (E) Secciones de tejido mesentérico de rata que muestra oclusión de vasos con trombos en ratas que se tratan con LPS que reciben MBB2 y pequeños agregados de células en animales que se tratan con MBB2 en la ausencia de LPS. Ambos trombos y agregados celulares resultaron no detectables en animal que se trató con MB de control. (F) Ejemplos representativos de úteros de una rata preñada que se trató con MBB2 que muestra fetos reabsorbidos que se indican con flechas y de rata que se trata con MB no relacionada que contiene crías vivas. El efecto procoagulante de los anticuerpos se evaluó en tres ratas para cada protocolo de tratamiento y su actividad proabortiva de MBB2 y control de MB se evaluó en al menos 5 ratas preñadas para cada anticuerpo. Los resultados se expresan como SD ± media $^{*}P < .05$, $^{**}P < .01$ versus MB de control.

Figura 4. Reconocimiento de β2GPI de diferentes especies mediante MBB2. Cardiolipina de unión de fase sólida se incubó con suero animal al 10% y se expuso luego a ya sea MBB2 o control de MB. El anticuerpo de unión se reveló mediante ELISA.

Figura 5. Activación de complemento mediante MBB2. β2GPI humana (10 µg/mL) inmovilizada en placas de poliestireno irradiado con γ se incubó en primer lugar con MBB2 (1 µg/ml) o con IgG aPL^{+} de un paciente con APS durante 90 min a RT y después se lavó con suero humano fresco en 1:100 durante 30 min a 37 ºC. Los neoantígenos de unión C1q, C4, y C9 se revelaron mediante ELISA usando anticuerpos de cabra a C1q y C4 y el anticuerpo monoclonal aE11 a neoantígeno de C9. Los resultados de experimentos corren por triplicado y se expresan como SD ± media.

Figura 6. Análisis del efecto procoagulante y proabortivo inducido mediante MBB2 en animales deficientes de complementos o con complementos eliminados. La formación de trombos (A) y oclusión de vasos (B) se monitorearon mediante microscopía intravital en diferentes intervalos de tiempo en ratas C6+/+ y C6-/- PVG cebadas con LPS perfundidas con MBB2. El porcentaje de pérdida del feto (C) y peso fetal (D) en ratones normales y con C5 eliminado que se trataron con MBB2. Análisis inmunofluorescente de tejido mesentérico de rata (E) y sitios de implante fetal (F) en animales normales y deficientes de complemento que se trataron con MBB2 para deposición de scFv-Fc, C3 y C9. Los efectos procoagulantes y los proabortivos de MBB2 se evaluaron y se expresaron según se informa en la leyenda de la Figura 3.

Figura 7. Análisis y efecto in vivo de MBB2ΔCH2. β2GPI de humano o ratón (10 µg/mL) inmovilizada en placas de poliestireno irradiado con γ se incubaron con diferentes concentraciones de MBB2 o MB no relacionado y el minicuerpo de unión se reveló mediante ELISA. (A) Deposición de C1q y C4 para unirse a MBB2ΔCH2 y MBB2 se evaluó según se indica en la leyenda de la Figura 5 (B). La formación de trombos (C) y oclusión de vasos (D) se monitorearon mediante microscopía intravital en diferentes intervalos de tiempo en ratas normales cebadas con LPS perfundidas con ya sea MBB2ΔCH2 o MBB2. (E) Porcentaje de pérdida del feto y peso fetal (F) en ratas preñadas con ya sea MBB2ΔCH2 o MBB2. Los efectos procoagulantes y los proabortivos de MBB2 se evaluaron y se expresaron en la leyenda de la Figura 3.

Figura 8. Control del efecto patogénico de APL mediante MBB2ΔCH2.

La formación de trombos (A) y oclusión de vasos (B) que se observan en ratas que reciben IgG (10 mg/ml) purificada de 3 pacientes con APS y ya sea MBB2ΔCH2 (2 mg/ml) o MB de control. El porcentaje de pérdida del feto en ratas preñadas que reciben IgG de pacientes y MBB2ΔCH2 (C). Desplazamiento de unión de IgG de pacientes a β2GPI mediante MBB2ΔCH2 se evaluó según se describe en Materiales y Métodos (D). Los efectos procoagulantes y los proabortivos de MBB2 se evaluaron y se expresaron según se informa en la leyenda de la Figura 3.

Referencias

1. Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W. & Khamashta, M.A. Antiphospholipid syndrome. Lancet 376, 1498-1509.

2. Erkan, D., Espinosa, G. & Cervera, R. Catastrophic antiphospholipid syndrome: updated diagnostic algorithms. Autoimmun Rev 10, 74-79 (2010).

3. Meroni, P.L., et al. Obstetric and vascular APS: same autoantibodies but different diseases? Lupus 21, 708-710.

4. McNeil, H.P., Simpson, R.J., Chesterman, C.N. & Krilis, S.A. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl Acad Sci U S A 87, 4120-4124 (1990).

5. Galli, M., et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet 335, 1544-1547 (1990).

6. Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K. & Koike, T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet 336, 177-178 (1990).

7. Ioannou, Y. The Michael Mason Prize: Pathogenic antiphospholipid antibodies, stressed out antigens and the deployment of decoys. Rheumatology (Oxford) 51, 32-36 (2012).

8. Agostinis, C., et al. In vivo distribution of beta2 glycoprotein I under various pathophysiologic conditions. Blood 118, 4231-4238 (2011).

9. Fischetti, F., et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. Blood 106, 2340-2346 (2005).

10. Meroni, P.L., Borghi, M.O., Raschi, E. & Tedesco, F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. Nat Rev Rheumatol 7, 330-339.

11. Holers, V.M., et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. J Exp Med 195, 211-220 (2002).

12. Girardi, G., et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. J Clin Invest 112, 1644-1654 (2003).

13. de Jesus, G.R., et al. Management of obstetric antiphospholipid syndrome. Curr Rheumatol Rep 14, 79-86.

14. Ernest, J.M., Marshburn, P.B. & Kutteh, W.H. Obstetric antiphospholipid syndrome: an update on pathophysiology and management. Semin Reprod Med 29, 522-539.

15. Empson, M., Lassere, M., Craig, J. & Scott, J. Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. Cochrane Database Syst Rev, CD002859 (2005).

16. Ioannou, Y., et al. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. Arthritis Rheum 56, 280-290 (2007).

17. Ellinger, I., Schwab, M., Stefanescu, A., Hunziker, W. & Fuchs, R. IgG transport across trophoblast-derived BeWo cells: a model system to study IgG transport in the placenta. Eur J Immunol 29, 733-744 (1999).

18. Agar, C., et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. Blood 116, 1336-1343.

19. Steinkasserer, A., et al. Activity, disulphide mapping and structural modelling of the fifth domain of human beta 2-glycoprotein I. FEBS Lett 313, 193-197 (1992).

20. de Groot, P.G. & Derksen, R.H. Pathophysiology of antiphospholipid antibodies. Neth J Med 62, 267-272 (2004).

