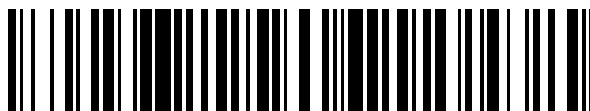


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 596**

51 Int. Cl.:

C07K 16/34 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015 PCT/EP2015/057102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150417**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015 E 15713749 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3126391**

54 Título: **Anticuerpos contra HPA-1a**

30 Prioridad:

31.03.2014 GB 201405775

06.10.2014 GB 201417614

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

29.04.2020

73 Titular/es:

**RALLYBIO IPA, LLC (100.0%)
400 Farmington Avenue Suite R2818
Farmington, CT 06032, US**

72 Inventor/es:

**MICHAELSEN, TERJE;
IHLE, ØISTEIN;
STUGE, TOR BRYNJAR;
HUSEBEKK, ANNE;
TILLER, HEIDI;
EKSTEEN, MARIANA y
SKOGEN, BJØRN RAGNAR**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 757 596 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 contra HPA-1a

- La presente invención se refiere en general al campo de los anticuerpos, en particular a los anticuerpos contra HPA-1a (antígeno plaquetario humano-1a). La invención se refiere además a composiciones e inmunos conjugados que comprenden tales anticuerpos y a procedimientos para producir dichos anticuerpos. La invención también se refiere a procedimientos para detectar la presencia o ausencia de HPA-1a en una muestra y procedimientos para el tratamiento, profilaxis y diagnóstico de TFNA (trombocitopenia fetal/neonatal aloinmune).
- 10 Los aloantígenos de plaquetas humanas HPA-1a y HPA-1b se definen por una mutación de un solo nucleótido que tiene como resultado una sustitución de leucina con prolina en la posición 33 en la cadena β 3 de la integrina plaquetaria α IIb β 3 (glucoproteína IIbIIIa). Los portadores de una leucina en la posición 33 de la cadena de integrina β se definen como HPA-1a positivo, mientras que los portadores homocigotos de una prolina en la posición 33 de la cadena de integrina β se definen como HPA-1a negativos (HPA-1bb).
- 15 Alrededor del 2 % de los caucásicos son homocigotos para HPA-1b (P33). Las mujeres con este fenotipo se pueden inmunizar contra HPA-1a en relación con el embarazo, cuando el feto tiene un alotipo HPA-1a heredado por vía paterna.
- 20 La falta de correspondencia entre los aloantígenos HPA-1 fetales y maternos puede traer consigo la inmunización materna con la producción de anticuerpos IgG anti-HPA-1a. Estos anticuerpos pueden atravesar la placenta, unir las plaquetas fetales y acelerar la destrucción de las plaquetas, provocando así TFNA. La TFNA es una complicación grave en el desarrollo fetal y neonatal. Los anticuerpos anti-HPA-1a representan la mayoría (85-90 %) de los casos de TFNA, y a menudo están involucrados en la púrpura post-transfusional (PPT) y en la resistencia a la transfusión de plaquetas.
- 25 Los anticuerpos maternos anti-HPA-1a producidos durante un embarazo no compatible pueden atravesar la placenta y causar TFNA en el feto de un primer embarazo (es decir, en el feto presente en el momento de la inmunización materna). Dichos fetos pueden desarrollar trombocitopenia severa en las primeras etapas del embarazo. Durante dicho primer embarazo, a menudo no se detecta la TFNA hasta el nacimiento, cuando el recién nacido presenta síntomas clásicos de trombocitopenia.
- 30 Además de afectar a un primer embarazo no compatible, se ha estimado que la reaparición de TFNA en embarazos no compatibles posteriores (es decir, embarazos en los que una madre que se inmunizó al aloantígeno HPA-1 en relación con un primer embarazo se queda embarazada de nuevo, y el feto es HPA-1a positivo) es más del 80 %. La inmunización con el aloantígeno HPA-1a también puede estar relacionada con el parto, lo que significa que un embarazo posterior no compatible puede tener riesgo de TFNA incluso si el primer feto / recién nacido no se vio afectado. Actualmente no existe una estrategia segura y efectiva para tratar o impedir la TFNA. Además, por lo general, la afección no se hace evidente hasta después del parto de un niño con trombocitopenia severa. Por lo tanto, el manejo eficiente de la TFNA dependerá de la introducción de pruebas de detección generales para identificar embarazos de riesgo y del desarrollo de profilaxis y nuevas estrategias de tratamiento.
- 35 Para la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (EHRN), un trastorno relacionado con el embarazo causado por anticuerpos reactivos con un aloantígeno de glóbulos rojos fetales se ha utilizado durante décadas una profilaxis efectiva basada en anticuerpos. Un gran estudio prospectivo de cribado en Noruega reveló que la inmunización contra HPA-1a puede ocurrir en relación con el parto y, por lo tanto, de manera similar a la EHRN, la profilaxis con anticuerpos anti-HPA-1a puede impedir la TFNA. Además, los experimentos que emplean un modelo murino de TFNA sugerían que la inmunización contra HPA-1a se puede impedir mediante la administración de anticuerpos específicos de HPA-1a en relación con el parto. Como consecuencia de los hallazgos anteriores, se están realizando ensayos clínicos para evaluar el potencial de la IgG hiperinmune anti-HPA-1a aislada del plasma del donante para impedir la inmunización de HPA-1a en relación con el embarazo. La IgG hiperinmune anti-HPA-1a es IgG extraída de mujeres aloinmunizadas con HPA-1a en relación con el embarazo.
- 45 Los inventores creen que una fuente atractiva de anticuerpos anti-HPA-1a para la profilaxis o terapia de TFNA eventual son los anticuerpos monoclonales recombinantes (mAbs). A diferencia de las preparaciones de IgG extraídas del plasma del donante, los mAbs pueden producirse en cantidades prácticamente ilimitadas, la especificidad y la función de los mAbs se pueden caracterizar en detalle, y se puede determinar una dosis terapéutica con mayor precisión proporcionando una mayor reproducibilidad en el tratamiento. Los mAbs anti-HPA-1a también serían de gran valor como reactivo de cribado para identificar si las mujeres son HPA-1a positivas o HPA-1a negativas.
- 50
- 55
- 60

Los mAb recombinantes humanos específicos de HPA-1a analizados se han desarrollado a partir de fragmentos de anticuerpos aislados mediante presentación en fagos. Se ha sugerido que los anticuerpos con cadenas pesadas y ligeras emparejadas al azar *in vitro* (p. ej., anticuerpos preparados mediante presentación en fagos) pueden representar proteínas extrañas o ser autorreactivas y, por lo tanto, es más probable que induzcan reacciones inmunes
5 indeseables en los receptores.

Existen varios mAbs que se unen a HPA-1a. Dos de dichos mAb se generaron en ratones mediante tecnología de hibridoma convencional. Uno de estos, el clon LK-4, diferencia los antígenos HPA-1a de HPA-1b en extractos de plaquetas pero no cuando está presente en plaquetas intactas, mientras que un segundo, SZ21, une HPA-1a en
10 plaquetas intactas. Sin embargo, el mAb SZ21 también se une de forma detectable a las plaquetas negativas HPA-1a cuando se usa a concentraciones crecientes de anticuerpos.

WO 98/15546 describe un fragmento de anticuerpo (ML1) que se une a HPA-1a.

15 Lo que se necesita en la técnica son agentes nuevos, preferiblemente mejorados, tales como anticuerpos, que se puedan usar para el tratamiento, profilaxis y diagnóstico de TFNA y para detectar la presencia o ausencia (es decir, el cribado) de aloantígeno HPA-1a en un sujeto.

Los presentes inventores han identificado anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a HPA-1a.
20 Mediante células B de una mujer HPA-bb que se había inmunizado en relación con el embarazo de un niño HPA-1a positivo, los inventores prepararon una línea de células B clonal generada por la transformación VEB de células B de memoria y seleccionaron células B que producen anticuerpos anti-HPA-1a. Los inventores también prepararon versiones recombinantes de estos anticuerpos. Los anticuerpos generados por los inventores tienen propiedades ventajosas que los hacen agentes ideales para los usos mencionados anteriormente.

25 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado que es capaz de unirse al aloantígeno HPA-1a y que no se une significativamente al aloantígeno HPA-1b, y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR, donde dicha región variable de la cadena ligera comprende:

- 30 (a) una CDR1 ligera variable (LV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8,
 (b) una CDR2 LV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9, y
 (c) una CDR3 LV que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y donde dicha región variable de la cadena pesada comprende:
 35 (d) una CDR1 pesada variable (PV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5,
 (e) una CDR2 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, y
 (f) una CDR3 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de
40 nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende uno o más anticuerpos de la invención mezclados con un diluyente, vehículo o excipiente adecuado.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención, que comprende las etapas de

- (i) cultivar una célula huésped que comprenda una o más moléculas de ácido nucleico de la invención o uno o más
50 vectores de expresión recombinantes que comprendan una o más de dichas moléculas de ácido nucleico en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo codificado; y
 (ii) aislar u obtener el anticuerpo o la proteína de la célula huésped o del medio de crecimiento / sobrenadante.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para uso en terapia, y preferiblemente dicha terapia es el tratamiento o profilaxis de trombocitopenia aloinmune fetal y neonatal (TFNA).
55

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en la prevención de la aloinmunización con HPA-1a en un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar HPA-1a, que comprende
60 poner en contacto una composición sospechosa de contener HPA-1a con un anticuerpo de la invención en condiciones efectivas para permitir la formación de complejos HPA-1a / anticuerpo y detectar los complejos así formados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para analizar la presencia o ausencia de HPA-1a en una muestra que se ha obtenido de un sujeto, y dicho procedimiento comprende las etapas de

- (a) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo de la invención que se une específicamente a HPA-1a; y
- 5 (b) analizar la presencia o ausencia de complejos de anticuerpos anti-HPA-1a-HPA-1a (antígeno),

y preferiblemente dicha muestra es una muestra que contiene plaquetas.

- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso *in vitro* de un anticuerpo de la invención como estándar de referencia para cuantificar anticuerpos anti-HPA-1a en una muestra, y preferiblemente dicha muestra es una muestra de sangre completa o una muestra de plasma.

- 15 También se describe en esta invención un anticuerpo aislado que se une específicamente a HPA-1a y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, donde dicha región variable de cadena ligera comprende:

- (a) una CDR1 ligera variable (LV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma,
- (b) una CDR2 LV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga
- 20 de la misma, y
- (c) una CDR3 LV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, y

donde dicha región variable de la cadena pesada comprende:

- 25 (d) una CDR1 pesada variable (PV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma,
- (e) una CDR2 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, y
- 30 (f) una CDR3 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma.

La invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a HPA-1a y que comprende:

- 35 un dominio LV que comprende un CDR1 LV de SEQ ID NO: 8, un CDR2 LV de SEQ ID NO: 9 y un CDR3 LV de SEQ ID NO: 10, y un dominio PV que comprende un CDR1 PV de SEQ ID NO: 5, un CDR2 PV de SEQ ID NO: 6 y un CDR3 PV de SEQ ID NO: 7.
- 40 Ciertas realizaciones preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo que se une específicamente a HPA-1a que comprende un dominio PV que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un dominio LV que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.
- 45 Otras realizaciones preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo que se une específicamente a HPA-1a que comprende un dominio PV que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio LV que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

- 50 Otras realizaciones preferidas de la invención son formas de IgG de longitud completa (por ejemplo, IgG1 o IgG3) de los anticuerpos descritos en esta invención. Por lo tanto, una realización preferida de la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a HPA-1a que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.
- 55 En otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a HPA-1a que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

- 60 En una realización particularmente preferida, un anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

En otra realización particularmente preferida, un anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

- 5 La invención se ejemplifica mediante el anticuerpo monoclonal D18BL26.4 (véase la sección de Ejemplos, también denominada en esta invención «26.4»). Los dominios CDR, los dominios PV y LV y las cadenas de IgG de longitud completa del anticuerpo 26.4 se muestran en la Tabla 1. Los anticuerpos de la invención comprenden estos dominios CDR. Los anticuerpos de la invención que comprenden estos dominios PV y LV, o cadenas de IgG (o secuencias sustancialmente homólogas a los mismos) son realizaciones preferidas de la invención. El anticuerpo 26.4, que incluye
10 versiones recombinantes del mismo, representa realizaciones preferidas de la invención.

La presente invención también proporciona proteínas de unión que se unen específicamente a HPA-1a y que comprenden un anticuerpo de la invención.

- 15 Como se usa en esta invención, el término «que se une específicamente a HPA-1a» en el contexto de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención, significa anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que son capaces de unirse al aloantígeno HPA-1a y que no presentan una reacción cruzada con el aloantígeno HPA-1b (es decir, no exhiben una unión significativa al aloantígeno HPA-1b). El anticuerpo 26.4 ejemplificado aquí es un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a HPA-1a.

- 20 En una realización, un anticuerpo de la invención no reacciona de forma cruzada con HPA-1b cuando se usa a una concentración de 10 µg/ml a 20 µg/ml en el formato IgG (por ejemplo, 10 µg/ml o 20 µg/ml), por ejemplo, cuando se prueba contra el antígeno HPA-1b en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, el ensayo descrito en el ejemplo 1). No se considera que los anticuerpos que son sólo pseudoespecíficos para HPA-1a se unan
25 específicamente a HPA-1a según la presente invención.

Por supuesto, el anticuerpo que «se une específicamente a HPA-1a» según la presente invención no reacciona de forma cruzada con otros antígenos HPA o no HPA.

- 30 Ciertos ejemplos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que tienen al menos un 70 % de identidad con las secuencias de aminoácidos descritas.

- En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a HPA-1a comprenden al menos una región variable de cadena ligera que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos
35 aproximadamente 70 % o 75 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % o 95 % y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y/o al menos una región variable de cadena pesada que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 70 % o 75 %, más preferiblemente al menos
40 aproximadamente 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % o 95 % y más preferiblemente al menos aproximadamente 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

- Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen sustituciones
45 conservadoras de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos descritas.

- Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen 1, 2 o 3, preferiblemente 1 o 2, aminoácidos alterados en una o más de las regiones CDR descritas. Dichas alteraciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadas o no conservadas, o una mezcla de las mismas.

- 50 En todos estos ejemplos, las alteraciones preferidas son sustituciones conservadoras de aminoácidos.

- También se describe en esta invención un anticuerpo aislado que se une específicamente a HPA-1a y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena
55 ligera que comprende tres CDR, donde dicha región variable de cadena ligera comprende:

- (a) una CDR1 ligera variable (LV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma,
(b) una CDR2 LV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga
60 de la misma y
(c) una CDR3 LV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, y

donde dicha región variable de la cadena pesada comprende:

- (d) una CDR1 pesada variable (PV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma,
 5 (e) una CDR2 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, y
 (f) una CDR3 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma; y

10 donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de CDR dada, o donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácidos conservadoras de la secuencia de CDR dada.

15 En otra realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a HPA-1a, donde la región variable de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma y/o donde la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la misma.

20 En todas las realizaciones, los anticuerpos que contienen secuencias sustancialmente homólogas retienen la capacidad de unirse específicamente a HPA-1a y preferiblemente retienen una o más de las otras propiedades descritas en esta invención, más preferiblemente todas las propiedades descritas en relación con el anticuerpo 26.4.

25 Otros ejemplos de secuencias de aminoácidos sustancialmente homólogas según la presente invención se describen en otra parte de esta solicitud.

Las CDR de los anticuerpos de la invención están preferiblemente separadas por regiones de estructura apropiadas tales como las que se encuentran en los anticuerpos naturales y/o los anticuerpos modificados genéticamente. Por lo tanto, las secuencias P_V, L_V y las secuencias de CDR individuales de la invención preferentemente aparecen dentro o se incorporan a una estructura o soporte apropiado para permitir la unión al antígeno. Dichas secuencias o regiones de estructura pueden corresponder a regiones de estructura naturales, FR1, FR2, FR3 y/o FR4, según corresponda para formar un soporte apropiado, o pueden corresponder a regiones de estructura de consenso, por ejemplo identificadas mediante la comparación de varias regiones de estructura naturales. De forma alternativa, se pueden usar armazones o estructuras que no sean anticuerpos, por ejemplo, estructuras de receptores de células T.

Las secuencias apropiadas que pueden usarse para regiones de estructura son bien conocidas y están documentadas en la técnica, y se puede usar cualquiera de estas. Las secuencias preferidas para las regiones de estructura son una o más de las regiones de estructura que forman los dominios de la invención P_V y/o L_V, es decir, una o más de las regiones de estructura del anticuerpo 26.4, como se describe en la Tabla 1, o regiones de estructura sustancialmente homólogas a las mismas, y en particular regiones de estructura que permiten el mantenimiento de la especificidad del antígeno, por ejemplo, regiones de estructura que dan como resultado sustancialmente lo mismo o la misma estructura 3D del anticuerpo. En ciertas realizaciones preferidas, las cuatro regiones de estructura de cadena ligera variable (SEQ ID NO: 15, 16, 17 y 18) y/o cadena pesada variable (SEQ ID NO: 11, 12, 13 y 14) regiones de estructura (FR), según corresponda, o regiones estructura sustancialmente homólogas FR a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

Sin desear limitarse a la teoría, se cree que un buen sistema para seleccionar anticuerpos anti-HPA-1a clínicamente útiles es aprovechar el mecanismo selectivo en la respuesta inmune generada contra HPA-1a en individuos HPA-1a negativos, es decir, la respuesta inmune ante HPA-1a en individuos HPA-1a negativos que se han inmunizado en relación con un embarazo no compatible (un embarazo con un feto HPA-1a positivo). Las células B de memoria que se seleccionan en dichas respuestas deben tener receptores que reaccionen bien a HPA-1a, pero no sean reactivos al antígeno alogénico HPA-1b (es decir, «propio»). Por lo tanto, se esperaría que los anticuerpos seleccionados de entre las células B de memoria de dicho individuo sean altamente específicos para HPA-1a y no reaccionen de forma cruzada con HPA-1b (que solo difiere de HPA-1a por un único polimorfismo de aminoácidos). Además, como un anticuerpo seleccionado mediante dicho sistema se selecciona por naturaleza (es decir, mediante un sistema inmune humano) esto significa que, cuando se usa clínicamente, debe haber una reducción del riesgo de anafilaxia, autorreactividad y/o toxicidad, y/o el anticuerpo no debe eliminarse rápidamente de la circulación, en comparación con, por ejemplo, un anticuerpo seleccionado *in vitro* de una biblioteca (p. ej., mediante presentación en fagos). Los anticuerpos de la presente invención se basan en el anticuerpo 26.4, que se seleccionó de dicha forma. El anticuerpo 26.4 se derivó de una sola célula B de una mujer HPA-1a negativa que fue aoinmunizada HPA-1a en relación con el embarazo.