21. de Laat, H.B., Derksen, R.H., Urbanus, R.T., Roest, M. & de Groot, P.G. beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. Blood 104, 3598-3602 (2004).

22. Ritis, K., et al. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. J Immunol 177, 4794-4802 (2006).

23. Redecha, P., et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. Blood 110, 2423-2431 (2007).

24. Carrera-Marin, A., et al. C6 knock-out mice are protected from thrombophilia mediated by antiphospholipid antibodies. Lupus 21, 1497-1505.

25. Pierangeli, S.S., Vega-Ostertag, M. & Harris, E.N. Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. Thromb Res 114, 467-476 (2004).

26. Ostertag, M.V., Liu, X., Henderson, V. & Pierangeli, S.S. A peptide that mimics the Vth region of beta-2-glycoprotein I reverses antiphospholipid-mediated thrombosis in mice. Lupus 15, 358-365 (2006).

27. de la Torre, Y.M., et al. Anti-phospholipid induced murine fetal loss: novel protective effect of a peptide targeting the beta2 glycoprotein I phospholipid-binding site. Implications for human fetal loss. J Autoimmun 38, J209-215.

28. Robertson, J.A. Protecting embryos and burdening women: assisted reproduction in Italy. Hum Reprod 19, 1693-1696 (2004).

29. Cavazzana, A., et al. Anti-beta(2)-glycoprotein I ELISA assay: the influence of different antigen preparations. Thromb Haemost 101, 789-791 (2009).

30. Sblattero, D. & Bradbury, A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries.Nat Biotechnol 18, 75-80 (2000).

31. Di Niro, R., et al. Construction of miniantibodies for the in vivo study of human autoimmune diseases in animal models. BMC Biotechnol 7, 46 (2007).

32. Marzari, R., et al. The cleavage site of C5 from man and animals as a common target for neutralizing human monoclonal antibodies: in vitro and in vivo studies. Eur J Immunol 32, 2773-2782 (2002).

33. Roovers, R.C., van der Linden, E., de Bruine, A.P., Arends, J.W. & Hoogenboom, H.R. In vitro characterization of a monovalent and bivalent form of a fully human anti Ep-CAM phage antibody. Cancer Immunol Immunother 50, 51-59 (2001).

34. Boscolo, S., et al. Simple scale-up of recombinant antibody production using an UCOE containing vector. N Biotechnol 29, 477-484 (2012).

35. Tincani, A. & Meroni, P.L. Anticardiolipin antibodies: to be or not to be detectable. Clin Exp Rheumatol 19, 240-241 (2001).

36. Tedesco, F., et al. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. J Exp Med 185, 1619-1627 (1997).

37. Leenaerts, P.L., et al. Hereditary C6 deficiency in a strain of PVG/c rats. Clin Exp Immunol 97, 478-482 (1994).

38. Steinkasserer, A., Estaller, C., Weiss, E. H., Sim R. B. & Day, A. J. Complete nucleotide and deduced aminoacid sequence of human beta 2-glycoprotein I. Biochem. J. 277, 387-391, 1991

39. Iverson G. M., Victoria E.J, and Marquis D M. Anti-b2 glycoprotein I (b2GPI) autoantibodies for the construction of the individual domains I, II, IV and V of b2-GPI recognize an epitope on the first domain of b2GPI Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15542-15546, 1998

40. Van Os G. M. A,,. Meijers J . C. M, Agar C, Seron M. V., . Marquart J . A, Akesson P, Urbanus R. T., Derksen R. H. W. M, Herwald H., Morgelin M and. de Groot P. G- Induction of anti-b2-glycoprotein I autoantibodies in mice by protein H of Streptococcus pyogenes Journal of Thrombosis and Haemostasis, 9: 2447-2456, 2011

41. Ioannou Y., Giles I., Lambrianides A., Richardson C., Pearl L.H., Latchman D.S, Isenberg D.A. and Rahman A. BMC Biotechnology, 6, 8, 2006.

Listado de secuencias

<110> OncoNOx

<120> ANTICUERPOS A BETA2-GLUCOPROTEÍNA I Y USOS TERAPÉUTICOS DE ESTOS

<130> 1574PCT

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Asn His
            20                  25                  30

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Asp Ile Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp His Tyr Gly Pro Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
            100                 105                 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Pro Val Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Val Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly
85 90 95

Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 3

<211> 1485

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

cagcctgtgc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcagggtc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcggg aaacacagct tccttgacca tcagtgggct ccagtccgag 240

gatgaggctg actatttctg tgcagcgtgg gacgacagcc tgagtggtcc ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt cctatccgga gggtcgacca taacttcgta taatgtatac 360

tatacgaagt tatcctcgag cggtacccag gtgcagctgc aggagtcggg gggaggcttg 420

gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc tgtgcagcct ctggactcac cttcagtaat 480

catggcatgt actgggtccg ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcagatata 540

tggtctgatg gaagtaataa atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc 600

agagacaatt ccaagaacac ggtgtatctt caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg 660

gccgtatatt actgtgcgag agatcactat ggtccgggtt actggtactt cgatctctgg 720

ggccgtggaa ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaca aaactcacac atgcccaccg 780

tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 840

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac 900

gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 960

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1020

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1080

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1140

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1200

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1260

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctatagc 1320

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1380

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtcccc gggtaaaact 1440

agtggcaaac caatcccaaa cccactgctg ggcctggata gtact 1485

<210> 4

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggact caccttcagt aatcatggca tgtactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagat atatggtctg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacggtgtat 240

cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagatcac 300

tatggtccgg gttactggta cttcgatctc tggggccgtg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 5

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

cagcctgtgc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcagggtc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcggg aaacacagct tccttgacca tcagtgggct ccagtccgag 240

gatgaggctg actatttctg tgcagcgtgg gacgacagcc tgagtggtcc ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 6

<211> 495

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Pro Val Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Val Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly
85 90 95

Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Ser
100 105 110

Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly
115 120 125

Thr Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
130 135 140

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Asn
145 150 155 160

His Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Val Ala Asp Ile Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
180 185 190

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Arg Asp His Tyr Gly Pro Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp
225 230 235 240

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Asp Lys Thr His
245 250 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
260 265 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
275 280 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
290 295 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305 310 315 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
325 330 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
340 345 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
355 360 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
370 375 380

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr
465 470 475 480

Ser Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
485 490 495

<210> 7

<211> 1173

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

```
cagcctgtgc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcagggtc      60
acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga     120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga     180
ttctctggct ccagctcggg aaacacagct tccttgacca tcagtgggct ccagtccgag     240
gatgaggctg actatttctg tgcagcgtgg gacgacagcc tgagtggtcc ggtattcggc     300
ggagggacca agctgaccgt cctatccgga gggtcgacca taacttcgta taatgtatac     360
tatacgaagt tatcctcgag cggtacccag gtgcagctgc aggagtcggg gggaggcttg     420
gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc tgtgcagcct ctggactcac cttcagtaat     480
catggcatgt actgggtccg ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcagatata     540
tggtctgatg gaagtaataa atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc     600
agagacaatt ccaagaacac ggtgtatctt caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg     660
gccgtatatt actgtgcgag agatcactat ggtccgggtt actggtactt cgatctctgg     720
ggccgtggaa ccctggtcac cgtctcctca gctagccaca catgcccacc gtgcggtgga     780
ggcggttcag gcggaggtgg ctctgggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc     840
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc     900
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag     960
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg    1020
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg    1080
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtccccgg gtaaaactag tggcaaacca    1140
atcccaaacc cactgctggg cctggatagt act                                 1173
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo recombinante humano de unión a β2GPI, en el que:

i) el dominio CH2 se elimina según lo cual dicho anticuerpo resulta incapaz de activar complemento,