Por lo tanto, preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención tienen un bajo riesgo de causar anafilaxia y/o toxicidad cuando se usan clínicamente. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención no son autorreactivos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención no se eliminan rápidamente de la circulación.

5

Como se ya se ha descrito, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a HPA-1a. Preferiblemente, los anticuerpos se unen a HPA-1a en plaquetas intactas. Los ensayos para determinar si los anticuerpos se unen a HPA-1a en plaquetas positivas para HPA-1a intactas incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo (por ejemplo, citometría de flujo sanguíneo completo) o el ensayo MAIPA (ensayo de inmovilización de antígenos plaquetarios con el empleo de anticuerpos monoclonales). La citometría de flujo adecuada y los ensayos MAIPA se describen en los ejemplos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a formas purificadas de proteínas portadoras de HPA-1a o HPA-1a. Como ya se ha descrito anteriormente, el antígeno HPA-1a está presente en la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (glucoproteína IIb/IIIa). Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención son capaces de unirse a la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ purificada de individuos HPA-1a positivos. Los procedimientos para purificar la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ son conocidos en la técnica, al igual que los procedimientos para determinar si un anticuerpo puede unirse a una proteína purificada. Por ejemplo, el Ejemplo 1 describe un procedimiento para purificar (aislar) la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ de las plaquetas. El ejemplo 1 también describe cómo se puede utilizar la resonancia de plasmones superficiales para analizar la unión de formas purificadas de proteínas portadoras de HPA-1a o HPA-1a. Los anticuerpos preferidos permanecen unidos al menos en un 50 % a una integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ purificada e inmovilizada de individuos HPA-1a positivos al final del período de disociación en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales. Preferiblemente, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % del anticuerpo permanece unido al final del período de disociación en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales. Por ejemplo, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 80 % del anticuerpo permanece unido. Un período de asociación preferido en dicho ensayo de resonancia de plasmones superficiales es de 120 segundos. Un período de disociación preferido en dicho ensayo de resonancia de plasmones superficiales es de 120 segundos. En el ejemplo 1 se describe un ensayo de resonancia de plasmones superficiales particularmente preferido.

30

La integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ es otro heterodímero que contiene integrina β3 (receptor de vitronectina). $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ se expresa en las células del trofoblasto fetal. La integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ de las células del trofoblasto fetal obtenidas de un individuo HPA-1a positivo (por ejemplo, un individuo homocigoto HPA-1a) o purificado de dicho individuo contiene el antígeno HPA-1a. Por lo tanto, los anticuerpos que se unen específicamente a la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ de individuos HPA-1a positivos se consideran anticuerpos que se unen específicamente a HPA-1a según la presente invención.

35

Los trofoblastos fetales, que recubren la interfase materno-fetal, pasan constantemente a la circulación materna durante el embarazo. Por lo tanto, los trofoblastos fetales HPA-1a positivos representan una fuente de HPA-1a para la aloinmunización de una mujer durante un embarazo no compatible, es decir, un embarazo donde la madre es HPA-1a negativa y el feto es HPA-1a positivo. Se sabe que algunas mujeres se inmunizan contra HPA-1a en un momento temprano del embarazo, cuando la inmunización con plaquetas fetales es poco probable debido a la etapa de desarrollo de las células sanguíneas fetales. En tales casos, la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ que contiene el antígeno HPA-1a es el inmunógeno probable. Por lo tanto, se prefieren los anticuerpos de la presente invención que son capaces de unirse a la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ que contiene el antígeno HPA-1a.

45

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse al antígeno HPA-1a en trofoblastos fetales intactos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a formas purificadas de integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ de individuos HPA-1a positivos. Los procedimientos para purificar la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ son conocidos en la técnica, al igual que los procedimientos para determinar si un anticuerpo puede unirse a una proteína purificada. Por ejemplo, el Ejemplo 1 describe un procedimiento para purificar (aislar) integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ de placenta humana. El ejemplo 1 también describe cómo se puede utilizar la resonancia de plasmones superficiales para analizar la unión de formas purificadas de proteínas portadoras de HPA-1a o HPA-1a. Los anticuerpos preferidos permanecen unidos al menos en un 35 % a una integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ purificada e inmovilizada de individuos HPA-1a positivos al final del período de disociación en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales. Preferiblemente, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 % o al menos el 65 % del anticuerpo permanece unido al final del período de disociación en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales. Por ejemplo, del 35 % al 70 % del anticuerpo permanece unido. Un período de asociación preferido en dicho ensayo de resonancia de plasmones superficiales es de 120 segundos. Un período de disociación preferido en dicho ensayo de resonancia de plasmones superficiales es de 120 segundos. Las densidades de antígeno (ligando) adecuadas en el chip utilizado en la resonancia de plasmones superficiales se conocen en la técnica y pueden establecerse fácilmente (por ejemplo, las del ejemplo 1). En el ejemplo

60

1 se describe un ensayo de resonancia de plasmones superficiales particularmente preferido.

Preferiblemente, en experimentos de resonancia de plasmones superficiales, los anticuerpos de la presente invención se disocian de la integrina $\alpha V\beta 3$ purificada e inmovilizada de individuos HPA-1a positivos de forma más lenta que el anticuerpo B2G1 (Griffin H, Ouwehand W., Blood. 1995; 86(12):4430-6). Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se disocian aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 % o aproximadamente un 100 % más lento que el anticuerpo B2G1 (por ejemplo, aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % más lento).

Preferiblemente, en experimentos de resonancia de plasmones superficiales, los anticuerpos de la invención tienen una respuesta de unión más alta para la integrina $\alpha V\beta 3$ de individuos HPA-1a positivos que el anticuerpo B2G1. Preferiblemente, la respuesta de unión es al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 % o al menos un 70 % mayor que para el anticuerpo B2G1 (por ejemplo, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 70 % mayor). La respuesta de enlace es el valor de las unidades de respuesta (RU) al final de la fase de asociación.

Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de B2G1 son las siguientes:

20

Región variable de la cadena pesada de B2G1 (SEQ ID NO: 27)
 QVQLVQSGAEVKRPGAAVKVSCKASGYRFTGHYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTSYA
 QKFQGRVTMTRDTSISTAYMEMTRLRYDDTAVYYCAAGGLGGYYYYYAMNIWGQGTITVTVSS

Región variable de la cadena ligera de B2G1 (SEQ ID NO:28)
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINYVSWYQQHPGKAPKLMIIYEVSNRPSGVS

25

NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSTWVFGGGTKLTVL

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención tienen la capacidad de inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ (genotipo HPA-1aa). La inhibición de la unión no significa necesariamente un bloqueo completo de la unión, la inhibición incluye una reducción significativa o medible en la unión. Preferiblemente, la capacidad de inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ es una capacidad dependiente de la dosis, es decir, a medida que aumenta la concentración de un anticuerpo de la invención, la inhibición de la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ aumenta. Los ensayos adecuados para evaluar la capacidad de un anticuerpo dado para inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ son conocidos en la técnica. En tales ensayos, la integrina $\alpha V\beta 3$ puede ser de un lisado celular de una línea celular de trofoblasto (por ejemplo, la línea celular TCL-1, Lewis MP, et al., (1996), Placenta 17: 137-46). Un ensayo particularmente adecuado es un ensayo de inhibición de la unión de anticuerpos citométricos de flujo, por ejemplo, el ensayo de inhibición de la unión de anticuerpos citométricos de flujo descrito en el Ejemplo 1.

En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos de la presente invención tienen una capacidad aumentada para inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ (genotipo HPA-1aa) en comparación con la capacidad del anticuerpo B2G1 para inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ (HPA-1aa genotipado). Dicho de otra manera, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son más eficientes que el anticuerpo B2G1 para inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ (genotipo HPA-1aa). Por ejemplo, en algunas realizaciones, si se usa una cantidad de 12,5 ng-200 ng (por ejemplo 12,5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng o 200 ng), los anticuerpos de la presente invención tienen una capacidad aumentada para inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ (genotipo HPA-1aa) en comparación con la capacidad del anticuerpo B2G1 (si se usa la misma cantidad/concentración) para inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ (HPA-1aa genotipado). De forma típica, se usa un volumen fijo de anticuerpos de 200 μ l, por lo que las cantidades mencionadas anteriormente de 12,5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng y 200 ng equivalen a concentraciones de 62,5 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml y 1000 ng/ml, respectivamente. Este aumento de capacidad es significativo y los anticuerpos preferidos inhiben, así como el anticuerpo 26,4, por ejemplo, como se muestra en la Figura 5 f). Los anticuerpos preferidos son al menos un 20 %, preferiblemente al menos un 30 %, más preferiblemente al menos un 40 o 50 % más efectivos (en cualquiera de las concentraciones mencionadas anteriormente) para inhibir la unión de SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$ que B2G1.

55

Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de SZ21 son las siguientes:

Región variable de la cadena pesada de SZ21 (número de acceso de Genebank AF354053) (SEQ ID NO: 29)

LQESGPELVNPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPY
 HGGSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYFCARRDANYVF
 FFDYWGQGTTVT

Región variable de la cadena ligera de SZ21 (número de acceso de Genebank AF354054) (SEQ ID NO: 30)
 ELTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSGVSYIHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKL

ASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSKPPTFGGGTKLE

5

En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos de la invención son capaces de inducir fagocitosis de plaquetas HPA-1a positivas. Sin limitarse a la teoría, se cree que los anticuerpos actúan uniéndose a HPA-1a en las plaquetas y sensibilizando/opsonizando las plaquetas unidas para su destrucción mediante los fagocitos (por ejemplo, monocitos). Por lo tanto, se cree que la capacidad de inducir fagocitosis de plaquetas HPA-1a positivas es particularmente importante en el contexto de la profilaxis con TFNA. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención inducen fagocitosis de plaquetas HPA-1a positivas de una manera dependiente de la concentración, y se observa un aumento de la fagocitosis a medida que aumenta la concentración de anticuerpo utilizada. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención son capaces de inducir fagocitosis cuando se usan a una concentración de al menos 0,05 µg/ml, por ejemplo a una concentración en el intervalo de 0,05 µg/ml a 50 µg/ml, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml. En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos inducen al menos un 20 % de fagocitosis de plaquetas, por ejemplo al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % de fagocitosis o un 100 % de fagocitosis (por ejemplo, aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 90 % de fagocitosis). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los anticuerpos según la presente invención son capaces de inducir aproximadamente el 90 % de fagocitosis de plaquetas homocigotas HPA-1a cuando se usan a una concentración de 10 µg/ml. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención no inducen fagocitosis de plaquetas HPA-1a negativas. Los procedimientos para evaluar la fagocitosis de plaquetas son conocidos en la técnica y en el ejemplo 1 se describe un ensayo adecuado. El valor del % de fagocitosis puede ser el % de monocitos que tienen plaquetas internalizadas, por ejemplo, en un ensayo como se describe en el ejemplo 1. El ensayo descrito en el ejemplo 1 es un ensayo preferido para evaluar la capacidad de los anticuerpos de la presente invención para inducir la fagocitosis.

Preferiblemente, los anticuerpos de la invención no inhiben la agregación de plaquetas de HPA-1bb (por ejemplo, menos del 10 % de inhibición a una concentración de anticuerpo de 12 µg/ml). Preferiblemente, los anticuerpos de la invención no inhiben en gran medida la agregación de plaquetas de HPA-1ab (por ejemplo, no más del 30 %, preferentemente no más del 20 % de inhibición a una concentración de anticuerpo de 12 µg/ml). Esta falta de actividad inhibitoria significativa significa que los anticuerpos no impedirán la función de las plaquetas maternas o fetales. Los anticuerpos de la invención, además, preferiblemente no tendrán un efecto activador sobre las plaquetas positivas para HPA-1a (por ejemplo, a una concentración de anticuerpo de 12 µg/ml).

Los procedimientos para evaluar un efecto en la agregación de plaquetas son conocidos en la técnica y en el ejemplo 1 se describe un ensayo adecuado. El ensayo descrito en el ejemplo 1 es un ensayo preferido para evaluar la capacidad de los anticuerpos de la presente invención para inhibir la agregación de plaquetas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir la unión de la IgG policlonal materna anti-HPA-1a a las plaquetas homocigotas HPA-1a. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo es preferiblemente un fragmento F(ab')₂ del anticuerpo 26,4. Preferiblemente, la inhibición es de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 %. Por ejemplo, la inhibición puede ser del 65 % al 100 %. Dicha inhibición se puede evaluar mediante un ensayo MAIPA, por ejemplo como se describe en el ejemplo 3 en esta solicitud.

45

Tal y como aparecen a lo largo de toda la solicitud, los términos «un» y «una» se usan en el sentido de que significan «al menos uno», «al menos un primer», «uno o más» o «una pluralidad» de los componentes o etapas mencionados, excepto en los casos donde se establezca específicamente un límite superior a partir de entonces. Por lo tanto, un «anticuerpo», como se usa en esta solicitud, significa «al menos un primer anticuerpo». Los límites operables y los parámetros de las combinaciones, así como las cantidades de cualquier agente individual, serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente descripción.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente invención tal como se definen en esta solicitud conforman otros aspectos adicionales de la invención. Un ácido nucleico preferido es un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo (por ejemplo, los que codifican SEQ ID NO: 21 y 25, como SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 23, respectivamente) o los que codifican una

cadena ligera de un anticuerpo (por ejemplo, los que codifican SEQ ID NO: 22 y 26, como SEQ ID NO: 20 y 24). Otras moléculas de ácido nucleico preferidas son las que codifican una región PV de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, las que codifican SEQ ID NO: 3, tales como SEQ ID NO: 1). Otras moléculas de ácido nucleico preferidas son las que codifican una región LV de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, las que codifican SEQ ID NO: 4, tales como SEQ ID NO: 2).

El término «sustancialmente homólogo» como se usa en esta solicitud en relación con una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico incluye secuencias que tienen al menos un 70 % o 75 %, preferiblemente al menos un 80 %, y aún más preferiblemente al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con el aminoácido o la secuencia de ácido nucleico descrita. Las secuencias sustancialmente homólogas de la invención incluyen, por lo tanto, alteraciones individuales o múltiples de una base o de aminoácidos (adiciones, sustituciones, inserciones o eliminaciones) a las secuencias de la invención. A nivel de aminoácidos, las secuencias sustancialmente homólogas preferidas contienen hasta 5 aminoácidos alterados, por ejemplo, solo 1, 2, 3, 4 o 5, preferiblemente 1, 2 o 3, más preferiblemente 1 o 2, en una o más de las regiones de estructura que forman las secuencias de la invención. Dichas alteraciones pueden ser con aminoácidos conservadores o no conservadores. Preferiblemente, dichas alteraciones son sustituciones conservadoras de aminoácidos.

El término «sustancialmente homólogo» también incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la presente invención que realizan sustancialmente la misma función que las proteínas o moléculas de ácido nucleico de la invención de manera sustancialmente igual. Por ejemplo, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debería conservar la capacidad de unirse a HPA-1a como ya se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debería retener una o más de las capacidades funcionales del anticuerpo de partida.

Preferiblemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debería conservar la capacidad de unirse específicamente al mismo epítipo de HPA-1a reconocido por el anticuerpo en cuestión, por ejemplo, el mismo epítipo reconocido por los dominios CDR de la invención o los dominios PV y LV de la invención, como se describe en esta solicitud. La unión al mismo epítipo/antígeno se puede comprobar fácilmente mediante procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica, *p.ej.*, mediante ensayos de unión, *p.ej.*, un ensayo de competición. La retención de otras propiedades funcionales también se puede comprobar fácilmente mediante procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica.

Por lo tanto, un experto en la materia apreciará que los ensayos de unión pueden usarse para comprobar si los anticuerpos «sustancialmente homólogos» tienen las mismas especificidades de unión que los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención, por ejemplo, se pueden usar fácilmente ensayos de unión tales como ensayos ELISA o BIAcore para establecer si tales anticuerpos «sustancialmente homólogos» se pueden unir a HPA-1a. Como se explica a continuación, se puede usar un ensayo de unión competitiva para comprobar si los anticuerpos «sustancialmente homólogos» retienen la capacidad de unirse específicamente al mismo epítipo de HPA-1a según lo reconocido por los anticuerpos de la invención (por ejemplo, 26,4), o si tienen la capacidad de competir con uno o más de los diversos anticuerpos de la invención (por ejemplo, 26,4). El procedimiento descrito a continuación es solo un ejemplo de un ensayo de competición adecuado. El experto en la materia conocerá otros procedimientos y variaciones adecuados.

Un ensayo de competición ejemplar implica evaluar la unión de varias concentraciones efectivas de un anticuerpo de la invención a HPA-1a en presencia de concentraciones variables de un anticuerpo de prueba (*es decir*, un anticuerpo sustancialmente homólogo). A continuación se puede evaluar la cantidad de inhibición de la unión inducida por el anticuerpo de prueba. Un anticuerpo de prueba que muestre una mayor competición con un anticuerpo de la invención a concentraciones crecientes (*es decir*, que las concentraciones crecientes del anticuerpo de prueba tengan como resultado una reducción correspondiente en la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a HPA-1a) es la prueba de que se une sustancialmente al mismo epítipo. Preferiblemente, el anticuerpo de prueba reduce significativamente la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a HPA-1a. Preferiblemente, el anticuerpo de prueba reduce la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a HPA-1a en al menos alrededor de un 95 %. Los ensayos ELISA y de citometría de flujo son apropiados para evaluar la inhibición de la unión en dicho ensayo de competición, pero un experto en la materia puede reconocer otras técnicas adecuadas.

Las secuencias de proteínas sustancialmente homólogas de la invención incluyen, sin limitación, sustituciones conservadoras de aminoácidos o, por ejemplo, alteraciones que no afectan los dominios PV, LV o CDR de los anticuerpos, *es decir*, anticuerpos donde se añaden secuencias de etiqueta u otros componentes que no contribuyen a la unión del antígeno, o alteraciones para convertir un tipo o formato de molécula o fragmento de anticuerpo en otro tipo o formato de molécula o fragmento de anticuerpo (*es decir*, conversión de Fab a scFv o viceversa), o la conversión de una molécula de anticuerpo a una clase o subclase particular de molécula de anticuerpo (por ejemplo, la conversión de una molécula de anticuerpo a IgG o una subclase de la misma, por ejemplo, IgG1 o IgG3).

Una «sustitución conservadora de aminoácidos», como se usa en esta invención, es aquella donde el residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluidas las cadenas laterales

5 básicas (p.ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (es decir, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (es decir, glicina, cisteína, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (es decir, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (es decir, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

10

La homología puede evaluarse por cualquier procedimiento conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de homología entre secuencias, son útiles los programas informáticos que hacen múltiples alineamientos de secuencias, por ejemplo Clustal W (Thompson, Higgins, Gibson, *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680, 1994). Si así procede, el algoritmo Clustal W se puede usar junto con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl.*

15 *Acad. Sci. Estados Unidos*, 89: 10915-10919, 1992) y una penalización de apertura de espacio de 10 y una penalización de extensión de espacio de 0,1, de modo que la coincidencia de orden más alta se obtiene entre dos secuencias en las que al menos el 50 % de la longitud total de una de las secuencias está implicada en la alineación. Otros procedimientos que pueden usarse para alinear secuencias son el procedimiento de alineación de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443, 1970) según la revisión de Smith y Waterman (Smith y

20 *Waterman, Adv. Appl. Math.*, 2: 482, 1981) para que se obtenga la coincidencia de orden más alto entre las dos secuencias y se determine el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Existen otros procedimientos para calcular la identidad de porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos generalmente reconocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos por Carillo y Lipton (Carillo y Lipton, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073, 1988) y los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, ed. Oxford University Press, Nueva York, 1988, *Biocomputing:*

25 *Informatics and Genomics Projects*.

En general, se utilizarán programas informáticos para tales cálculos. Los programas que comparan y alinean pares de secuencias, como ALIGN (Myers y Miller, *CABIOS*, 4: 11-17, 1988), FASTA (Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 85: 2444-2448, 1988; Pearson, *Methods in Enzymology*, 183: 63-98, 1990) y BLAST abierto (Altschul

30 *et al., Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402, 1997), BLASTP, BLASTN o GCG (Devereux, Haeberli, Smithies, *Nucleic Acids Res.*, 12: 387, 1984) también son útiles para este propósito. Además, el servidor Dali del Instituto Europeo de Bioinformática ofrece alineaciones basadas en estructuras de secuencias de proteínas (Holm, *Tendencias en Ciencias Bioquímicas*, 20: 478-480, 1995; Holm, *J. Mol. Biol.*, 233: 123-38, 1993; Holm, *Nucleic Acid Res.*, 26: 316-9, 1998).

35 Para proporcionar un punto de referencia, se pueden determinar las secuencias que, según la presente invención, tengan un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología, identidad de secuencia, etc. mediante la utilización del programa ALIGN con parámetros predeterminados (por ejemplo, disponible en Internet en el servidor de red GENESTREAM, IGH, Montpellier, Francia).

40 En las siguientes descripciones de las composiciones, inmunconjugados, productos farmacéuticos, combinaciones, cócteles, kits, primeros y segundos usos médicos y todos los procedimientos según esta invención, los términos «anticuerpo» e «inmunconjugado», o una región o fragmento de unión a antígeno de los mismos, a menos que se indique lo contrario específicamente o se aclare a partir de la terminología científica, se refieren a un rango de anticuerpos anti-HPA-1a, así como al anticuerpo 26,4 específico.

45

Los términos «anticuerpo» e «inmunoglobulina», como se usan en esta invención, se refieren de forma general a cualquier agente de unión inmunológica que comprenda un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un dominio de unión a antígeno humano), que incluya anticuerpos policlonales y monoclonales. Según el tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos completos se asignan a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE,

50 IgG e IgM y los anticuerpos de la invención pueden estar en cualquiera de estas clases. Varios de estos se dividen además en subclases o isotipos, como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Los dominios constantes de cadena pesada correspondientes a las diferentes clases se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

55 En general, si se usan anticuerpos completos en lugar de regiones de unión a antígeno en la invención, se prefieren IgG o IgM porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque se fabrican más fácilmente en un entorno de laboratorio. Se prefieren en particular los anticuerpos IgG1 e IgG3.

Las «cadenas ligeras» de los anticuerpos de mamíferos se asignan a uno de dos tipos claramente distintos: kappa (κ)

60 y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes y algunos aminoácidos en las regiones de estructura de sus dominios variables.

Como entenderán los expertos en la técnica, los reactivos de unión inmunológica abarcados por el término «anticuerpo» se extienden a todos los anticuerpos humanos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo anticuerpos completos, anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; anticuerpos recombinantes y modificados genéticamente, y fragmentos de los mismos.

5 El término «anticuerpo», por lo tanto, se refiere a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tenga una región de unión a antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión a antígeno como Fab', Fab, F(ab')₂, dímero TandAbs, Fv, scFv (cadena única Fv), dsFv, ds-scFv, anticuerpos lineales, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpo biespecíficos, bicuerpo, tricuerpo (fusiones scFv-Fab, 10 biespecíficas o trispecíficas, respectivamente); diacuerpo-sc; cuerpos kappa(lamda) (fusiones scFv-CL); BiTE (Bispecific T-cell Engager, tándems scFv-scFv para atraer células T); DVD-Ig (anticuerpo de dominio variable dual, formato biespecífico); SIP (inmunoproteína pequeña, un tipo de minicuerpo); SMIP (dímero scFv-Fc «inmunofármaco modular pequeño»); and DART (diacuerpo estabilizado «Dual Affinity ReTargeting»). En una realización preferida de la invención, el fragmento de anticuerpo es un fragmento F(ab')₂.

15 Las técnicas para preparar y usar diversas construcciones y fragmentos basados en anticuerpos son bien conocidas en la técnica. Los diacuerpos, en particular, se describen de forma adicional en EP 404 097 y WO 93/11161; mientras que los anticuerpos lineales se describen adicionalmente en la técnica.

20 El término «región determinante de la complementariedad de la cadena pesada» («CDR de la cadena pesada»), como se usa en esta solicitud, se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de la cadena pesada (dominio P_V) de una molécula de anticuerpo. La región variable de la cadena pesada tiene tres CDR denominadas CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada y CDR3 de cadena pesada desde el extremo amino al extremo carboxilo. La región variable de la cadena pesada también tiene cuatro regiones de estructura (FR1, FR2, FR3 y FR4 25 desde el extremo amino al extremo carboxilo). Estas regiones de estructura separan las CDR.

El término «región variable de la cadena pesada» (dominio P_V), según se usa en esta invención se refiere a la región variable de una cadena pesada de una molécula de anticuerpo.

30 El término «región determinante de la complementariedad de la cadena ligera» («CDR de la cadena ligera»), como se usa en esta solicitud, se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de la cadena ligera (dominio P_V) de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de la cadena ligera tienen tres CDR denominadas CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera y CDR3 de cadena ligera desde el extremo amino al extremo carboxilo. La región variable de la cadena ligera también tiene cuatro regiones de estructura (FR1, FR2, FR3 y FR4 desde el extremo 35 amino al extremo carboxilo). Estas regiones de estructura separan las CDR.

El término «región variable de la cadena ligera» (dominio L_V), según se usa en esta invención, se refiere a la región variable de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo.

40 Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab')₂ mediante el tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro y producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también se pueden sintetizar mediante técnicas 45 recombinantes o se pueden sintetizar químicamente. Las técnicas para producir fragmentos de anticuerpos son bien conocidas y se describen en la técnica.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende toda o una parte de una región constante de cadena pesada, como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, 50 IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 o IgG3, o una porción de la misma. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender la totalidad o una porción de una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda, o una porción de la misma. La totalidad o parte de tales regiones constantes puede producirse de forma natural o pueden ser total o parcialmente sintéticas. Las secuencias apropiadas para tales regiones constantes son 55 bien conocidas y documentadas en la técnica. Cuando se incluye un complemento completo de regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras en los anticuerpos de la invención, dichos anticuerpos se denominan típicamente en esta invención como anticuerpos de «longitud completa» o anticuerpos «completos».

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden producirse de forma natural o pueden producirse de forma total o 60 parcialmente sintética. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser de cualquier fuente apropiada, por ejemplo, fuentes recombinantes, y/o producirse en animales transgénicos o plantas transgénicas, o en huevos, mediante el uso de la tecnología IgY. Por lo tanto, las moléculas de anticuerpos pueden ser producidas *in vitro* o *en vivo*.

Según la presente invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (L_v) que comprende tres dominios CDR y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (P_v) que comprende tres dominios CDR. Dichos LV y PV generalmente forman el sitio de unión al antígeno.

5 Un fragmento «F_v» es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región tiene un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente y fuerte. En esta configuración, las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero P_v-L_v. En conjunto, las seis
10 regiones hipervariables (CDR) confieren especificidad de unión a antígeno al antígeno.

Sin embargo, está bien documentado en la técnica que la presencia de tres CDR del dominio variable de la cadena ligera y tres CDR del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo no es necesaria para la unión al antígeno. Por lo tanto, se sabe que las construcciones más pequeñas que el fragmento de anticuerpo clásico anterior son
15 efectivas.

Por ejemplo, los anticuerpos camélidos tienen un extenso repertorio de unión a antígeno pero carecen de cadenas ligeras. Además, los resultados con anticuerpos de dominio único que comprenden sólo dominios PV o sólo dominios LV muestran que estos dominios pueden unirse al antígeno con afinidades aceptablemente altas. Por lo tanto, tres
20 CDR pueden unirse eficazmente al antígeno.

Por lo tanto, aunque los anticuerpos de la invención comprenden seis regiones CDR (tres de una cadena ligera y tres de una cadena pesada), los anticuerpos con menos de seis regiones CDR (por ejemplo, 3 regiones CDR) también se describen en esta solicitud. Los anticuerpos con CDR de sólo la cadena pesada o la cadena ligera también se
25 describen en esta solicitud.

Las regiones CDR de cadena ligera para su uso junto con las regiones CDR de cadena pesada especificadas se describen en otra parte de esta solicitud. Sin embargo, otras regiones variables de la cadena ligera que comprenden tres CDR para su uso junto con las regiones variables de la cadena pesada de la invención también se describen en
30 esta invención. Un experto en la materia puede identificar fácilmente las regiones variables apropiadas de la cadena ligera que pueden usarse en combinación con las regiones variables de la cadena pesada de la invención y que dan lugar a un anticuerpo que se une a HPA-1a.

Por ejemplo, una región variable de la cadena pesada de la invención se puede combinar con una única región variable de la cadena ligera o un repertorio de regiones variables de la cadena ligera y los anticuerpos resultantes analizados para la unión a HPA-1a.
35

Si se desea, se pueden usar procedimientos similares para identificar regiones variables de cadena pesada alternativas para su uso en combinación con regiones variables de cadena ligera preferidas de la invención.
40

Así, en esta solicitud también se describe un anticuerpo aislado que se une específicamente a HPA-1a y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, donde dicha región variable de cadena ligera comprende:

- 45 (a) una CDR1 ligera variable (LV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma,
(b) una CDR2 LV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, y
(c) una CDR3 LV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga
50 de la misma.

Las secuencias sustancialmente homólogas se definen en otra parte de esta invención. En ciertos ejemplos, la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de CDR dada, o dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que
55 contiene sustituciones de aminoácidos conservadoras de la secuencia de CDR dada. Se aplican otras características y propiedades de otros aspectos de la invención, *mutatis mutandis*, a esta descripción.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio LV que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma). En realizaciones preferidas de la invención, el dominio LV
60 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

También se describe en esta invención un anticuerpo aislado que se une específicamente a HPA-1a y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

- 5 (a) una CDR1 pesada variable (PV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma,
 (b) una CDR2 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, y
 (c) una CDR3 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga
 10 de la misma.

Las secuencias sustancialmente homólogas se definen en otra parte de esta invención. En ciertos ejemplos, la secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de CDR dada, o dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que
 15 contiene sustituciones de aminoácidos conservadoras de la secuencia de CDR dada. Se aplican otras características y propiedades de otros aspectos de la invención, *mutatis mutandis*, a esta descripción.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio PV que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia que tiene al menos
 20 un 80 % de identidad de secuencia con la misma). En realizaciones preferidas de la invención, el dominio PV comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

También se describe en esta invención un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo aislado, más preferiblemente un anticuerpo humano, que se une específicamente a HPA-1a y que tiene la capacidad de competir (es decir, unirse al
 25 mismo o sustancialmente el mismo epítipo que) el anticuerpo 26,4 (es decir, un anticuerpo que comprende el LV de SEQ ID NO: 4 y el PV de SEQ ID NO: 3) como se describe en esta invención, o la capacidad de competir con un anticuerpo que comprende las mismas CDR que 26,4, es decir, un anticuerpo que comprende secuencias LV CDR de SEQ ID NOs: 8, 9 y 10 y secuencias PV CDR de SEQ ID NOs: 5, 6 y 7, para la unión a HPA-1a. Se aplican otras características y propiedades de otros aspectos de la invención, *mutatis mutandis*, a esta descripción.

30 La unión al mismo epítipo/antígeno se puede comprobar fácilmente mediante procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica, p.ej., mediante ensayos de unión, como un ensayo de inhibición competitiva. Por lo tanto, un experto en la materia apreciará que los ensayos de unión pueden usarse para identificar otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con las mismas especificidades de unión que los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos
 35 de la invención. Las modificaciones adecuadas se analizan en otra parte en esta invención.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti-HPA-1a de Tipo II. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención se une a un epítipo en integrina β_3 que no está definida únicamente por el dominio PSI (plexina/semaforina/integrina) de integrina β_3 . En algunas realizaciones, el epítipo en
 40 integrina β_3 a la que se unen los anticuerpos de la invención incluye residuos del dominio PSI (plexina/semaforina/integrina) y, además, incluye residuos del dominio o dominios híbridos y/o del factor de crecimiento epidérmico (FCE) de la integrina β_3 . En algunas realizaciones, el epítipo en integrina β_3 a la que se unen los anticuerpos de la invención incluye residuos del dominio o dominios híbridos y/o del factor de crecimiento epidérmico (FCE) de la integrina β_3 . En el ejemplo 4 se describe un ensayo adecuado para identificar dominios en integrina β_3
 45 que está unida por un anticuerpo.

Preferiblemente, las capacidades y propiedades descritas anteriormente se observan a un nivel medible o significativo y más preferiblemente a un nivel estadísticamente significativo, en comparación con los niveles de control apropiados. Los niveles de significación apropiados se discuten en otra parte de esta invención. Más preferiblemente, una o más
 50 de las capacidades y propiedades descritas anteriormente se observan a un nivel que es mediblemente mejor, o más preferiblemente significativamente mejor, en comparación con las capacidades observadas para los anticuerpos de la técnica anterior.

En cualquier análisis estadístico mencionado aquí, preferiblemente la diferencia estadísticamente significativa sobre un control relevante tiene un valor de probabilidad de $<0,1$, preferiblemente $<0,05$, más preferiblemente $<0,01$. Los procedimientos apropiados para determinar la significación estadística son bien conocidos y documentados en la técnica y se puede usar cualquiera de estos.

En otras realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan anticuerpos de segunda generación que tienen
 60 propiedades mejoradas o superiores en comparación con un anticuerpo anti-HPA-1a original, como 26,4.

Las comparaciones para identificar anticuerpos efectivos de segunda generación se realizan y cuantifican fácilmente,

por ejemplo, mediante uno o más de los diversos ensayos descritos en detalle en esta solicitud o en la técnica. Los anticuerpos de segunda generación que tienen una propiedad o actividad biológica mejorada de al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, y preferiblemente, al menos aproximadamente 50 veces, en comparación con los anticuerpos anti-HPA-1a de la presente invención, como se ejemplifica mediante el anticuerpo 5 26,4, se engloban en la presente invención.

El anticuerpo, la proteína de unión y las moléculas de ácido nucleico de la invención son, por lo general, moléculas «aisladas» o «purificadas» en la medida en que se distinguen de cualquiera de dichos componentes que puedan estar presentes *in situ* dentro de un cuerpo humano o animal o una muestra de tejido derivada de un cuerpo humano o 10 animal. Sin embargo, las secuencias pueden corresponder o ser sustancialmente homólogas a las secuencias que se encuentran en un cuerpo humano o animal. Por lo tanto, el término «aislado» o «purificado», como se usa en el presente documento en referencia a moléculas de ácido nucleico o secuencias y proteínas o polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, se refiere a dichas moléculas cuando se aíslan, purifican o salen de forma sustancial de su entorno natural, p. ej., si se aíslan o purifican del cuerpo humano o animal (si de hecho ocurren naturalmente), o se refiere a 15 tales moléculas cuando se producen mediante un proceso técnico, *es decir*, si incluye moléculas recombinantes y producidas sintéticamente.

Por lo tanto, cuando se usa en conexión con una molécula de proteína o polipéptido tal como CDR de cadena ligera 1, 2 y 3, CDR de cadena pesada 1, 2 y 3, regiones variables de cadena ligera, regiones variables de cadena pesada 20 y proteínas o anticuerpos de unión de la invención, incluidos los anticuerpos de longitud completa, el término «aislado» o «purificado» se refiere típicamente a una proteína sustancialmente sin material celular u otras proteínas de la fuente de la que deriva. En algunas realizaciones, particularmente donde la proteína se va a administrar a humanos o animales, dichas proteínas aisladas o purificadas están sustancialmente libres de medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan 25 químicamente.