ii) las cadenas VH y VL de dicho anticuerpo tienen las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2, respectivamente.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que se une al dominio DI de β2GPI.

3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-2, que es una IgG.

4. Un fragmento del anticuerpo de las reivindicaciones 1-3, que se selecciona a partir de scFv y scFv-Fc, en el que el scFv-Fc carece de un dominio CH2.

5. El fragmento scFv de la reivindicación 4, que se codifica mediante la SEQ ID NO:7 de polinucleótido.

6. El fragmento scFv-Fc de la reivindicación 4, que se codifica mediante la SEQ ID NO:3 de polinucleótido.

7. El fragmento scFv-Fc de la reivindicación 6, que se codifica mediante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

8. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 4-7, que resulta capaz de desplazar unión de autoanticuerpos a β2GPI de pacientes afectados por síndrome antifosfolípido (APS) en ensayos de unión competitivos *in vitro*.

9. Una composición farmacéutica que comprende, como un ingrediente activo, un anticuerpo de las reivindicaciones 1-3 o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 4-7, y un transportador farmacéuticamente aceptable.

10. Un anticuerpo de las reivindicaciones 1-3 o un fragmento de anticuerpo de las reivindicaciones 4-7 o una composición farmacéutica de la reivindicación 9, para uso en el tratamiento o prevención de formación de trombos, oclusión de vasos o pérdida del feto en pacientes afectados por síndrome antifosfolípido (APS).

Figura 1

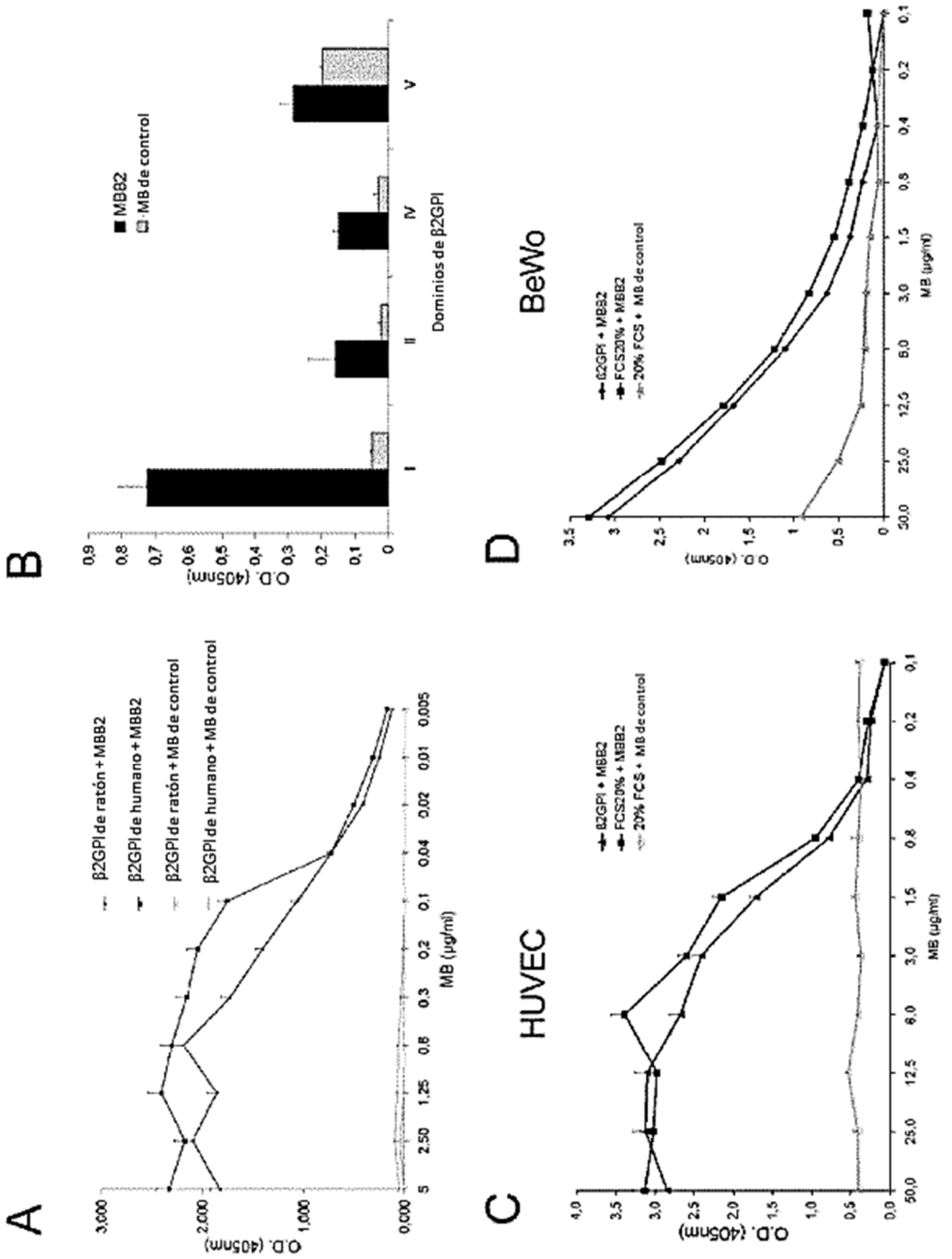

A
β2GPI de ratón + MBB2
β2GPI de humano + MBB2
β2GPI de ratón + MB de control
β2GPI de humano + MB de control
O.D. (405nm)
MB (µg/ml)
B
MBB2
MB de control
O.D. (405nm)
I
II
IV
V
Dominios de β2GPI
C
HUVEC
β2GPI + MBB2
FCS20% + MBB2
20% FCS + MB de control
O.D. (405nm)
MB (µg/ml)
D
BeWo
β2GPI + MBB2
FCS20% + MBB2
20% FCS + MB de control
O.D. (405nm)
MB (µg/ml)

Figura 2

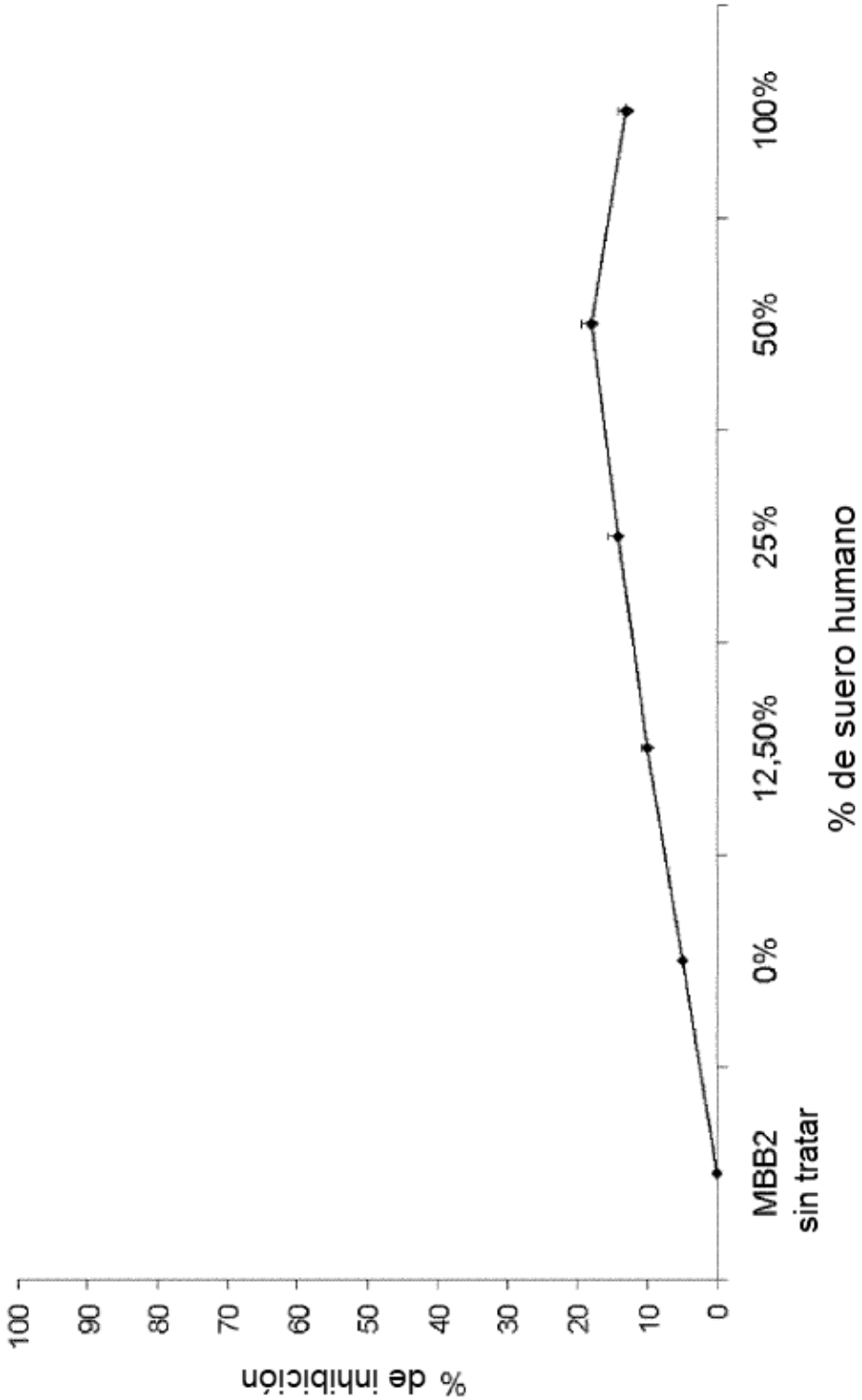

% de inhibición
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
MBB2
sin tratar