El término «secuencia de ácido nucleico» o «molécula de ácido nucleico», como se usa en esta solicitud, se refiere a una secuencia de monómeros de nucleósidos o nucleótidos compuestos de bases naturales, azúcares y enlaces interazúcar (de base). El término también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros 30 no naturales o porciones de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases naturales que incluyan adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Algunos ejemplos de tales bases modificadas incluyen aza- ζ y deaza-adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser bicatenarias o monocatenarias. Las 35 moléculas de ácido nucleico pueden ser total o parcialmente sintéticas o recombinantes.

En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos, más preferiblemente anticuerpos completamente humanos.

El término «humano» como se usa en esta invención, en relación con moléculas de anticuerpo y proteínas de unión, se refiere primero a anticuerpos y proteínas de unión que tienen regiones variables (por ejemplo, P_V, L_V, regiones CDR o de estructura) y, opcionalmente, regiones de anticuerpos constantes, aisladas o derivadas de un repertorio humano o derivadas o correspondientes a secuencias encontradas en humanos, por ejemplo, en la línea germinal humana o células somáticas. El anticuerpo 26,4 es un ejemplo de dicha molécula de anticuerpo humano donde las regiones 40 variables corresponden a secuencias encontradas en un humano.

El término «fragmento», como se usa en esta invención, se refiere a fragmentos de relevancia biológica, *p.ej.*, fragmentos que contribuyen a la unión al antígeno, *p.ej.*, que forman parte del sitio de unión al antígeno y/o contribuyen a la inhibición o reducción de la función del antígeno HPA-1a. Los fragmentos según la invención comprenden una 50 región variable de cadena pesada (dominio P_V) y una región variable de la cadena ligera (dominio L_V) de los anticuerpos de la invención.

Un experto en la materia apreciará que las proteínas y polipéptidos de la invención, tales como las CDR ligeras y pesadas, las regiones variables de cadena ligera y pesada, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos e 55 inmunocombinados, pueden prepararse de varias maneras conocidas y descritas en la técnica, pero es preferible prepararlos usando procedimientos recombinantes.

Los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos de la invención pueden derivarse o producirse mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, mediante 60 clonación o síntesis.

Una vez que se han obtenido los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena ligera

y pesada de los anticuerpos de la invención, estos fragmentos pueden manipularse de forma adicional mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los fragmentos de región variable en moléculas de anticuerpo de longitud completa con dominios de región constante apropiados, o en formatos particulares de fragmento de anticuerpo descritos en otra parte del presente documento, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos 5 scFv, etc. Normalmente, o como parte de este procedimiento de manipulación adicional, los fragmentos de ácido nucleico que codifican las moléculas de anticuerpo de la invención se incorporan generalmente en un vector de expresión apropiado para facilitar la producción de los anticuerpos de la invención.

Los posibles vectores de expresión incluyen, entre otros, cósmidos, plásmidos o virus modificados (*es decir*, retrovirus 10 incapaces de replicarse, adenovirus y virus adenoasociados), siempre que el vector sea compatible con la célula huésped utilizada. Los vectores de expresión son «adecuados para la transformación de una célula huésped», lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas según las células huésped que se usarán para la expresión, que están operativamente unidas a la molécula de ácido nucleico. Unido de forma operativa significa que el ácido nucleico está unido a 15 secuencias reguladoras de forma que permita la expresión del ácido nucleico.

Por lo tanto, la invención contempla un vector de expresión recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

20 Las secuencias reguladoras adecuadas pueden derivar de diversas fuentes, que incluyen genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamíferos o de insectos, y son bien conocidas en la técnica. La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula huésped elegida, como se describe a continuación, y puede ser realizada fácilmente por un experto en la materia. Los ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen: un promotor transcripcional y 25 una secuencia de unión potenciadora o de ARN polimerasa, una secuencia de unión ribosómica, que incluye una señal de inicio de traducción. Además, dependiendo de la célula huésped elegida y el vector empleado, se pueden incorporar al vector de expresión otras secuencias, como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de transcripción.

30 Los vectores de expresión recombinantes de la invención también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilita la selección de células huésped transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden contener genes que codifican una porción de fusión que 35 proporciona una mayor expresión de la proteína recombinante; un aumento de la solubilidad de la proteína recombinante; y ayuda en la purificación de la proteína recombinante diana mediante la actuación como ligando en la purificación por afinidad (por ejemplo, pueden estar presentes «etiquetas» apropiadas para permitir la purificación y/o identificación, por ejemplo, etiquetas His o etiquetas myc).

40 Los vectores de expresión recombinantes pueden introducirse en células huésped para producir una célula huésped transformada. Los términos «transformado con», «transfectado con», «transformación» y «transfección» pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante una de las muchas técnicas posibles conocidas en la técnica. Se pueden encontrar procedimientos adecuados para transformar y transfectar células huésped en Sambrook *et al.*, 1989 (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 45 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros libros de texto de laboratorio.

Entre las células huésped adecuadas se incluye una amplia variedad de células huésped eucariotas y células procariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden expresarse en células de levadura o células de mamífero. Las células HEK 293E son particularmente preferidas. Además, las proteínas de la invención pueden 50 expresarse en células procariotas, tales como *Escherichia coli*.

Dadas las enseñanzas proporcionadas en esta invención, los promotores, terminadores y procedimientos para introducir vectores de expresión de un tipo apropiado en células de plantas, aves e insectos también se pueden realizar fácilmente.

55 De forma alternativa, las proteínas de la invención también pueden expresarse en animales transgénicos no humanos tales como ratas, conejos, ovejas y cerdos.

Las proteínas de la invención también pueden prepararse mediante síntesis química usando técnicas bien conocidas 60 en la química de proteínas tales como la síntesis en fase sólida.

Las proteínas de fusión N-terminal o C-terminal que comprenden los anticuerpos y proteínas de la invención

conjugados con otras moléculas, como proteínas, se pueden preparar con fusión mediante técnicas recombinantes. Las proteínas de fusión resultantes contienen un anticuerpo o proteína de la invención fusionada a la proteína seleccionada o proteína marcadora, o proteína de etiqueta como se describe en esta invención. Los anticuerpos y proteínas de la invención también pueden conjugarse con otras proteínas mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, las proteínas pueden acoplarse usando conectores heterobifuncionales que contienen tiol, como se describe en WO 90/10457, N-succinimidil-3- (2-piridilditio-propionato) o N-succinimidil-5 tioacetato.

En esta solicitud se describe una construcción de expresión o vector de expresión que comprende uno o más de los fragmentos de ácido nucleico o segmentos o moléculas de la invención. Preferiblemente, las construcciones o vectores de expresión son recombinantes. Preferiblemente, dichas construcciones o vectores comprenden además las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteínas codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

en esta invención se describe una célula huésped o virus que comprende una o más construcciones de expresión o vectores de expresión de la invención. También se describen en esta invención células huésped o virus que comprenden una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención. En esta solicitud también se describe una célula huésped o virus que expresa un anticuerpo de la invención. Las células huésped adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células HEK293E.

En esta solicitud se describe un procedimiento para producir un anticuerpo de la presente invención que comprende una etapa de cultivo de las células huésped de la invención. Según la presente invención, un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención comprende las etapas de (i) cultivar una célula huésped que comprende uno o más de los vectores de expresión recombinantes o una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o proteína codificado; y (ii) aislar u obtener el anticuerpo o la proteína de la célula huésped o del medio de crecimiento/sobrenadante. Tales procedimientos de producción también pueden comprender una etapa de purificación del anticuerpo o producto proteico y/o formular el anticuerpo o producto en una composición que incluya al menos un componente adicional, tal como un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones en las que el anticuerpo o proteína de la invención está formado por más de una cadena de polipéptidos (por ejemplo, ciertos fragmentos tales como fragmentos Fab), entonces todos los polipéptidos se expresan preferiblemente en la célula huésped, ya sea del mismo vector de expresión o de uno diferente, de modo que las proteínas completas, por ejemplo, proteínas de unión de la invención, puedan ensamblarse en la célula huésped y aislarse o purificarse a partir de ella.

También se describe en esta solicitud un procedimiento para unir HPA-1a, que comprende poner en contacto una composición que comprende HPA-1a con un anticuerpo de la invención, o un inmunocombinado del mismo.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar HPA-1a, que comprende poner en contacto una composición sospechosa de contener HPA-1a con el anticuerpo de la invención en condiciones efectivas para permitir la formación de complejos HPA-1a/anticuerpo y detectar los complejos así formados.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para producir anticuerpos adicionales que se unen a HPA-1a. Dichos usos implican, por ejemplo, la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo original para formar un nuevo anticuerpo, donde dicho anticuerpo original es uno de los anticuerpos de la invención como se define en otra parte de esta solicitud y comprobar el nuevo anticuerpo resultante para identificar anticuerpos que se unen a HPA-1a. Dichos procedimientos se pueden usar para formar múltiples anticuerpos nuevos en los que se puede evaluar su capacidad para unirse a HPA-1a. Preferiblemente, dicha adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos tiene lugar en uno o más de los dominios CDR.

Dicha modificación o mutación a un anticuerpo parental puede llevarse a cabo de cualquier manera apropiada usando técnicas bien conocidas y documentadas en la técnica, por ejemplo llevando a cabo procedimientos de mutagénesis aleatoria o dirigida. Si se va a utilizar la mutagénesis dirigida, una estrategia para identificar los residuos apropiados para la mutagénesis utiliza la resolución de la estructura cristalina del complejo proteína-antígeno de unión, por ejemplo, el complejo Ab-Ag, para identificar los residuos clave involucrados en la unión al antígeno. Posteriormente, esos residuos pueden mutarse para mejorar la interacción. Alternativamente, uno o más residuos de aminoácidos se pueden dirigir simplemente a la mutagénesis dirigida y evaluar el efecto sobre la unión a HPA-1a.

La mutagénesis aleatoria puede llevarse a cabo de cualquier manera apropiada, por ejemplo, mediante PCR propensa a errores, aleatorización de cadena o cepas de *E. coli* mutantes.

Por lo tanto, uno o más de los dominios P_V de la invención se pueden combinar con un solo dominio L_V o un repertorio de dominios L_V de cualquier fuente apropiada y los nuevos anticuerpos resultantes comprobados para identificar anticuerpos específicos para HPA-1a. Por otro lado, uno o más de los dominios L_V de la invención se pueden combinar con un solo dominio P_V o un repertorio de dominios P_V de cualquier fuente apropiada y los nuevos anticuerpos resultantes comprobados para identificar anticuerpos específicos para HPA-1a.

Del mismo modo, una o más, o preferiblemente las tres CDR de los dominios P_V y/o L_V de la invención pueden injertarse en un solo dominio P_V y/o L_V o un repertorio de dominios P_V y/o L_V, según corresponda, y los nuevos anticuerpos resultantes comprobados para identificar anticuerpos que se unan a HPA-1a.

10

Los procedimientos para llevar a cabo la manipulación de aminoácidos y dominios de proteínas descritos anteriormente son bien conocidos para un experto en la materia. Por ejemplo, dichas manipulaciones podrían llevarse a cabo convenientemente mediante ingeniería genética al nivel del ácido nucleico donde las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de unión apropiadas y los dominios de las mismas se modifican de modo que la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada resultante se modifica a su vez de la manera apropiada.

15

Los nuevos anticuerpos producidos por estos procedimientos tendrán preferiblemente propiedades funcionales mejoradas, por ejemplo, una afinidad mayor o mejorada (o al menos una afinidad equivalente) por HPA-1a como los anticuerpos parentales, y pueden tratarse y usarse de la misma manera que los anticuerpos de la invención como se describe en otra parte en esta solicitud (por ejemplo, para terapia, diagnóstico, en composiciones, etc.). Alternativamente, o adicionalmente, los anticuerpos nuevos tendrán una o más propiedades funcionales mejoradas como se describe en otra parte de esta invención.

20

Los nuevos anticuerpos producidos, obtenidos u obtenibles por estos procedimientos también se describen en esta solicitud. Los nuevos anticuerpos, que tienen las características de los anticuerpos de la invención, que se producen u obtienen mediante estos procedimientos forman realizaciones adicionales de la invención.

25

La prueba de la capacidad de uno o más anticuerpos para unirse a HPA-1a puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento apropiado, que son bien conocidos y descritos en la técnica. Los procedimientos adecuados también se describen en la sección de Ejemplos.

30

La invención también proporciona un hibridoma que secreta el anticuerpo 26,4 (por ejemplo, el hibridoma DL18BL26.4H descrito en la sección de Ejemplos). En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo secretado por dicho hibridoma (o un anticuerpo que compite con dicho anticuerpo para unirse a HPA-1a).

35

La invención también proporciona una gama de anticuerpos conjugados y fragmentos de los mismos en los que el anticuerpo anti-HPA-1a de la invención está fijado operativamente a al menos otro agente terapéutico o de diagnóstico. El término «inmunoconjugado» se usa ampliamente para definir la asociación funcional del anticuerpo con otro agente efectivo y no pretende referirse únicamente a cualquier tipo de asociación funcional, y no está particularmente limitado a la «conjugación» química. Se contemplan particularmente las proteínas de fusión recombinantes. Siempre que el agente de administración o direccionamiento pueda unirse al objetivo y el agente terapéutico o de diagnóstico sea lo suficientemente funcional tras el parto, el modo de unión será adecuado.

40

La invención también proporciona un anticuerpo de la invención acoplado a un soporte sólido (por ejemplo, una microesfera).

45

Las formulaciones (composiciones) que comprenden uno o más anticuerpos de la invención mezclados con un diluyente, portador o excipiente adecuado constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Dichas formulaciones pueden ser para uso farmacéutico. Los diluyentes, excipientes y vehículos adecuados resultarán conocidos para el experto.

50

Las composiciones según la invención pueden presentarse, por ejemplo, en una forma adecuada para la administración oral, nasal, parenteral, intravenosa, tópica o rectal.

Los compuestos activos definidos en esta invención pueden presentarse en las formas farmacológicas convencionales de administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, aerosoles nasales, soluciones, emulsiones, liposomas, polvos, cápsulas o formas de liberación sostenida. Se pueden emplear excipientes farmacéuticos convencionales, así como los procedimientos habituales de producción, para la preparación de estas formas.

55

Las soluciones de inyección pueden, por ejemplo, producirse de manera convencional, como mediante la adición de agentes de conservación, tales como p-hidroxibenzoatos, o estabilizadores, tales como EDTA. A continuación, las soluciones se introducen en viales o ampollas de inyección.

60

Los aerosoles nasales pueden formularse de manera similar en solución acuosa y envasarse en recipientes de pulverización, ya sea con un propulsor de aerosol o provistos de medios para la compresión manual.

- 5 Las composiciones farmacéuticas (formulaciones) de la presente invención se administran preferiblemente por vía parenteral. La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser un polvo o un líquido para la administración del péptido en forma de aerosol nasal o pulmonar. Como otra opción adicional, los anticuerpos de la invención también se pueden administrar por vía transdérmica, por ejemplo, desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o transmucosalmente, por ejemplo, bucalmente.

- 15 Las unidades de dosificación que contienen los anticuerpos contienen preferiblemente 0,1-10 mg, por ejemplo 1-5 mg del agente activo. Otras dosis útiles incluyen, pero no se limitan a, dosis que alcanzan una concentración plasmática de 0,1 a 1 UI/ml, por ejemplo 0,5 UI/ml (0,08 µg/ml). Dicha dosis de 0,5 UI/ml (0,08 µg/ml) se puede lograr mediante la administración intravenosa de 2.000 UI.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente más ingredientes activos, como ya se ha descrito anteriormente en el contexto de regímenes de administración conjunta.

- 20 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona los anticuerpos anti-HPA-1a de la invención para su uso en terapia, en particular para su uso en el tratamiento o profilaxis de TFNA. Por lo tanto, la terapia incluye tratamiento profiláctico.

- 25 Las mujeres HPA-1a negativas (es decir, HPA-1bb) pueden producir anticuerpos anti-HPA-1a como resultado de la inmunización con HPA-1a en relación con un embarazo no compatible (es decir, un embarazo con un feto HPA-1a positivo). Dichos anticuerpos anti-HPA-1a producidos por la madre atraviesan la placenta, se unen a las plaquetas fetales y pueden acelerar la destrucción de las plaquetas, provocando así TFNA.

- 30 Sin limitarse a la teoría, se cree que los anticuerpos de la presente invención administrados a una mujer aloinmunizada de este tipo cruzan la placenta y compiten con los anticuerpos maternos HPA-1a para unirse a las plaquetas fetales, reduciendo así la destrucción de plaquetas y, por lo tanto, tratando la TFNA.

- 35 En el contexto del tratamiento con TFNA, preferiblemente, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o eliminada. Por ejemplo, la porción Fc de una inmunoglobulina (Ig) puede modificarse (o eliminarse) para reducir/eliminar la función efectora. Los procedimientos para hacerlo son conocidos en la técnica. Preferiblemente, en el contexto del tratamiento con TFNA, el anticuerpo tiene una porción Fc que favorece la transferencia placentaria y que tiene mutaciones que disminuyen (o eliminan) sus propiedades destructivas de plaquetas (por ejemplo, como se describe en Mathiesen et al., Blood (2013) 122(7):1174-81).

- 40 En el contexto del tratamiento con TFNA, ciertos sujetos preferidos para la administración con un anticuerpo de la invención son aquellos que se sabe que portan un feto que ya padece TFNA, según lo determinado, por ejemplo, por un recuento de plaquetas en el feto.

- 45 Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse para impedir la TFNA, es decir, pueden usarse en tratamientos profilácticos. En ciertas realizaciones de dichos tratamientos profilácticos, los anticuerpos de la invención se pueden administrar a una mujer que ya está embarazada, preferiblemente a una mujer embarazada que se sabe que es HPA-1a negativa, más preferiblemente una mujer que ya está embarazada con un embarazo incompatible (es decir, la madre es HPA-1a negativa y el feto es HPA-1a positivo).

- 50 Se ha encontrado que la aloinmunización con HPA-1a también puede ocurrir en relación con el parto de un feto no compatible (bebé). La estimulación con HPA-1a en el momento del parto puede ser el primer estímulo de HPA-1a que recibe la madre (es decir, puede no haber aloinmunización durante el embarazo). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se administran a la madre durante el parto o poco después del parto, preferiblemente dentro de las 72 horas posteriores al parto.

- 60 Sin limitarse a la teoría, los anticuerpos anti-HPA-1a de la presente invención administrados a una madre en relación con el parto (o de otro modo con riesgo de aloinmunización) se unirían a HPA-1a en plaquetas fetales (para bebés) HPA-1a positivas que entran en la circulación materna y destruirían las plaquetas HPA-1a positivas, evitando así la estimulación del sistema inmune de la madre por las plaquetas portadoras de HPA-1a del feto/bebé. En consecuencia, se impide la aloinmunización y no se produce TFNA. Un mecanismo análogo impide la aloinmunización en relación con los trofoblastos fetales u otro material de trofoblasto que ingresa en la circulación materna.

Como ya se ha descrito, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-HPA-1a de la presente invención tienen la capacidad de inhibir la unión del anticuerpo anti-HPA-1a SZ21 a la integrina $\alpha V\beta 3$. Sin limitarse a la teoría, la capacidad de un anticuerpo de la invención para unirse de manera estable a la integrina $\alpha V\beta 3$ y para ser capaz de inhibir la unión de otros anticuerpos anti-HPA-1a a la integrina $\alpha V\beta 3$ indica que dichos anticuerpos tendrían utilidad en la prevención de aloinmunización en relación con trofoblastos fetales u otro material de trofoblasto que ingresa en la circulación materna.

En el caso de que se impida la aloinmunización en relación con el parto, se puede proteger un embarazo posterior no compatible de la TFNA.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención también proporciona los anticuerpos anti-HPA-1a de la invención para su uso en la prevención de la aloinmunización con HPA-1a en un sujeto.

Ghevaert et al. (Blood, 122: 313-320 (2013)) analiza el uso de un anticuerpo anti-HPA-1a en el tratamiento y la profilaxis de TFNA. Este artículo de Ghevaert *et al.* se refiere al anticuerpo B2G1.

En algunas realizaciones, particularmente en el contexto de la profilaxis de TFNA, los anticuerpos anti-HPA-1a IgG están preferiblemente glicosilados. En algunas realizaciones, particularmente en el contexto de la profilaxis de TFNA, los anticuerpos IgG anti-HPA-1a, preferiblemente, no están fucosilados (es decir, preferiblemente no están modificados con un grupo fucosa).

Los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente a HPA-1a (es decir, no reaccionan de forma cruzada con el aloantígeno HPA-1b). Por lo tanto, los anticuerpos de la invención se pueden usar para determinar si un sujeto (preferiblemente un sujeto femenino) es HPA-1a positivo o HPA-1a negativo.

Según esto, en otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para analizar la presencia o ausencia de HPA-1a en una muestra (preferentemente una muestra que contenga plaquetas) que se ha obtenido de un sujeto, y dicho procedimiento comprende las etapas de

- (a) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo de la invención que se une específicamente a HPA-1a; y
- (b) analizar la presencia o ausencia de complejos de anticuerpos anti-HPA-1a-HPA-1a (antígeno).

La presencia de complejos de anticuerpos anti-HPA-1a-HPA-1a (antígeno) indica la presencia de HPA-1a en la muestra. La ausencia de complejos de anticuerpos anti-HPA-1a-HPA-1a (antígeno) indica la ausencia de HPA-1a en la muestra. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para fenotipar HPA-1. Los procedimientos adecuados para analizar (es decir, determinar) la presencia de complejos de anticuerpo HPA-1a-HPA-1a (antígeno) son conocidos en la técnica. En una realización, se usa citometría de flujo sanguíneo completo, y preferiblemente en tales realizaciones un anticuerpo de la invención (por ejemplo, una forma IgG₁ del mismo) se conjuga con un colorante fluorescente. En algunas realizaciones, toda la sangre es sangre periférica, preferiblemente obtenida de sujetos no más de 10 días antes de su uso. En algunas realizaciones, se usa citometría de sangre completa según los ejemplos experimentales de esta invención.

Se puede usar un procedimiento para analizar la presencia o ausencia de HPA-1a en una muestra como ya se ha descrito anteriormente para identificar a las mujeres que podrían beneficiarse de los tratamientos profilácticos descritos en esta solicitud.

Varios estudios prospectivos descubrieron que los altos niveles de anticuerpos maternos anti-HPA-1a se correlacionan con un recuento bajo de plaquetas en el recién nacido. Por lo tanto, la cuantificación de anticuerpos anti-HPA-1a puede usarse como factor predictivo del grado de trombocitopenia en el recién nacido. El Instituto Nacional de Estándares y Control Biológico (NIBSC) preparó el material de referencia utilizado actualmente para la cuantificación de anticuerpos anti-HPA-1a. Este estándar NIBSC contiene plasma de seis donantes inmunizados con HPA-1a y su suministro depende de la disponibilidad de dichos donantes. Reemplazar sueros policlonales con un anticuerpo recombinante proporcionaría una fuente relativamente barata, estandarizada, altamente específica e ilimitada de anticuerpo anti-HPA-1a para usar como reactivo de referencia de control.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona el uso *in vitro* de un anticuerpo de la presente invención como estándar de referencia para cuantificar anticuerpos anti-HPA-1a (producidos por la madre) en una muestra (p.ej. sangre completa o una muestra de plasma). Preferiblemente, dicho estándar de referencia se usa en un ensayo MAIPA (inmovilización de antígenos plaquetarios con el empleo de anticuerpos monoclonales) para cuantificar los anticuerpos anti-HPA-1a en una muestra.

También se describe en esta invención un procedimiento para tratar o impedir la TFNA, procedimiento que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo de la invención como se define en esta solicitud.

- 5 Se determinará una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva en función de la evaluación clínica y se podrá controlar fácilmente.

También se describe en esta invención el uso de un anticuerpo de la invención como se define en esta invención en la fabricación de un medicamento para tratar o impedir la TFNA.

10

Los sujetos tratados según la presente invención serán preferiblemente humanos, más preferiblemente mujeres humanas (por ejemplo, mujeres embarazadas).

- 15 Las composiciones y procedimientos y usos de la presente invención pueden usarse en combinación con otras terapias y diagnósticos. En términos de agentes biológicos, preferiblemente agentes de diagnóstico o terapéuticos, para usar «en combinación» con un anticuerpo anti-HPA-1a según la presente invención, el término «en combinación» se usa sucintamente para cubrir un rango de realizaciones. La terminología «en combinación», a menos que se indique específicamente lo contrario o se aclare a partir de la terminología científica, por lo tanto, se aplica a varios formatos de composiciones combinadas, productos farmacéuticos, cócteles, kits, procedimientos y primeros y segundos usos
20 médicos.

- 25 Las realizaciones «combinadas» de la invención, por lo tanto, incluyen, por ejemplo, donde el anti-HPA-1a de la invención es un anticuerpo desnudo y se usa en combinación con un agente o agente terapéutico que no está unido operativamente al mismo. En otras realizaciones «combinadas» de la invención, el anticuerpo anti-HPA-1a de la invención es un inmunoconjugado donde el propio anticuerpo está asociado operativamente o combinado con el agente o agente terapéutico. La unión operativa incluye todas las formas de unión directa e indirecta, como se describe en esta invención y se conoce en la técnica.

- 30 También se describen en esta invención kits que comprenden uno o más de los anticuerpos, inmunoconjugados o composiciones de la invención o una o más de las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, o uno o más vectores de expresión recombinante que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la invención, o una o más células huésped o virus que comprenden los vectores de expresión recombinante o secuencias de ácido nucleico de la invención. Preferiblemente, dichos kits se usan en los procedimientos y formas que se describen en esta invención, por ejemplo, los procedimientos terapéuticos, de diagnóstico o de imagen como se describen en esta invención, o se usan en los ensayos o procedimientos *in vitro* como se describe en esta invención.
35 El anticuerpo en dichos kits puede ser preferiblemente un conjugado de anticuerpos como se describe en otra parte de esta invención, por ejemplo, se puede conjugar con una porción detectable o puede ser un conjugado inmune. Preferiblemente, dichos kits comprenden instrucciones para el uso de los componentes del kit, por ejemplo en el diagnóstico. Preferiblemente, dichos kits son para diagnosticar o tratar enfermedades como se describe en otro lugar
40 en esta invención, y opcionalmente comprenden instrucciones para el uso de los componentes del kit para diagnosticar o tratar dichas enfermedades.

- 45 Los anticuerpos de la invención como se definen en esta solicitud también pueden usarse como herramientas moleculares para aplicaciones y ensayos *in vitro* o *en vivo*. Como los anticuerpos tienen un sitio de unión a antígeno, estos pueden funcionar como miembros de pares de unión específicos y estas moléculas se pueden usar en cualquier ensayo donde se requiera el miembro de par de unión particular.

- 50 En esta solicitud se describe un reactivo que comprende un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento y el uso de tales anticuerpos como herramientas moleculares, por ejemplo en ensayos *in vitro* o *en vivo*.

TABLA DE SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DESCRITOS AQUÍ Y SUS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA (SEQ ID NO)

Todas las secuencias de nucleótidos se mencionan esta solicitud 5' a 3' según la convención de este campo técnico.

Tabla 1		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Anticuerpo 26,4		
1	Dominio PV (nt)	caggtagcagttgcagcagtcaggccaggactgggaagccctcg cagaccctgtcactcacctgtgccatctccggggacagtgtagca gcaacagtgctgcttggactggatcaggcagtcacccatcgagag gccttgagtggtgggaaggacatactcaggccaactggtacaa tgattatgcagcatctgtgaaaagtcgaataaccatcaaccaagac acatccaagaaccagctctccctgcagctgaactctgtgactccc aggacacggctatgtattactgtcaagagatggggcctgggtg gcagcagctggggccaggcctcctcaccactactctgtgatg gacgtctggggccaggggaccacgggcaccgtctctca
2	Dominio LV (nt)	gaaattgtgtgacacagtcctccagccaccctgtcattgtctccagg ggaaagagccaccctctctgcagggccagtcagagtgtagca gctactagcctggtaccaacagaagcctggccaggctcccaggc tctcatctatgatgatccaaaaggccactggcatccagccag gtcagtgccagtggtctgggacagactcagctcaccatcaga agcctcgagcctgaagatttgcagtttactgtcaacagcgtagc gactggcagggactcacttccggcggagggaaccaaggtggagat caaa
3	Dominio PV (aa)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTSLTCAISGDSVSSNS AAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYFRSNWYNDYA ASVKSRLINQDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAMYY CARDGAWGGSSWWPGLPHHHYSGMDVWQG GTTVTVSS
4	Dominio LV (aa)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGS GTFSLTIRSLPEPDAFVYYCQQRSDWQGLT FGGGTKVEIK
5	CDR1 pesado	GDSVSSNSAA
6	CDR2 pesado	TYFRSNWYN
7	CDR3 pesado	ARDGAWGGSSWWPGLPHHHYSGMDV
8	CDR1 ligero	QSVSSY
9	CDR2 ligero	DAS
10	CDR3 ligero	QQRSDWQGLT
11	FR1 pesado	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTSL TCAIS
12	FR2 pesado	WNWIRQSPSRGLEWLG
13	FR3 pesado	DYAASVKSRLINQDTSKNQLSLQLNSVTPEDTA MYYC
14	FR4 pesado	WGQGTTVTVSS
15	FR1 ligero	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS
16	FR2 ligero	LAWYQQKPGQAPRLLIY
17	FR3 ligero	KRATGIPARFSGSGSGTDFSLTIRSLPEPDAFVY YC
18	FR4 ligero	FGGGTKVEIK

Tabla 1		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Anticuerpo 26,4		
19	Cadena pesada IgG1 (nt)	<p> CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGGG CTGGTGAAGCCTAGCCAGACCCTGTCCCTGA CATGCGCCATCTCAGGCGACAGCGTGAGCTC CAACTCTGCCGCTTGAATTGGATTAGACAGA GCCCATCCCGCGGGCTGGAGTGGCTGGGAC GGACCTACTTCAGAAGCAACTGGTACAATGAC TATGCCGCTTCCGTGAAGTCTCGGATCACCAT TAACCAGGATACATCTAAAATCAGCTGAGTC TGCAGCTGAACTCAGTGACTCCCGAAGACAC CGCCATGTA CTATTGTGCTAGGGATGGCGCTT GGGGCGGGTCTAGTTGGTGGCCAGGACTGC CCCACCATTACTATAGCGGCATGGACGTGTG GGGACAGGGCACCACAGTGACAGTGTCAAGC GCCAGCACTAAGGGCCCTCCGTGTTTTCTCT GGCTCCATCCTCTAAATCTACAAGTGGAGGCA CTGCCGCTCTGGGGTGTCTGGTGAAGGATTA TTTCCCTGAGCCAGTGACTGTGAGTTGGA CAGGCGCCCTGACTAGCGGGGTGCACACCTT TCCCGCTGTGCTGCAGAGTTCAGGGCTGTAC AGCCTGAGCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTA GTTCACTGGGAACTCAGACCTATATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCTTCTAATAAAAAGTGGA CAAGAAAAGTGGAGCCAAAGAGTTGTGATAAAA CACATACTTGCCCTCCCTGCCCTGCCCTGAA CTGCTGGGCGGCCAAGCGTGTTCTGTTTC CACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGATTAGC CGGACTCCGGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAT AATGCCAAGACCAAACCACGGGAGGAACAGT ACAACTCTACATATAGAGTGGTGAAGTGTGCTG ACTGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGGA AAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCC CTGCCTGCTCCAATCGAGAAAACCATTTCCAA GGCCAAAGGACAGCCCAGGGAACCTCAGGTG TACACACTGCCCCCTAGTCGCGACGAGCTGA CTAAGAACCAGGTGTCTCTGACCTGTCTGGT AAAGGCTTCTATCCATCCGATATCGCTGTGGA GTGGGAATCTAATGGGCAGCCCGAAAACAAT TACAAGACCACACCACCGTGCTGGACAGCG ATGGATCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACT GTGGACAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTC TGTCACCCGGGAAATGA </p>

Tabla 1		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Anticuerpo 26,4		
20	Cadena ligera IgG1 (kappa) (nt)	GAGATCGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCC TGTCCCTGTCTCCAGGAGAACGGGCCACTCT GTCTTGCAGAGCTAGTCAGTCAGTGAGCTCCT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACA GGCTCCCCGGCTGCTGATCTACGACGCCTCC AAAAGGGCTACAGGCATTCCCGCTCGCTTCA GCGGCTCCGGGTCTGGAACAGATTTTTCCCT GACTATCAGAAGCCTGGAGCCTGAAGACTTC GCCGTGTACTATTGCCAGCAGAGATCTGATTG GCAGGGGCTGACCTTTGGCGGGGGAACAAA GGTGGAGATCAAAAGGACCGTGGCCGCTCCA AGCGTGTTTCATCTTTCCCCCTAGCGACGAACA GCTGAAGTCAGGGACAGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAATTTCTACCCCCGCGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCTCTGCA GAGTGGAAATTCACAGGAGAGCGTGA CTGAA CAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGTC TAGTACCCTGACACTGAGCAAAGCCGACTAC GAGAAGCACAAAGTGTATGCTTGCGAAGTGA CACATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACTAA GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTGA
21	Cadena pesada IgG1 (aa)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNS AAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYFRSNWYNDYA ASVKSRLINQDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAMYY CARDGAWGGSSWWPGLPHHYSGMDVWGG GTTTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
22	Cadena ligera IgG1 (kappa) (aa)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGS GTD FSLTIRSLPEPDAVYYCQQRSDWQGLTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

Tabla 1		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Anticuerpo 26,4		
23	Cadena pesada IgG3 (nt)	<p> CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGGCCAGGA CTGGTGAAACCCTCACAGACACTGAGCCTGA CTTGTGCCATCAGTGGCGATTGAGGCTC CAACAGCGCCGCTTGAATTGGATTAGGCAG AGTCCTTCACGCGGACTGGAATGGCTGGGCC GGACCTACTTCAGATCCAATGGTACAATGAC TATGCCGCCAGCGTGAAGTCCCGGATCACAA TTAACCAGGATACTTCCAAAAATCAGCTGTCT CTGCAGCTGAACAGTGTGACCCAGAGGACA CAGCCATGTAATGCGCCAGAGATGGGGC TTGGGGCGGGTCTAGTTGGTGGCCAGGCCTG CCCACCACTACTATAGCGGGATGGACGTGT GGGGACAGGGAACCACAGTGACCGTGAGCA GCGCCTCAACCAAGGGCCTAGCGTGTTC TCTGGCTCCATGCAGCAGGTCCACTTCTGGA GGCACCGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGG ACTATTTCCCGAACCTGTGACCGTGTCTTGG AACAGTGGGGCCCTGACCTCTGGAGTGCACA CATTTCGCGTGTGCTGCAGTCTCTGGACTG TACAGCCTGAGTTCAGTGGTGACCGTGCCAA GCTCCTCTCTGGGCACACAGACTTATACCTGT AACGTGAATCACAAGCCAGCAATACAAAGGT GGACAAACGGGTGGAGCTGAAAACACCTCTG GCGGATACTACCCATACTTGCCACGCGTGC CAGAGCCCAAAAGCTGTGACACCCCTCCCCC ATGCCCAAGATGTCCTGAACCAAAATCTTGTG ATACACCCCTCCATGCCCTAGGTGTCCCGA GCCTAAGAGTTGTGACACTCCCCCTCCATGTC CTAGATGTCCTGCTCCGGAAGTGTGGGCGG TCCGAGCGTGTTCCTGTTCCCGCCGAAACCG AAAGATAACCCTGATGATTAGTCGCACGCCGG AAGTTACCTGCGTGGTTGTGGATGTGAGCCAT GAAGACCCGGAAGTTCAGTTTAAATGGTATGT GGATGGTGTGAAGTGCACAACGCAAAAACC AAACCGCGTGAAGAACAGTACAATAGCACGTT CCGCGTTGTGTCTGTTCTGACCGTGCTGCATC AGGATTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAATGT AAAGTTTCTAACAAGCACTGCCGGCGCCGAT TGAAAAACGATCAGTAAAACCAAGGGTCAGC CGCGTGAACCGCAGGTGTACACCCTGCCGCC GAGCCGTGAAGAAATGACGAAAAACCAAGTTA GTCTGACCTGCCTGGTGAAAGGCTTTTACCC GAGCGATATTGCAGTGAATGGGAAAGCTCT GGTGAGCCGAAAAACAATTATAATACCACGCC GCCGATGCTGGATAGTGTGAGCAGCTTTTTCC TGTATAGTAAACTGACCGTTGATAAAAGCCGT TGGCAGCAGGGTAACATCTTTAGTTGCAGCGT GATGCATGAAGCGCTGCACAATCGCTTACC CAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCGGGCAAAG GTAATAA </p>

Tabla 1		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Anticuerpo 26,4		
24	Cadena ligera IgG3 (kappa) (nt)	GAGATCGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCC TGTCCCTGTCTCCAGGAGAACGGGCCACTCT GTCTTGCAGAGCTAGTCAGTCAGTGAGCTCCT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACA GGCTCCCCGGCTGCTGATCTACGACGCCTCC AAAAGGGCTACAGGCATTCCCGCTCGCTTCA GCGGCTCCGGGTCTGGAACAGATTTTTCCCT GACTATCAGAAGCCTGGAGCCTGAAGACTTC GCCGTGTACTATTGCCAGCAGAGATCTGATTG GCAGGGGCTGACCTTTGGCGGGGGAACAAA GGTGGAGATCAAAAGGACCGTGGCCGCTCCA AGCGTGTTTCATCTTTCCCCCTAGCGACGAACA GCTGAAGTCAGGGACAGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAATTTCTACCCCCGCGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCTCTGCA GAGTGGAAATTCACAGGAGAGCGTGAAGTAA CAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGTC TAGTACCCTGACACTGAGCAAAGCCGACTAC GAGAAGCACAAAGTGTATGCTTGCGAAGTGA CACATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACTAA GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTGA
25	Cadena pesada IgG3 (aa)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNS AAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYFRSNWYNDYA ASVKSRLINQDTSKNQLSLQLNSVTPEDTAMYY CARDGAWGGSSWWPGLPHHYSGMDVWQG GTTTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPS NTKVDKRVELKTPLDGTTHTCPRCPEPKSCDTP PPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPP CPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPEN NYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNI FSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGG
26	Cadena ligera IgG3 (kappa) (aa)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGS GTDFTLIRSLPEPDFAVYYCQQRSDWQGLTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

Las secuencias de ácido nucleico de IgG establecidas en la Tabla anterior están optimizadas para la expresión en células HEK.