0%
12,50%
25%
50%
100%
% de suero humano

Figura 3

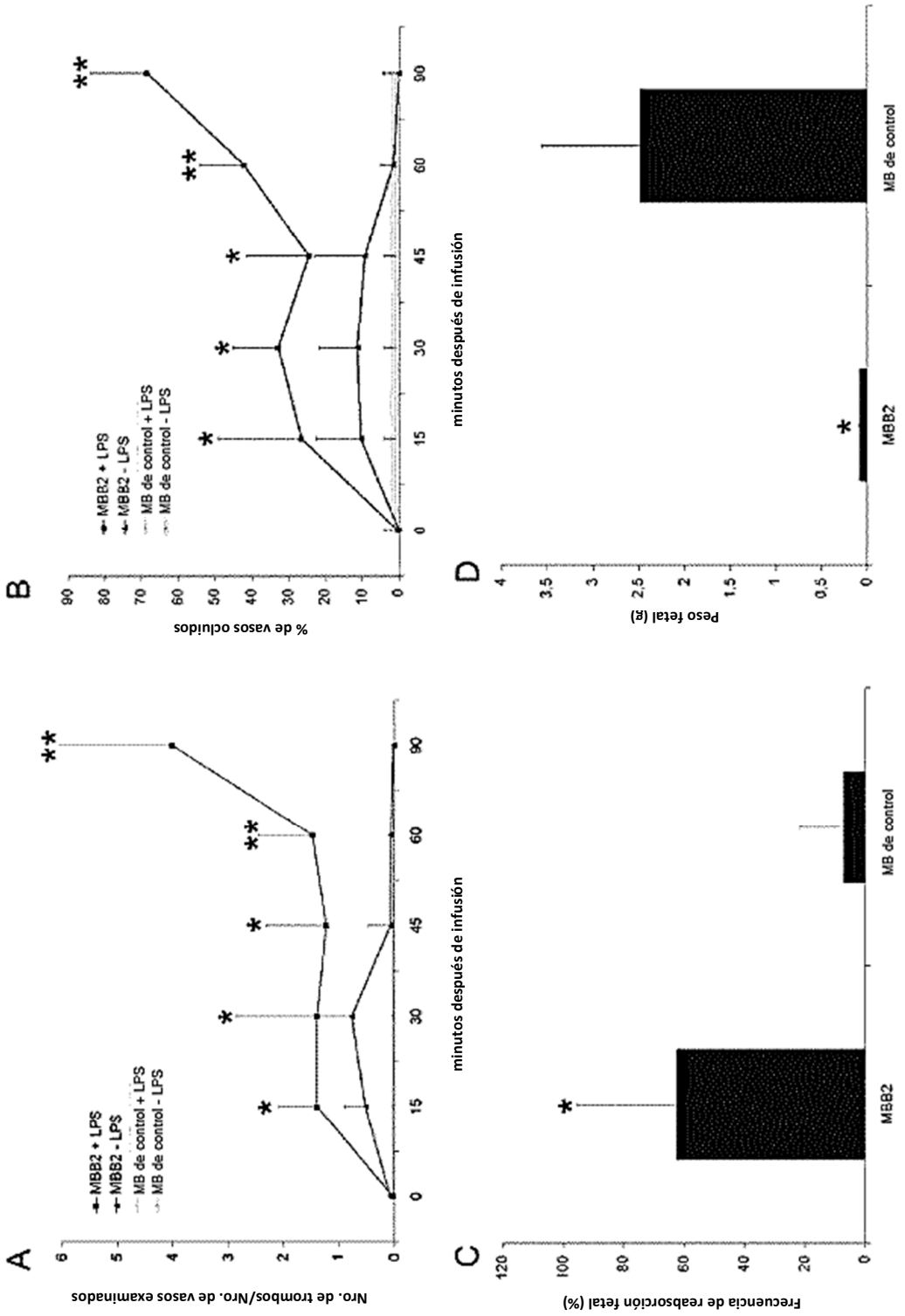

A
MBB2 + LPS
MBB2 - LPS
MB de control + LPS
MB de control - LPS
Nro. de trombos/Nro. de vasos examinados
minutos después de infusión
B
% de vasos ocluidos
minutos después de infusión
C
Frecuencia de reabsorción fetal (%)
MBB2
MB de control
D
Peso fetal (g)
MBB2
MB de control

Figura 3 (continuación)

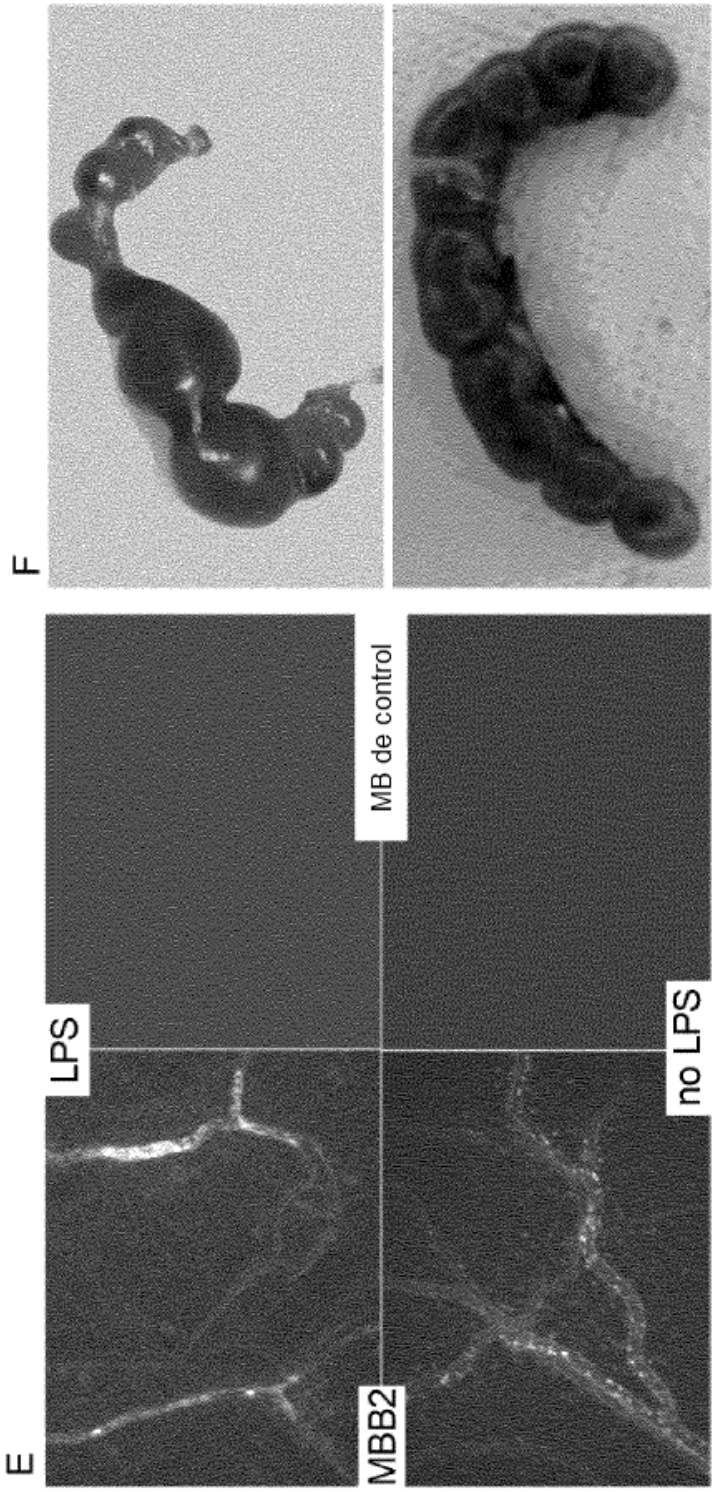


Figura 4

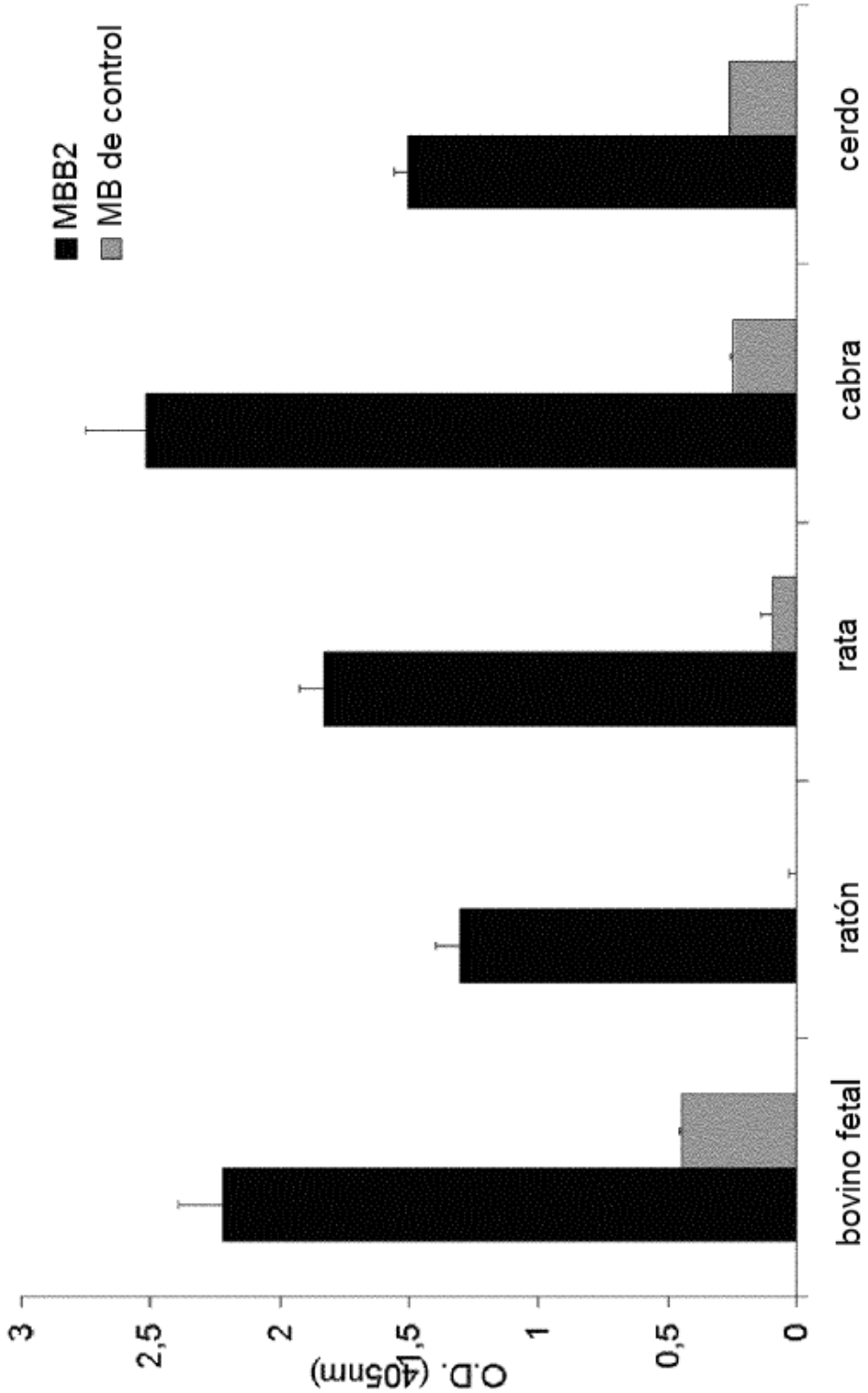

MBB2
MB de control
O.D. (405nm)
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
bovino fetal
ratón
rata
cabra
cerdo

Figura 5

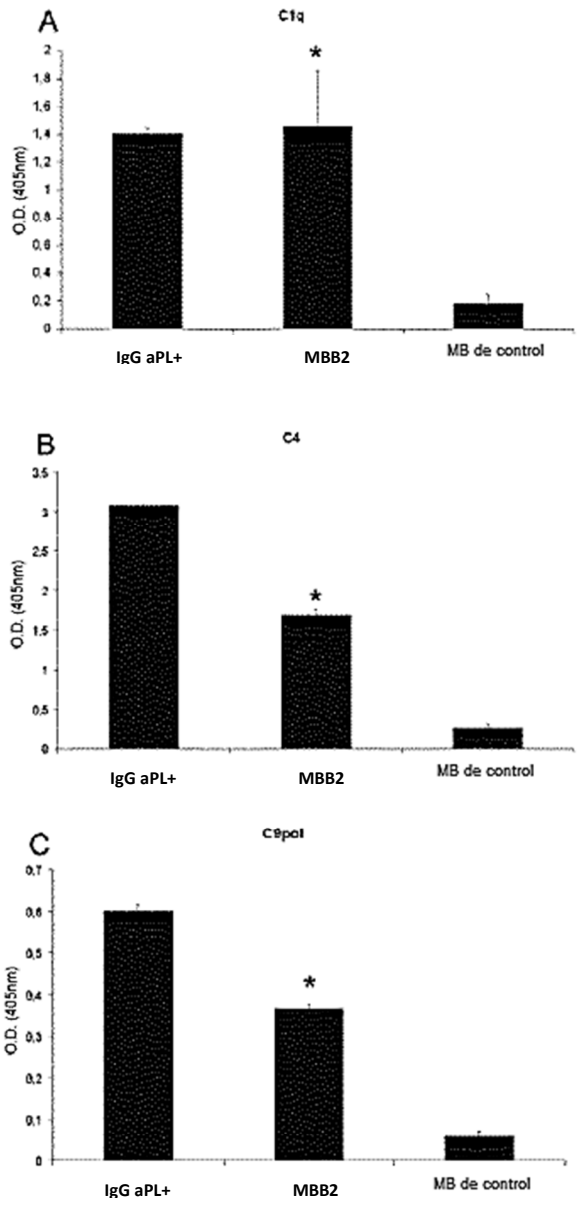

A
C1q
O.D. (405nm)
IgG aPL+
MBB2
MB de control
B
C4
O.D. (405nm)
IgG aPL+
MBB2
MB de control
C
C9pol
O.D. (405nm)
IgG aPL+
MBB2
MB de control

Figura 6

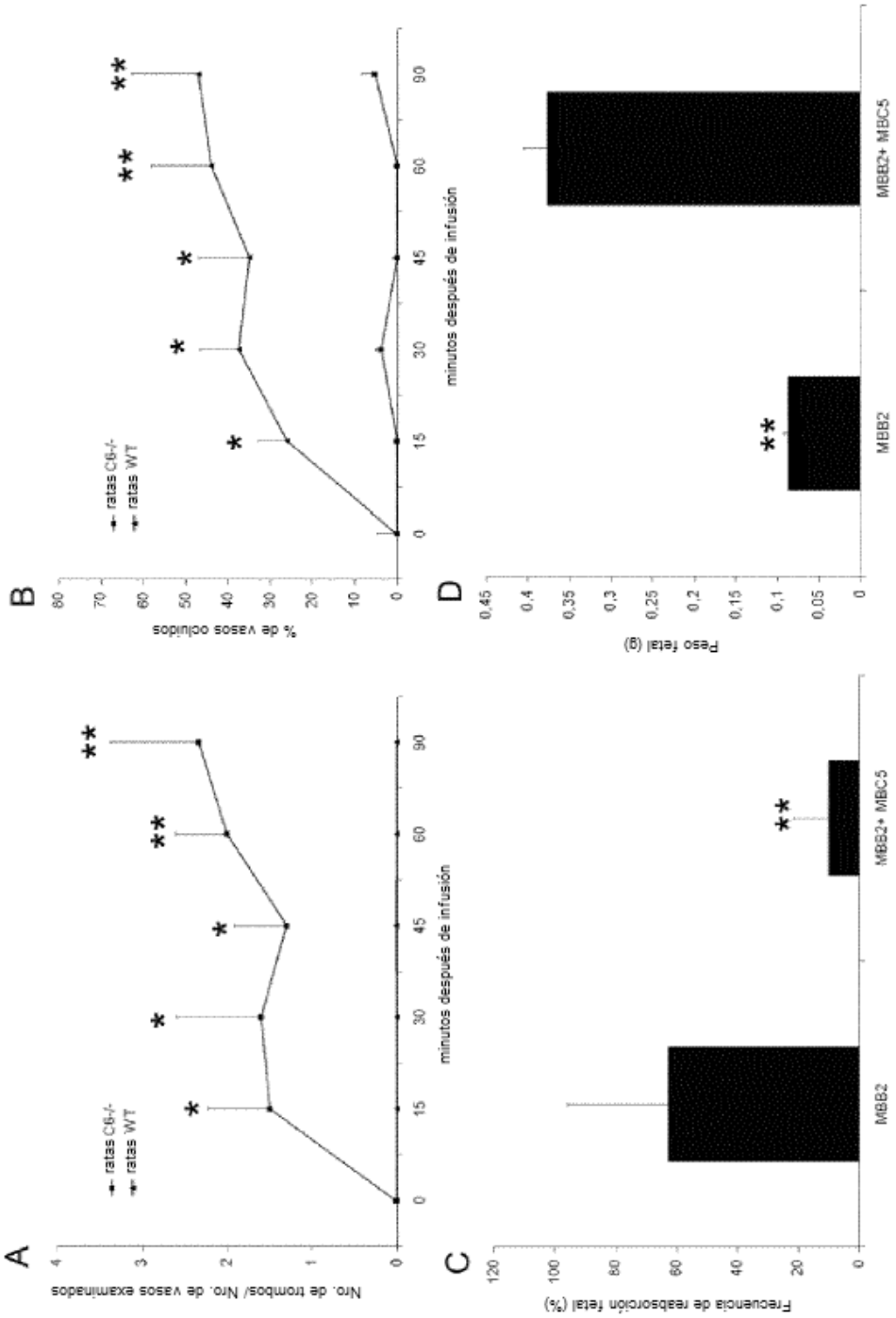
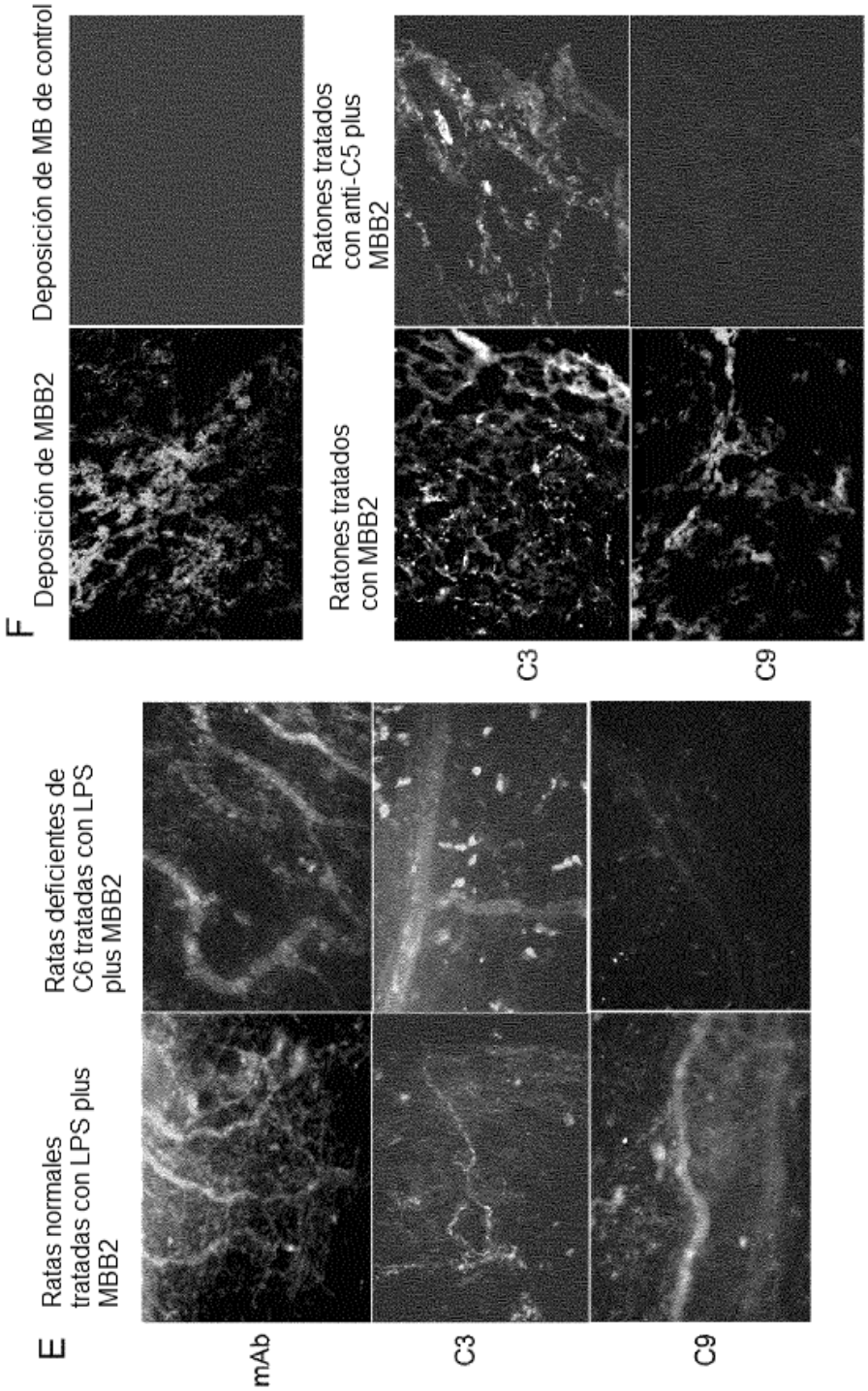

A
Nro. de trombos/ Nro. de vasos examinados
ratas C6-/-
ratas WT
minutos después de infusión
B
% de vasos ocluidos