5

A continuación se describirá la invención de forma adicional en los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos:

Figura 1. Aislamiento de linfoblastos B específicos de HPA-1a. (A) Las células CD22 positivas se aislaron

mediante MACS de PBMC de una mujer aloinmunizada HPA-1a y se marcaron con anticuerpos IgM, IgA e IgD anti-humanos conjugados con FITC. La población CD22⁺IgM⁻IgD⁻IgA⁻ (cerrada, 5,6 % de CD22⁺ Células B), las células B de memoria la IgG⁺, fueron identificadas y aisladas mediante FACS. (B) Las plaquetas HPA-1a positivas se marcaron con CFSE, se incubaron con linfoblastos B del cultivo de linfoblastos B que secretaban anticuerpos anti-HPA-1a y linfoblastos B unidos a plaquetas (cerrada, 2 % de linfoblastos B CD45⁺) se aislaron individualmente mediante FACS en microplacas con fondo en U de 96 pocillos. Los resultados que se muestran son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 2. Unión de mAb 26,4 a antígenos HPA-1 en plaquetas intactas. (A) Unión de 26,4 a plaquetas HPA-1aa y HPA-1bb analizadas por citometría de flujo. Las plaquetas se incubaron con sobrenadante de cultivo celular 26,4 o medio como un control negativo. Se usó IgG antihumana conjugada con FITC para detectar IgG unida a plaquetas. Los resultados se presentan como una superposición de histogramas: número relativo de células trazadas contra la intensidad de fluorescencia. (B) El 26,4 se probó contra plaquetas HPA-1aa y HPA-1bb en el ensayo MAIPA. Se usó suero normal como control negativo. Las muestras se pasaron por duplicado. Se presentan los valores promedio de absorbancia después de la sustracción del fondo. Los resultados que se muestran son representativos de al menos tres experimentos independientes. El linfoblasto B y el hibridoma derivaron 26,4, y las IgG1 e IgG3 recombinantes 26,4 tuvieron un rendimiento similar.

Figura 3. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del mAb 26,4. Regiones V de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de línea germinal más homólogas. Analizado por IMGT/V-QUEST.

Figura 4. Análisis SPR de la unión de mAb a antígenos HPA-1. Sensogramas generados por la unión de IgG1 26,4 (a) y SZ21 (b) al α IIb β 3 que lleva los antígenos HPA-1a (línea negra) o HPA1b (línea discontinua) inmovilizados en la superficie del chip del sensor. Los anticuerpos se usaron a una concentración de 20 μ g/ml.

Figura 5. Análisis SPR de la unión de mAb a HPA-1a en α IIb β 3 y α V β 3. Sensogramas generados por la unión de IgG1 26,4 (línea negra) y B2G1 (discontinua) a HPA-1a en α IIb β 3 (a) y α V β 3 (b) inmovilizados en la superficie del chip sensor. Las muestras de mAb se usaron en tres concentraciones diferentes (20 μ g/ml, 10 μ g/ml y 5 μ g/ml). Se muestra la mayor concentración. Los resultados que se muestran son representativos de los dos experimentos independientes. (c) Respuesta de unión relativa de 26,4 y B2G1 a HPA-1a en α IIb β 3 y α V β 3. La respuesta de unión (RU) al final del período de asociación se calculó en relación con 26,4 (se tomaron 26,4 RU como 100 % para cada integrina). Los datos presentados son RU promedio generadas por inyección de tres concentraciones diferentes de mAbs (20 μ g/ml, 10 μ g/ml y 5 μ g/ml). (d) Porcentaje de 26,4 y B2G1 unido a HPA-1a en α IIb β 3 y α V β 3 al final del período de disociación. El porcentaje de anticuerpo unido al final de la fase de disociación se calculó dividiendo la RU al final del período de disociación por el RU al final del período de asociación multiplicado por el 100 %. Los datos presentados son porcentajes promedio calculados a partir de tres concentraciones diferentes para cada mAb. Para comparar la capacidad de 26,4 y B2G1 para inhibir la unión de mAb SZ21 al antígeno HPA-1a, las microesferas acopladas con la integrina β 3 se incubaron previamente con diversas concentraciones de 26,4 o B2G1 y la unión posterior de SZ21 conjugado con FITC al antígeno HPA-1a se evaluó mediante citometría de flujo (e, f). *Intensidad de fluorescencia relativa* = intensidad de fluorescencia media de cada muestra (media \pm SEM): intensidad de fluorescencia media de las microesferas acopladas con la integrina β 3 del lisado de plaquetas HPA-1bb. Cada muestra se pasó por duplicado. Los gráficos presentados representan cuatro experimentos independientes que utilizan microesferas acopladas con integrina β 3 del lisado de plaquetas (e) o del lisado de células trofoblasto (f).

Figura 6. Efecto del mAb 26,4 sobre la agregación plaquetaria. Se preincubaron muestras de sangre de donantes genotipados HPA-1 (n=3 de cada genotipo HPA-1) con diversas concentraciones de IgG1 26,4 antes de la adición del activador de plaquetas. Los datos de agregación para muestras de sangre preincubadas con 26,4 se presentan como porcentaje del control de agregación plaquetaria.

Figura 7. Fagocitosis monocítica de plaquetas opsonizadas con 26,4. Las plaquetas de donantes con genotipo HPA-1 conocido (n=3 de cada genotipo HPA-1) se marcaron con CMFDA, se sensibilizaron con diversas concentraciones de IgG1 o IgG3 26,4 y se incubaron con monocitos autólogos. Después de la eliminación de las plaquetas adheridas, los monocitos se tiñeron con anticuerpo anti-CD14 conjugado con PE y se analizaron por citometría de flujo. La población positiva para CD14 era cerrada y el porcentaje de monocitos FITC positivos se definió como actividad fagocítica (%). Los datos presentados son actividad fagocítica promedio de monocitos de donantes homocigotos HPA-1a (Figura 7A) y de donantes HPA-1ab (Figura 7B).

Figura 8. Ilustración de un histograma típico para el fenotipo HPA-1 por citometría de flujo sanguíneo completo mediante 26,4 conjugado con un colorante fluorescente. La población de plaquetas está cerrada en un diagrama de puntos (panel superior). La superposición de histogramas muestra resultados típicos para plaquetas HPA-1a-positivas (llenas) y HPA-1a-negativas (panel inferior).

Figura 9. La preparación de MAb26.4 tiene una linealidad y un intervalo comparables con el estándar policlonal anti-HPA-1a NIBSC disponible comercialmente. Los gráficos generados por los valores medios de absorbancia para duplicar las diluciones de NIBSC y los estándares de mAb IgG1 26,4 propuestos en el ensayo MAIPA. Se usaron porciones lineales de los gráficos para determinar la actividad anti-HPA-1a de las muestras.

5

Figura 10. Las actividades anti-HPA-1a de las muestras A, B, C y D en unidades internacionales por ml (UI/ml). El valor medio de la actividad anti-HPA-1a para cada muestra y la desviación estándar (CD) de tres ensayos MAIPA se calcularon cuando se utilizaron NIBSC o mAb como estándares.

Figura 11. El MAb 26,4 puede inhibir la unión de la IgG policlonal anti-HPA-1a a las plaquetas homocigotas HPA-1a. Las plaquetas HPA-1aa se hicieron reaccionar con diversas concentraciones de fragmento 26,4 F(ab')₂ antes de agregar muestras policlonales anti-HPA-1a IgG. La unión de IgG anti-HPA-1a a las plaquetas se midió por MAIPA. La unión no inhibida de anticuerpos policlonales se tomó como unión máxima o al 100 %. La unión en presencia del fragmento F(ab')₂ 26,4 se presenta como un porcentaje de la unión máxima. Los puntos conectados por líneas negras representan la unión de muestras de donantes.

Figura 12. Reactividad de mAbs murinos específicos para integrina β_3 con péptidos de eliminación de dominio recombinantes β_3 analizados mediante ELISA. Representativo de dos experimentos independientes. Los detalles del experimento se proporcionan en el ejemplo 4.

20

Figura 13. La reactividad de mAbs humanos específicos para HPA-1a con péptidos de eliminación de dominio recombinantes β_3 analizados mediante ELISA. Representativo de dos experimentos independientes. Los detalles del experimento se proporcionan en el ejemplo 4.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Generación y caracterización *in vitro* de un nuevo anticuerpo monoclonal específico de HPA-1a humano

30

En este estudio, el objetivo era desarrollar un mAb humano altamente específico para HPA-1a que fuera adecuado para fines profilácticos, terapéuticos y de detección. Una cualidad esencial de dicho anticuerpo sería una alta afinidad de unión al HPA-1a y una reactividad mínima con el homólogo HPA-1b. Como se describe a continuación, se desarrolló un mAb completamente humano mediante la inmortalización de células B de memoria específica de antígeno de una mujer HPA-1a negativa que había desarrollado anticuerpos anti-HPA-1a tras la inmunización en conexión con un embarazo no compatible (es decir, donde el feto era HPA-1a positivo).

35

Materiales y procedimientos

40 Material del donante

La sangre periférica la donó una mujer inmunizada con HPA-1a en relación con el embarazo. Dio a luz a dos bebés HPA-1a positivos con trombocitopenia severa y hemorragias subcutáneas. La muestra de sangre donada se tomó 4 semanas después del parto del segundo niño. El nivel de anticuerpos anti-HPA-1a en plasma fue de 150 UI/ml, medido por el ensayo de inmovilización de antígenos plaquetarios con el empleo de anticuerpos monoclonales (MAIPA) (Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C., Blood. 1987;70(6):1722-6.).

45

Aislamiento de linfocitos B de memoria

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad usando Lymphoprep (Axis-Shield, Dundee, Escocia), según las instrucciones del fabricante. Las células B de memoria se aislaron según el procedimiento de Traggiai et al. (Nat Med. 2004; 10 (8): 871-5.). Brevemente, las células CD22⁺ marcadas con anticuerpo se aislaron mediante clasificación celular activada magnéticamente (MACS, Miltenyi Biotech, Alemania), se incubaron con anticuerpos antihumanos IgD, IgM e IgA de cabra conjugados con FITC (Dako, Dinamarca). La población celular CD22⁺IgD⁺IgM⁺IgA⁺, y las células B de memoria IgG⁺ se identificaron y aislaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACSaria BD Biosciences). Los datos de citometría de flujo fueron analizados por el software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EE. UU.).

55

Transformación VEB de las células B de memoria

60

Las células B de memoria aisladas se distribuyeron a 400 células por pocillo en 96 placas de cultivo de células de fondo U y se cultivaron en medio completo (medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), FBS al 10 % y 100 U/ml

de penicilina, 100 U/ml de estreptomina) con sobrenadante que contiene VEB de una línea celular de linfoblastos de tití B95,8 (número ATCC: VR-1492) y 0,6 µg/ml de CpG ODN2006 fosforotioado (15) (Tecnologías de ADN integradas, Bélgica) en atmósfera humidificada a 37 °C, 7,5 % de CO₂. Después de 2 semanas, se analizó la presencia de IgG específica de HPA-1a en los sobrenadantes de cultivo.

5

Selección de linfoblastos B específicos de HPA-1a

Las plaquetas positivas para HPA-1a se prepararon a partir de plasma rico en plaquetas (PRP) (por granulación) y se marcaron con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE; Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células de cultivos de linfoblastos B que secretan IgG anti-HPA-1a se tiñeron con anticuerpo anti-CD45 conjugado con PerCP (Caltag) y se incubaron con plaquetas marcadas con CFSE. Los linfoblastos B que se unen a las plaquetas positivas para HPA-1a se clasificaron una célula por pocillo en placas de cultivo de fondo en U de 96 pocillos mediante FACS y se clonaron en presencia de PBMC alogénicas irradiadas con rayos gamma (10,000 células por pocillo).

15 Generación y detección de hibridomas secretores de IgG anti-HPA-1a

Los linfoblastos B clonales se fusionaron con una línea celular de heteromioma de ratón humano no secretora K6H6/B5 (número ATCC: CRL-1823) en una proporción de 1:10 mediante un procedimiento de agitación con polietilenglicol (P7306, Sigma-Aldrich). Las células fusionadas se distribuyeron en los pocillos de una placa de 48 pocillos y se cultivaron en medio completo. La selección de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT; Sigma-Aldrich) se inició 24 horas después de la fusión celular y continuó durante 7 días. Los sobrenadantes de hibridoma se seleccionaron para detectar IgG anti-HPA-1a mediante MAIPA o citometría de flujo. Para el MAIPA, utilizamos 50 µl de sobrenadante de cultivo y clon de anticuerpo anti-CD61 monoclonal de ratón Y2/51 (Dako, Dinamarca) como anticuerpo de captura. Para el ensayo de citometría de flujo se incubaron 2x10⁶ plaquetas HPA-1a positivas con 50 µl de sobrenadante de cultivo celular, se lavaron y se tiñeron con anticuerpos IgG anti-humanos conjugados con FITC (Dako, Dinamarca). Los cultivos positivos se subclonaron adicionalmente 3 veces para aislar hibridomas secretores de anticuerpos anti-HPA-1a estables. La subclase de IgG del mAb se comprobó mediante ELISA. Los anticuerpos anti-humanos de cabra (Caltag) se usaron para recubrir la placa ELISA (Maxisorp, Nunc) y los anticuerpos anti-IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 mAbs de ratón conjugados con biotina se usaron como anticuerpos de detección (clones HP6069, HP6002, HP6047 y HP6025, respectivamente, Invitrogen).

Ensayo MAIPA

Se siguió la técnica MAIPA descrita en detalle en Killie et al., 2010 (Killie et al. 2010. Quantitative MAIPA: Comparison of different MAIPA protocols. *Transfusion and Apheresis Science* 43: 149-54). Brevemente, las plaquetas lavadas se incubaron con suero humano o mAb humano seguido de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GPIIb-IIIa, clon Y2/51 (Dako). A continuación se lisaron las plaquetas y se añadió sobrenadante a una microplaca prerrecubierta con IgG anti-ratón. Los anticuerpos humanos unidos a GPIIb-IIIa se detectaron con IgG antihumana marcada y un sustrato adecuado. Los estándares policlonal anti-HPA-1a del Instituto Nacional de Normas y Control Biológicos (NIBSC) (Allen D et al. 2005. Collaborative study to establish the first international standard for quantitation of anti-HPA-1a. *Vox Sanguinis* 89:100-4) se utilizaron para crear una curva estándar lineal para MAIPA cuantitativa. Los niveles de anticuerpos específicos en las muestras se calcularon usando una ecuación de regresión lineal.

Purificación de IgG a partir de sobrenadante de cultivo celular

45

La fracción de IgG del sobrenadante del cultivo celular se aisló mediante precipitación con sulfato de amonio saturado al 40 % seguido de cromatografía de afinidad con proteína G (proteína G Sepharose 4 FastFlow, GE Healthcare). La IgG eluida se dializó contra solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se concentró usando dispositivos de filtro centrífugo Microcon (Ultracel YM-50, Millipore).

50

Amplificación y secuenciación de genes de la región variable de Ig

El ARN total se aisló de los linfoblastos B clonales mediante el kit RNeasy Mini Spin (QIAGEN, Hilden, Alemania). El ADNc se sintetizó mediante transcripción inversa utilizando cebadores específicos para las regiones constantes de IgG humana. El ADNc resultante se usó como plantilla para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar genes de región pesada y ligera variables IgG (PV, VL y VK). Los genes se amplificaron en reacciones de PCR separadas para las familias de genes individuales de cadena pesada y ligera, usando cebador de sentido específico para una de las regiones líderes, y cebador antisentido para las regiones constantes de cadena pesada y ligera. Los productos de PCR se identificaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se clonaron en vectores pCR2.1-TOPO (kit de clonación TOPO TA, Invitrogen) seguido de secuenciación de minipreps de plásmidos (kit Miniprep, QIAGEN). Las reacciones de secuenciación se precipitaron y ejecutaron en un analizador genético 3130xl (Applied Biosystems) en la instalación central de secuenciación de la Facultad de Ciencias de la Salud, UIT,

Universidad Ártica de Noruega.

Análisis de genes y mutaciones de la región variable de Ig

5 Las secuencias de nucleótidos se analizaron en la base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) de genes de línea germinal humana utilizando el programa IMGT/V-QUEST disponible en <http://www.imgt.org> (Brochet X, Lefranc M-P, Giudicelli V. *Nucleic Acids Research*. 2008;36 (suppl 2):W503-W8). El proceso de maduración de afinidad (presión selectiva de antígeno) conduce a la agrupación de mutaciones de reemplazo (R) en lugar de mutaciones silenciosas (S) dentro de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), que se unen al antígeno. Las regiones de estructura (FR) mantienen la estructura del anticuerpo y acumulan S en oposición a las mutaciones R. Se usó el modelo de distribución multinomial para determinar si la abundancia relativa de la mutación R en las CDR y las mutaciones S en las FR se acumularon a una tasa superior a la prevista por azar según la composición de codones de la secuencia de la línea germinal original. Se identificaron mutaciones para las regiones de estructura (FR) 1, 2 y 3 y las regiones determinantes complementarias (CDR) 1 y 2 y se importaron junto con las secuencias de la línea germinal correspondientes de Ig en el applet JAVA en <http://www-stat.stanford.edu/immunoglobulin/> para análisis multinomial (Lossos IS, et al.. *J Immunol*. 2000;165(9):5122-6).

Generación de IgG1 e IgG3 anti-HPA-1a recombinantes

20 Síntesis de los 26,4 genes de la cadena pesada y ligera

Los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera que codifican el anticuerpo 26,4 se sintetizaron mediante GenScript (Piscataway, NJ, EE. UU.) mediante la optimización del uso del codón en los genes sintetizados para la expresión de anticuerpos de alto nivel en células humanas. Se sintetizaron dos variantes del gen de la cadena pesada 26,4 utilizando las regiones constantes de la cadena pesada $\gamma 1$ y $\gamma 3$. Se insertaron sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *Esp3I* y *EcoRI* en los flancos de los genes sintetizados, para su posterior uso en la clonación de los genes en el vector pFRIDA (vector pLNO modificado - Norderhaug L et al., *J Immunol Methods* 204: 77-87).

Clonación de los genes

30 Se suministró cada uno de los 26,4 genes en el vector pUC57. El vector pUC57 que contiene el gen sintetizado se digirió con enzimas de restricción *Esp3I* y *EcoRI* (Fermentas, Burlington, Canadá) y el fragmento de ADN correspondiente al tamaño de la cadena pesada o ligera se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando el kit Qiagen Gelolute (Qiagen, Alemania). El vector de clonación pFRIDA se procesó de la misma manera mediante digestión con enzimas de restricción *Esp3I* y *EcoRI*, y el posterior aislamiento del vector digerido por electroforesis en gel de agarosa. Los genes digeridos se ligaron en el vector linealizado usando ADN ligasa T4 (NEB, EE. UU.) y luego se transformaron en células competentes XL-10 GOLD (Stratagene, EE. UU.). Las células transformadas se seleccionaron en ampicilina que contiene agar de crecimiento. Las colonias bacterianas se seleccionaron cultivando 14 horas en medio líquido que contiene ampicilina y el ADN del vector se aisló usando minipreps de plásmidos. Se verificó que el ADN del vector contenía el inserto correcto mediante análisis de enzimas de restricción.

Transfección transitoria de células HEK293E para la expresión del anticuerpo 26,4

Se agregaron cinco millones de células HEK293E a 25 ml de medio DMEM (BE12-614F, Lonza) suplementado con 45 FBS al 10 % y L-glutamina 4 mM. El medio que contiene células se transfirió a un matraz de cultivo celular medio estándar (T75) y se incubó durante 18 horas en atmósfera humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂. Se preparó una mezcla de transfección añadiendo 5 µg de ADN vector (0,1 µg/ml) que expresa la cadena ligera 26,4, 5 µg de ADN vector (0,1 µg/ml) que expresa la cadena pesada 26,4 deseada ($\gamma 1$ o $\gamma 3$) y 375 µl de RPMI en un tubo de ensayo. La mezcla se precalentó a 80° C y se enfrió a 4 °C. Se calentó simultáneamente polietilenimina Max (PEI Max, 2 mg/ml; 24765-50 2, Polysciences Inc), pero se enfrió a temperatura ambiente para evitar la precipitación. De la solución de PEI, se añadieron 65 µl a la mezcla de transfección antes de dejar incubar el tubo a temperatura ambiente durante 8 minutos. Luego se añadió medio DMEM (FBS al 10 %, L-glutamina 4 mM) (3375 µl) al tubo de ensayo. El medio del matraz de cultivo celular con células adherentes HEK293E se retiró y se reemplazó con la mezcla de reacción. Se dejó que la mezcla de reacción cubriera las células durante 2 horas antes de añadir 25 ml de medio DMEM suplementado con 55 FBS al 10 % y L-glutamina 4 mM. Se permitió que las células transfectadas crecieran durante 2-5 días antes de que el sobrenadante se cosechara y se analizara la producción de IgG. La concentración de IgG₁ humana e IgG₃ en las muestras se cuantificó por ELISA, con IgG anti-humano de cabra Fc (Sigma) como recubrimiento y IgG anti-humano de cabra conjugado con ALP Fc (Sigma) como detección anticuerpos. Se usaron IgG1 e IgG3 humanas (I 5154 e I 5654 respectivamente, Sigma) como estándares internos.

60

Análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR)

Se utilizó tecnología SPR para evaluar las propiedades de unión de los mAbs (instrumento Biacore T200, Biacore AB, Uppsala, Suecia). La integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ se aisló de las plaquetas HPA-1aa y -1bb por cromatografía de afinidad como se describió anteriormente (Bakchoul T, Meyer O, Agaylan A, Bombard S, Bein G, Sachs UJH, et al. *Transfusion*. 2007;47(8):1363-8.), mediante el uso de una columna de sepharose (Sephacrose 4 Fast Flow activada por CNBr, GE Healthcare) acoplada con mAb anti- β3 de ratón (clon AP3, número ATCC HB-242). La integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ se obtuvo de Millipore (cat. No: CC1018). La integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ se purificó de la placenta humana por cromatografía de afinidad usando anticuerpos monoclonales inmovilizados contra la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$. Se preparó un extracto de detergente de tejido aplicado a la columna como ya se ha descrito (Belkin VM, Belkin AM, Koteliansky VE., *The Journal of Cell Biology*, 1990; 111 (5): 2159-70) Las integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ purificadas (versiones portadoras de antígeno HPA-1a y HPA-1b) y $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ se inmovilizaron en la superficie de un chip sensor CM5 en tres células de flujo (FC) diferentes a una densidad de 400, 340 y 480 unidades de respuesta (RU) respectivamente utilizando química de acoplamiento de amina estándar. Se usó un FC tratado con los mismos productos químicos pero sin proteína como superficie de referencia. Se inyectaron muestras de IgG monoclonal purificadas (varias concentraciones) sobre la superficie del chip a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Una etapa de asociación de 120 segundos precedió a una etapa de disociación de 120 segundos. La regeneración de la superficie del chip sensor se realizó utilizando 10 mM de glicina-HCl (pH 1,5). Los experimentos se realizaron a 25 °C. Los datos recopilados se analizaron utilizando el software BiaEvaluation 2.0.1. La cantidad de integrina β3 inmovilizada disponible para la unión de anticuerpos se midió mediante inyección del mAb anti- β3 (clon SZ21) a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se han generado alrededor de 80 RU en el chip inmovilizado $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Figura 4B) y 25 RU en el chip inmovilizado $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ (datos no mostrados). Todos los productos químicos para el experimento Biacore fueron adquiridos de GE Healthcare.

Ensayo de inhibición de la unión de anticuerpos citométricos de flujo

La capacidad del mAb 26,4 para inhibir la unión del mAb SZ21 al epítipo HPA-1a se evaluó utilizando microesferas indirectamente acopladas con la integrina β3 y se comparó con un anticuerpo B2G1 recombinante HPA-1a descrito previamente (Garner, et al., (2000), *British Journal of Haematology* 108: 440-7; Griffin H, et al., (1995), *Blood* 86: 4430-6). Primero, Dynabeads M-270 Epoxy (Life Technologies) se acopló con un anticuerpo anti- β3 (clon EPR2417Y, específico para la parte C-terminal de la integrina β3 , Abcam, Cambridge, Inglaterra) según las instrucciones del fabricante. A continuación, las microesferas se incubaron con lisado celular de una línea celular de trofoblasto que expresa la integrina β3 (TCL-1 (Lewis MP, et al. (1996), *Placenta* 17: 137-46); genotipado HPA-1aa) o lisado de plaquetas de plaquetas HPA-1a positivas durante la noche a 4 °C, para unir la integrina β3 de los lisados celulares. Las microesferas se lavaron con tampón RIPA (Sigma) y se incubaron con varias cantidades (12,5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng y 200 ng) de 26,4 y B2G1 en tampón RIPA durante 15 minutos a temperatura ambiente. Estas cantidades de anticuerpo se incubaron con microesferas en un volumen total de 200 μl . Las concentraciones fueron por lo tanto 62,5, 125, 250, 500 y 1000 ng/ml, respectivamente. Después de una etapa de lavado, las microesferas se incubaron con 5 μl de mAb SZ21 conjugado con FITC (Beckman Coulter) en 200 μl de suspensión de microesferas durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de una etapa de lavado, las microesferas se resuspendieron en PBS y se analizaron por citometría de flujo.

40 Agregación de plaquetas (Multiplaca)

La agregometría de plaquetas de impedancia se usó para evaluar el efecto de los mAb en la agregación de plaquetas (analizador multiplaca, Roche, Basilea, Suiza). Los participantes del estudio (n=3 de cada genotipo HPA-1) fueron voluntarios sanos con genotipo HPA-1 conocido que no tomaron ningún medicamento que afectara la función plaquetaria 10 días antes de la extracción de sangre. Se extrajeron muestras de sangre completa mediante punción venosa periférica en tubos de 3 ml, que contenían hirudina recombinante como anticoagulante. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente y las mediciones se realizaron dentro de las 2 h posteriores a la recolección de sangre. Las muestras de sangre de 480 μl se incubaron con diversas concentraciones de mAb (volumen de 20 μl) durante 5 minutos antes de la adición del activador de plaquetas, péptido-6 activador del receptor de trombina (TRAP-6). Se usaron muestras de sangre con la adición de 20 μl de tampón PBS para determinar la función plaquetaria individual activada por TRAP-6. Para probar el efecto del 26,4 sobre la agregación plaquetaria sin activador plaquetario, se usó la solución de cloruro de sodio al 0,9 % en lugar del TRAP-6. La agregación se registró continuamente durante 6 minutos en dos unidades de medición independientes por prueba. Se detectó un aumento de la impedancia debido a la unión de las plaquetas a los electrodos y se convirtió en unidades de agregación arbitrarias (AU) representadas en función del tiempo. La agregación se cuantificó por el área bajo la curva (AUC) en unidades de agregación (AU \times min). El recuento de plaquetas en muestras de sangre se midió utilizando el analizador de hematología Sysmex XN-1000.

Fagocitosis de plaquetas mediada por anti-HPA-1a por ensayo de monocitos

60 La capa leucocitaria se diluyó 1:4 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se colocó en capas sobre medio Lymphoprep (Axis-Shield, Dundee, Reino Unido) seguido de una centrifugación de 15 minutos a 700 g sin frenos. Se recogió la interfaz y se añadieron 40 ml de PBSA al 0,2 % (albúmina de suero bovino al 0,2 % en PBS). Las PBMC se

sedimentaron por centrifugación a 300 g durante 6 minutos. Las plaquetas se sedimentaron del sobrenadante por centrifugación a 2000 g durante 6 minutos y se resuspendieron en 0,2 % PBSA 0,3 % EDTA. Los monocitos se aislaron de PBMC utilizando el cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos RosetteSep (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) como se describió anteriormente (Ahlen MT, Husebekk A, Killie MK, Skogen B, Stuge TB. Blood. 5 2009;113(16):3838-44.) y ajustado a 2×10^6 células/ml en FBS-IMDM al 10 % (BE12-722F, Lonza).

En 1 ml de volumen 10^8 las plaquetas se marcaron con CellTracker Green CMFDA (diacetato de 5-clorometil fluoresceína, C7025, Invitrogen) a una concentración final de 0,25 μ M según las instrucciones del fabricante. Las plaquetas teñidas con CMFDA se ajustaron a 2×10^8 /ml en 0,2 % PBSA 0,3 % EDTA y 50 μ l se incubaron con diferentes 10 concentraciones de IgG anti-HPA-1a monoclonal humana durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado, se agregaron 50 μ l de monocitos, lo que dio como resultado un volumen total de 100 μ l y una relación de plaquetas a monocitos 100:1 en tubos duplicados y se incubaron a 37 °C, en un 7,5 % de CO₂ en ambiente humidificado durante 2 h. Los monocitos se sedimentaron por centrifugación a 300 g y se incubaron con solución de tripsina/EDTA al 0,25 % (T4049, Invitrogen) durante 2 minutos a 37 °C para eliminar las plaquetas adherentes 15 extracelulares. Después de la etapa de lavado, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD14 conjugado con PE (Invitrogen) y se analizaron por citometría de flujo. Se usaron IgG1 e IgG3 humanas de especificidades irrelevantes como controles negativos del ensayo.

Estadísticas

20 El software Sigma Plot 12,5 (San José, CA) se utilizó para presentar datos experimentales de agregación y fagocitosis. Se utilizó el software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA) para presentar los datos del ensayo de inhibición de la unión de anticuerpos citométricos de flujo.

25 Ética

El estudio fue aprobado por el Comité Regional de Ética de Investigación Médica, Norte-Noruega, (aprobación n°: 2009/1585 y 2013/126/REK). Todos los voluntarios que donaron muestras de sangre han firmado un consentimiento informado por escrito (Banco de Sangre, Hospital Universitario del Norte de Noruega).

30

Resultados

La IgG monoclonal específica para HPA-1a se generó inmortalizando células B de memoria específicas de HPA-1

35

Se razonó que las células B que producen IgG anti-HPA-1a específica pueden estar presentes en cantidades elevadas en la circulación de mujeres que han dado a luz a un niño afectado por TFNA, y que un anticuerpo derivado de una sola HPA-1a específica puede dar lugar a un suministro ilimitado de anticuerpos monoclonales con esta especificidad. Para aislar las células B de IgG⁺ específica de HPA-1a, las PBMC se aislaron primero de una mujer aloinmunizada 40 HPA-1a. Se extrajo sangre 4 semanas después del parto de un niño afectado por TFNA. Para enriquecer las células B, reaccionamos alrededor de 40 millones de PBMC con un anticuerpo monoclonal específico para el marcador de células pan B CD22 y purificamos las células sensibilizadas de las PBMC mediante clasificación celular activada magnéticamente (MACS). Se recuperaron cerca de 3 millones de células B CD22⁺. Para enriquecer para las células B IgG⁺, el CD22⁺ las células se hicieron reaccionar con anticuerpos policlonales marcados con fluorescencia contra 45 los isotipos humanos IgM, IgA e IgD (IgMAD) y las células IgMAD⁻ se aislaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Las células IgMAD⁻ ascendieron al 5,6 % de las células CD22⁺. (Figura 1A). En un experimento separado se demostró que la población de células CD22⁺ IgMAD⁻ consistía principalmente en células IgG⁺ (datos no mostrados). Alrededor de 10^5 células fueron aisladas mediante FACS. Para aislar las células B específicas de HPA-1a de las células aisladas de FACS, nuestra estrategia fue inmortalizar las células clasificadas 50 por transformación con el virus Epstein-Barr (VEB) y detectar células transformadas que produzcan anticuerpos anti-HPA-1a. Por lo tanto, las células clasificadas se trataron con sobrenadante de cultivo que contenía VEB en presencia de un activador policlonal de células B de memoria, oligonucleótido CpG (CpG 2006) para mejorar la transformación, y se dividieron en 240 pocillos (aproximadamente 400 células por pocillo) en placas de microtitulación. Después de 2 semanas, MAIPA identificó 27 cultivos de linfoblastos B que contenían anticuerpos específicos HPA-1a. Después de 55 7 días adicionales en cultivo, sólo la mitad de los cultivos de linfoblastos B retuvo la producción de anticuerpos específicos. Las células del cultivo que secretan la mayor cantidad de IgG anti-HPA-1a se incubaron con plaquetas positivas para HPA-1a teñidas con CFSE. Los linfoblastos positivos para CFSE, 120 células, se aislaron individualmente mediante FACS (Figura 1B) y se expandieron en cultivo. Notablemente, observamos mucha unión no específica de plaquetas a linfoblastos B negativos para HPA-1a, usados como control negativo; el control negativo 60 tuvo casi la misma frecuencia de linfoblastos positivos para CFSE (datos no mostrados). Después de 3 semanas de expansión, se identificó un cultivo clonal de linfoblastos B que secreta anticuerpos específicos para HPA-1a y se estableció el clon D18BL26.4 (también denominado en este documento 26,4 o mAb26,4). El anticuerpo 26,4 se unió

específicamente a las plaquetas positivas para HPA-1a (Figura 2A y Figura 2B). Se generó una línea celular de hibridoma, D18BL26.4H, que secreta IgG anti-HPA-1a fusionando células de los 26,4 linfoblastos B a células de heteromioma (como se describe en la sección del procedimiento). Se descubrió que la subclase de IgG secretada era IgG₃ por ELISA.

5

Amplificación de genes y análisis de secuencia de la región variable de Ig

Para probar la clonalidad de la línea celular D18BL26.4 y amplificar las secuencias de genes variables de Ig, primero aislamos el ARNm y el ADNc sintetizado mediante transcripción inversa con cebadores específicos para las regiones constantes de IgG humana. El ADNc resultante se usó como plantilla para amplificar genes de región pesada y ligera variables IgG (PV, VA y VK) en reacciones de PCR separadas para cada familia de genes. Los dos productos de PCR amplificados de aproximadamente 400pb de tamaño correspondieron a las familias de genes VH6 y VK3, lo que confirma la clonalidad de las células (datos no mostrados). Los productos de PCR se secuenciaron y el análisis de secuencias de genes variables de Ig permitió la identificación de los genes de línea germinal conocidos más cercanos y los segmentos de genes V, D y J utilizados durante la recombinación somática (Figura 3). Para la cadena pesada IGHV6-1*01, se usaron segmentos de genes IGHD6-13*01 e IGHJ6*02 e IGKV3-11*01 e IGKJ4*01 para la cadena ligera.