ratas C6-/-
ratas WT
minutos después de infusión
C
Frecuencia de reabsorción fetal (%)
MBB2
MBB2+ MBC5
D
Peso fetal (g)
MBB2
MBB2+ MBC5

Figura 6 (continuación)



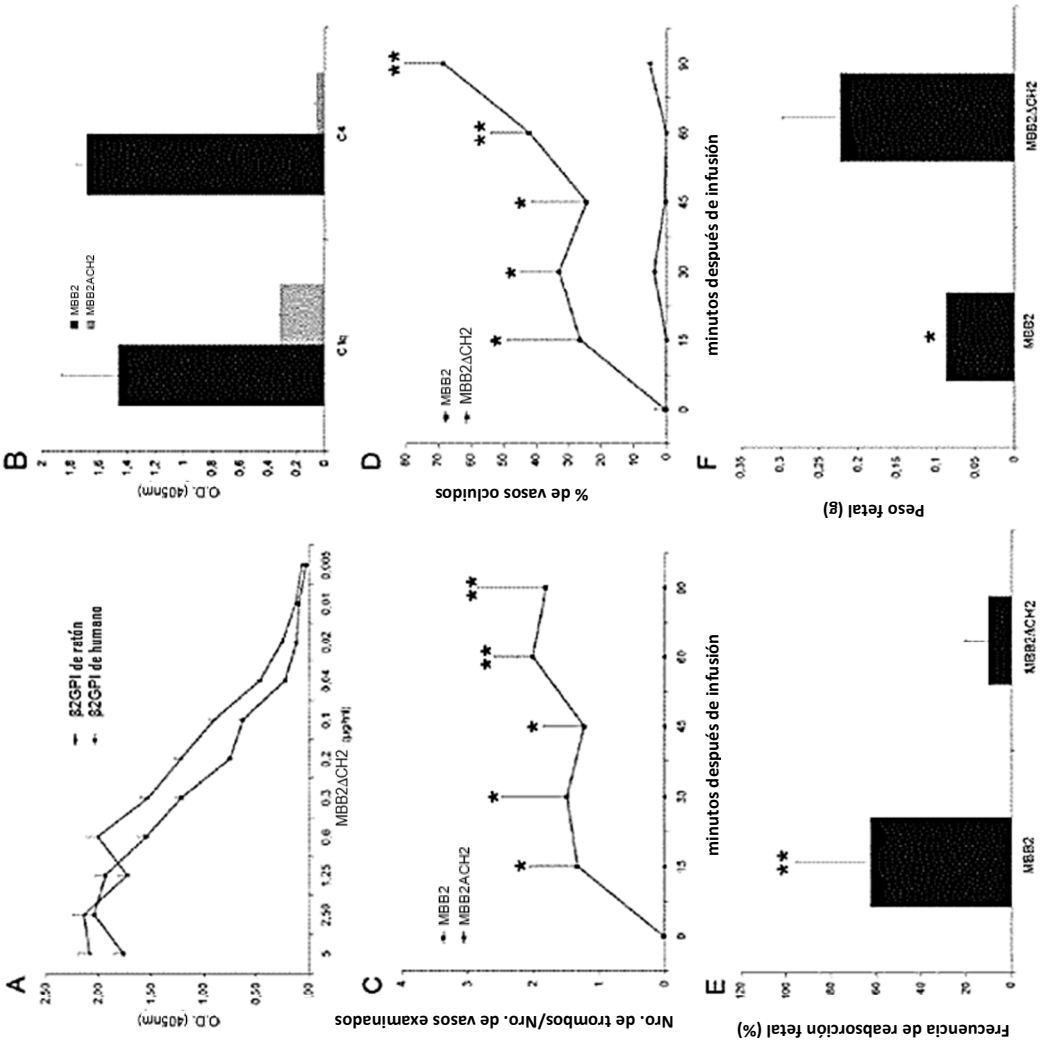
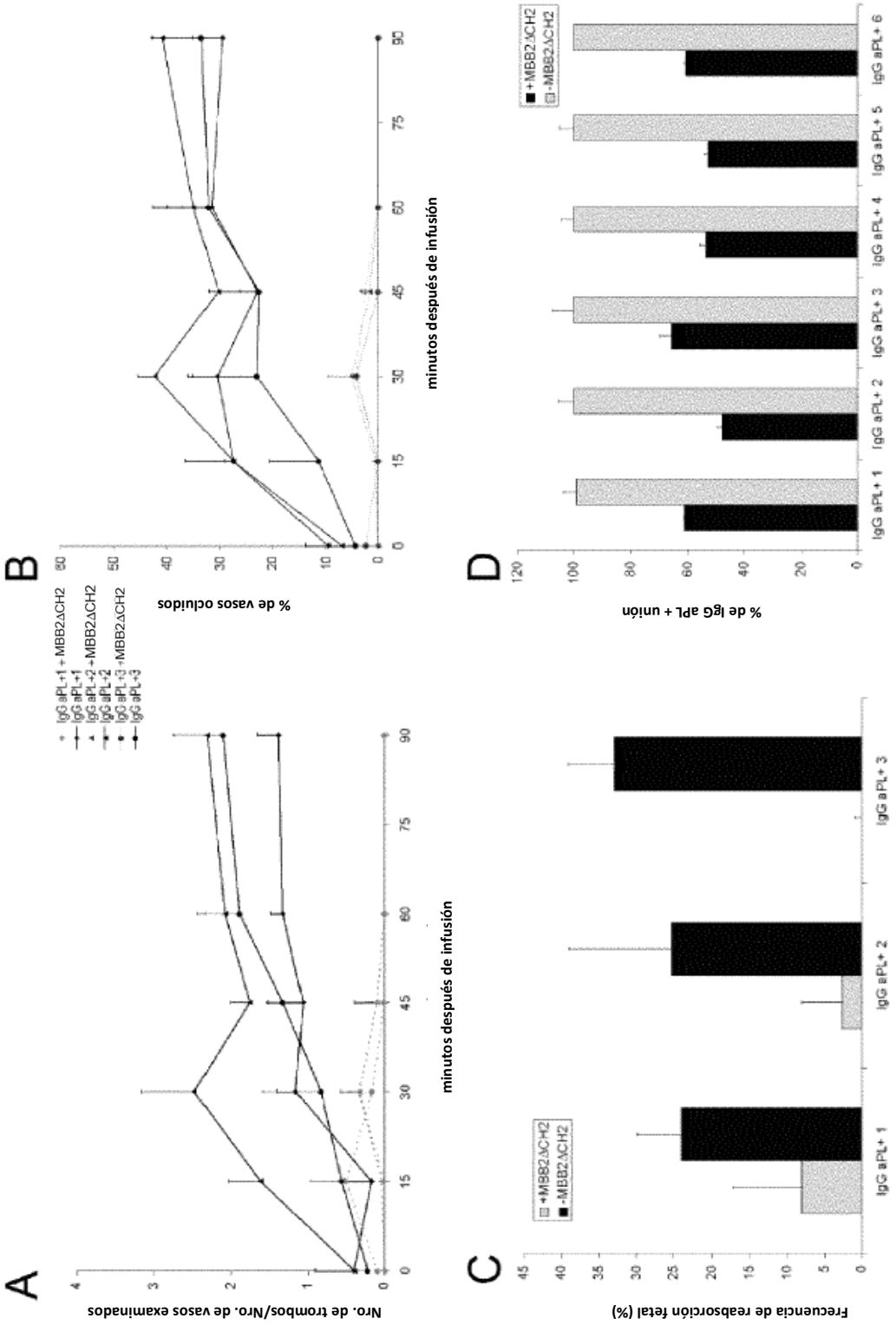

A
O.D. (405nm)
β2GPI de ratón
β2GPI de humano
MBB2ΔCH2 (µg/ml)
B
O.D. (405nm)
MBB2
MBB2ΔCH2
C1q
C4
C
Nro. de trombos/Nro. de vasos examinados
MBB2
MBB2ΔCH2
minutos después de infusión
D
% de vasos ocluidos
MBB2
MBB2ΔCH2
minutos después de infusión
E
Frecuencia de reabsorción fetal (%)
MBB2
MBB2ΔCH2
F
Peso fetal (g)
MBB2
MBB2ΔCH2

Figura 7

Figura 8


A
Nro. de trombos/Nro. de vasos examinados
minutos después de infusión
IgG aPL+1 + MBB2ΔCH2
IgG aPL+1
IgG aPL+2 + MBB2ΔCH2
IgG aPL+2
IgG aPL+3 + MBB2ΔCH2
IgG aPL+3
B
% de vasos ocluidos
minutos después de infusión
C
Frecuencia de reabsorción fetal (%)
+MBB2ΔCH2
-MBB2ΔCH2
IgG aPL+ 1
IgG aPL+ 2
IgG aPL+ 3
D
% de IgG aPL + unión
+MBB2ΔCH2
-MBB2ΔCH2
IgG aPL+ 1
IgG aPL+ 2
IgG aPL+ 3
IgG aPL+ 4
IgG aPL+ 5
IgG aPL+ 6