20 **El mAb 26,4 recombinante es específico y se une fuertemente al antígeno HPA-1a**

Para facilitar la exploración de la función mAb 26,4 con diferentes isotipos de Ig, el gen que codifica la región variable de la cadena pesada de Ig en células D18BL26.4 se combinó con dominios constantes IgG1 (26.4G1) e IgG3 (26.4G3) en diferentes construcciones de expresión. El gen de la región variable de la cadena ligera se combinó con un dominio constante kappa 1 en una tercera construcción. Se expresaron una construcción de cadena pesada y de cadena ligera en células HEK293E después de la transfección transitoria. Típicamente, los cultivos transfectados produjeron 26,4G₁ y 26,4G₃ a los sobrenadantes a concentraciones de 20-50 µg/ml y 5-20 µg/ml, respectivamente, medido por ELISA. Idénticos a los 26,4 nativos, los mAbs 26.4G1 y 26.4G3 se unieron específicamente a las plaquetas intactas positivas para HPA-1a cuando se probaron en citometría de flujo y MAIPA (Figuras 2A y 2B). No se observó unión a plaquetas HPA-1a negativas. Todos los experimentos desde este punto se realizaron con 26,4 recombinante, y se usó la versión 26.4G1 a menos que se indique lo contrario.

El 26,4 se unió específicamente a las plaquetas intactas HPA-1a positivas cuando se probó en citometría de flujo (FC) y MAIPA. No se observó unión a plaquetas HPA-1a negativas.

35 Para una evaluación más sensible de la especificidad, se midió la unión de 26,4 a la integrina plaquetaria purificada αIIbβ3 por resonancia de plasmones superficiales (SPR). En el sistema de resonancia de plasmones superficiales (SPR), el 26,4 se unió exclusivamente a αIIbβ3 de individuos HPA-1aa; no hubo unión medible a HPA-1a-negativo αIIbβ3 (Figura 4A). La asociación rápida y la disociación lenta indican que el 26,4 se une con fuerza al antígeno HPA-1a. Las propiedades de unión de 26,4 anticuerpos recombinantes eran idénticas a las del lote secretado por hibridoma (datos no mostrados).

Además, comparamos las propiedades de unión del 26,4 con el mAb humano específico de HPA-1a, el clon B2G1, generado por la presentación en fagos también de una mujer aloinmunizada en relación con el embarazo (Griffin H, Ouwehand W., Blood. 1995; 86(12):4430-6). Las curvas de asociación y disociación similares para 26,4 y B2G1 indican que las afinidades de los dos mAbs están en el mismo rango (Figura 5A). La afinidad de unión del B2G1 al αIIbβ3 recombinante se midió previamente, $K_D=6 \times 10^{-8}$ (Santoso S, Kroll H, Andrei-Selmer CL, Socher I, Rankin A, Kretzschmar E, et al. Transfusion. 2006;46(5):790-9.).

A continuación, evaluamos las propiedades de unión y la especificidad del mAb de ratón previamente caracterizado, el clon SZ21 (Weiss EJ, Goldschmidt-Clermont PJ, Grigoryev D, Jin Y, Kickler TS, Bray PF. Antígenos Tisulares. 1995;46(5):374-81.). El anticuerpo SZ21 se unió a la integrina αIIbβ3 positiva y negativa de HPA-1a, sin embargo, mostró una mayor afinidad por HPA-1a, ya que se asoció más lentamente y se disoció más rápidamente de la integrina HPA-1a negativa (Figura 4B). Este patrón de unión indica que SZ21 es pseudoespecífico para HPA-1a.

55 **MAB 26,4 muestra un patrón de unión único a la integrina αVβ3**

Como la integrina β3 también es parte del receptor de vitronectina (αVβ3), examinamos si los mAbs 26,4 y B2G1 específicos de HPA-1a podrían o no unirse a αVβ3 purificado. La fuente y el procedimiento para purificar la integrina αVβ3 se describió anteriormente. Ambos mAbs se unen a la superficie del chip del sensor junto con αIIbβ3 (HPA-1a) y αVβ3 (Fig. 5A y 5B). Sin embargo, 26,4 se unió a αIIbβ3 generando un 10 % más de respuesta de unión que B2G1. Sorprendentemente, la diferencia en la respuesta de unión fue más profunda en la superficie junto con αVβ3: 26,4 generó un 42 % más de respuesta de unión que B2G1 (Figura 5C)

Ambos mAb se disociaron de α IIb β 3 con una tasa casi idéntica; alrededor del 81 % de la unión 26,4, así como B2G1, permanecieron unidos al final del período de disociación. Sin embargo, B2G1 se disocia de α V β 3 más del 50 % más rápido que 26,4; el 31,4 % de B2G1 en comparación con el 66,8 % de 26,4 permaneció unido al final del período de disociación (Figura 5D).

La diferencia no se atribuye a ninguna pérdida de antígeno durante el procedimiento de regeneración, ya que las muestras B2G1 se procesaron antes que las muestras 26,4 sobre las superficies α IIb β 3 (Figura 5a) y α V β 3 (Figura 5b). Además, los resultados se produjeron con diversas concentraciones de anticuerpos, 20, 10 y 5 μ g/ml (sólo se muestran 20 μ g/ml) y se han obtenido resultados similares usando un chip sensor junto con mayores cantidades de integrinas (datos no mostrados).

Otros datos de asociación/disociación se muestran en la Tabla 2

15 **Tabla 2.** Análisis SPR del mAb 26,4 y la unión de B2G1 a α IIb β 3 y α V β 3 inmovilizados.

Complejo de integrina	26,4			B2G1		
	unión (RU)	unión después de la disociación (RU)	% disociado	unión (RU)	unión después de la disociación (RU)	% disociado
α IIb β 3	63,1	49,6	21,4	56,1	43,8	22
α V β 3	18,8	12,2	35,1	11,2	3,3	70,5

Debido a la diferencia observada en la unión a α V β 3, se decidió examinar las eficiencias relativas de 26,4 y B2G1 para inhibir la unión de un tercer mAb anti-HPA-1a, SZ21, a α IIb β 3 y α V β 3 (Figura 5e y f). En este conjunto de experimentos, el mAb 26,4 fue más eficiente que B2G1 para inhibir la unión de SZ21 a las microesferas acopladas con α V β 3 de los trofoblastos (Figura 5f). En comparación, hubo poca diferencia en la eficiencia de los dos mAbs (26,4 y B2G1) para inhibir la unión de SZ21 a las microesferas acopladas con α IIb β 3 de las plaquetas (Figura 5e). Por lo tanto, aunque los mAbs 26,4 y B2G1 parecen unirse de manera similar a HPA-1a en la integrina α IIb β 3, difieren en la eficiencia de unión a la integrina α V β 3.

25 **MAB 26,4 tiene efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria**

Dado que el heterodímero de integrina α IIb β 3 es un receptor de fibrinógeno en las plaquetas, evaluamos si 26,4 afecta la agregación plaquetaria (Figura 6). El 26,4 inhibió la agregación plaquetaria de HPA-1aa de una manera dependiente de la concentración: Inhibición del 15, 35 y 80 % a concentraciones de 2, 6 y 12 μ g/ml, respectivamente, en comparación con el control de agregación. El control de agregación fue la agregación plaquetaria individual desencadenada por TRAP-6. La agregación plaquetaria individual se tomó como 100 %. A la concentración más baja de mAb, la inhibición de la agregación de las plaquetas de HPA-1ab fue similar a la de HPA-1aa. Los 6 y 12 μ g/ml de mAb inhibieron igualmente la agregación de plaquetas HPA-1ab en un 20 %. Es importante destacar que no hubo un efecto significativo de 26,4 sobre la agregación plaquetaria HPA-1bb. El anticuerpo 26,4 no afectó la función plaquetaria cuando se midió la agregación en muestras sin activador plaquetario (datos no mostrados). El recuento de plaquetas en muestras con mAb añadido en diferentes concentraciones no difirió de las muestras de control sin mAb para cada participante (datos no mostrados). Por lo tanto, la disminución de la agregación plaquetaria se atribuye únicamente a la inhibición de la función plaquetaria.

40 **El MAB 26,4 es potente para inducir la fagocitosis plaquetaria**

Para evaluar si 26,4 puede inducir la fagocitosis de plaquetas, incubamos monocitos recién aislados con plaquetas marcadas con CFSE sensibilizadas con 26,4 y medimos la frecuencia de monocitos con plaquetas ingeridas por citometría de flujo. El MAb 26,4 indujo la fagocitosis de plaquetas sensibilizadas HPA-1a-homocigóticas de una manera dependiente de la concentración (Figura 7A). El MAb 26.4G1 se comportó de manera similar a 26.4IgG3. A las concentraciones 10, 1 y 0,1 μ g/ml, los anticuerpos indujeron alrededor de 90, 70 y 30 % de fagocitosis, respectivamente. Estos valores de % de fagocitosis son el % de monocitos que tenían plaquetas internalizadas. La actividad fagocítica estaba cerca del 10 % cuando se usaba 0,01 μ g/ml del anticuerpo, así como en controles negativos. La actividad fagocítica con las plaquetas HPA-1ab fue aproximadamente un 20 % menor en comparación con las plaquetas HPA-1aa (Figura 7B). Los anticuerpos no afectaron la fagocitosis de las plaquetas sensibilizadas HPA-1a negativas. No se observó ningún efecto sinérgico cuando se probó una mezcla 1:1 de 26.4G1 y 26.4IgG3 en experimentos similares (datos no mostrados).

Análisis de resultados

En el estudio descrito en esta solicitud, un anticuerpo monoclonal recombinante específico para HPA-1a se derivó de una célula B de memoria única. Esta célula B se aisló de una mujer que se sabe que está inmunizada por HPA-1a en relación con el embarazo. Este anticuerpo, el clon 26,4, se ha expresado con éxito de forma recombinante mediante transfección transitoria de células humanas. Se ha encontrado que 26,4 se une fuertemente a HPA-1a y es altamente específico; no se detectó reactividad al alotipo HPA-1b. Además, exhibe solo un efecto inhibidor modesto sobre la agregación plaquetaria de HPA-1ab y puede oponer las plaquetas para mejorar la fagocitosis de monocitos. Por lo tanto, el mAb 26,4 tiene potencial tanto para la profilaxis de TFNA como para la tipificación de HPA-1a.

Se ha demostrado en esta invención, mediante ensayos de unión sensible, que no hubo reactividad cruzada medible de mAb 26,4 con el alotipo nativo HPA-1b. Sin limitarse a la teoría, se cree que esto puede atribuirse a la selección del anticuerpo por parte del sistema inmune humano. La diferencia entre los alotipos HPA-1 es un solo aminoácido, que es leucina en HPA-1a. El mAb 26,4, obviamente, no se une a la leucina por sí sola. Por lo tanto, una posibilidad es que el anticuerpo tenga afinidad por un área de superficie que sea común a ambos alotipos y que la leucina alogénica marque la diferencia entre la unión estable con él y sin unión sin él. Alternativamente, la diferencia de un solo aminoácido puede estar asociada con un cambio conformacional que, en efecto, crea un nuevo epítipo al que se puede unir el anticuerpo. En cualquiera de los casos anteriores, la selección *en vivo* y la maduración de la afinidad en la célula B que dieron lugar al mAb 26,4 probablemente se dirigieron hacia la mayor afinidad de unión al aloantígeno y al mismo tiempo mantuvieron una baja reactividad cruzada con la contraparte autóloga HPA-1b. Al desarrollar anticuerpos anti-HPA-1a por inmunización de ratones, se carecerá de una presión similar para seleccionar una reactividad cruzada mínima con HPA-1b. Esto es consistente con las observaciones en esta invención de una reactividad cruzada considerable del anticuerpo SZ21 con HPA-1b, mientras que ninguno fue detectable con mAb 26,4. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que los anticuerpos anti-HPA-1a que pueden reaccionar de forma cruzada con el antígeno HPA-1b (por ejemplo, el anticuerpo SZ21) podrían causar respuestas inmunes indeseables en la madre, por ejemplo, acelerar la eliminación de plaquetas maternas de HPA-1bb de la circulación sanguínea que causan trombocitopenia.

La agregación plaquetaria es central en la hemostasia y la trombosis y la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ desempeñan un papel crítico en ella. Estudios anteriores demostraron que los anticuerpos anti-HPA-1a tenían un efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria y la adhesión de las células CHO transfectadas con $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ y $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ al fibrinógeno (Joutsu-Korhonen L, Preston S, Smethurst PA, Ijsseldijk M, Schaffner-Reckinger E, Armour KL, et al. *Thrombosis and Haemostasis*. 2004;91(4):743-54, and Kroll H, Penke G, Santoso S. *Trombosis y hemostasia*. 2005;94(12):1224-9).

El mecanismo de destrucción de plaquetas fetales por anticuerpos maternos anti-HPA-1a no se comprende completamente. Sin limitarse a la teoría, se especula que las plaquetas fetales sensibilizadas con IgG se eliminan de la circulación a través de la fagocitosis mediada por Fc γ R por los fagocitos mononucleares en el bazo y el hígado y posiblemente por los granulocitos. Una aplicación de los mAbs anti-HPA-1a es como una profilaxis contra la inmunización de HPA-1a. Uno de los mecanismos propuestos para la prevención de la inmunización contra el antígeno RhD es mediante la eliminación de los glóbulos rojos fetales de la circulación materna a través de la fagocitosis de los glóbulos rojos opsonizados por IgG anti-RhD. Del mismo modo, y de nuevo sin querer limitarse a la teoría, se presume que la inmunización contra HPA-1a se puede impedir mediante anticuerpos anti-HPA-1a mediante la sensibilización de las plaquetas fetales que luego serán eliminadas de la circulación materna por los fagocitos. Hemos demostrado en un sistema humano *in vitro* que mAb 26,4 (IgG1 e IgG3) puede inducir la fagocitosis de plaquetas HPA-1a positivas.

Como se describió anteriormente, una diferencia notable entre el anticuerpo 26,4 y el anticuerpo B2G1 es que 26,4 se une de manera más estable al $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ derivado del trofoblasto y es más eficiente para inhibir la unión de los anticuerpos anti-HPA-1a (SZ21) a $\alpha\text{V}\beta\text{3}$. En términos de potencial profiláctico y terapéutico, la unión estable a HPA-1a en trofoblastos puede ser una propiedad ventajosa. Se cree que HPA-1a en $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ expresado en células de trofoblasto podría iniciar una respuesta aloinmune en la madre (Vanderpuye OA, et al., (1991), *Biochem J* 280 (Pt 1): 9-17; Kumpel et al. (2008), *Transfusion* 48: 2077-86). Sin limitarse a la teoría, la unión estable de 26,4 a $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ derivada de la placenta podría acelerar la eliminación de las células y el material que expresa este antígeno de la circulación materna y, por lo tanto, evitar la aloinmunización. Una vez más, sin querer limitarse a la teoría, un mecanismo adicional podría ser el enmascaramiento de los epítopos y, en efecto, evitar que las células B específicas de HPA-1a se unan al antígeno y, por lo tanto, evitar su activación. La eliminación de la circulación también podría evitar la activación de tales células B.

En conclusión, hemos desarrollado un nuevo anticuerpo específico para HPA-1a derivado de una sola célula B de una mujer HPA-1a aloinmunizada en relación con el embarazo. El anticuerpo no tiene reactividad cruzada detectable con el alotipo HPA-1b. La versión recombinante de este anticuerpo puede usarse como un reactivo de diagnóstico para identificar a los individuos en riesgo de inmunización contra HPA-1a, así como un reactivo profiláctico para prevenir TFNA y/o como agente terapéutico para tratar TFNA.

Ejemplo 2

Un nuevo anticuerpo monoclonal humano recombinante específico de HPA-1a es una herramienta útil para el diagnóstico en la trombocitopenia aloinmune fetal y neonatal

5

Introducción

Actualmente, no existe una prevención o tratamiento seguro y efectivo de la afección y la mayoría de los casos de TFNA se diagnostican después del nacimiento de un niño con trombocitopenia grave. Será importante identificar a las mujeres en riesgo de inmunización que podrían beneficiarse del tratamiento profiláctico.

Varios estudios prospectivos descubrieron que los altos niveles de anticuerpos maternos anti-HPA-1a se correlacionan con un recuento bajo de plaquetas en el recién nacido. Por lo tanto, la cuantificación de anticuerpos anti-HPA-1a puede usarse como factor predictivo del grado de trombocitopenia en el recién nacido. El Instituto Nacional de Estándares y Control Biológico (NIBSC) preparó el material de referencia utilizado actualmente para la cuantificación de anticuerpos anti-HPA-1a. Este estándar NIBSC contiene plasma de seis donantes inmunizados con HPA-1a y su suministro depende de la disponibilidad de dichos donantes.

En los presentes estudios, se ha generado un nuevo anticuerpo monoclonal humano recombinante específico de HPA-1a, el clon 26,4. Este mAb se puede usar como reactivo para el fenotipo HPA-1, así como un estándar para la cuantificación de anticuerpos anti-HPA-1a.

El objetivo del estudio fue evaluar si el mAb humano específico de HPA-1a, clon 26,4, puede distinguir los antígenos HPA-1a y HPA-1b en un ensayo de citometría de flujo sanguíneo completo. El segundo objetivo fue evaluar si este mAb se puede usar como estándar para el ensayo cuantitativo de MAIPA.

Materiales y procedimientos**Muestras de sangre de donantes**

30

Se obtuvo sangre periférica de voluntarios donantes de sangre sanos al azar que acordaron donar muestras que podrían usarse para fines de investigación (Banco de Sangre, Hospital Universitario del Norte de Noruega). Las mujeres inmunizadas con HPA-1a donaron sangre después de firmar un consentimiento informado por escrito (el estudio fue aprobado por el Comité Regional de Ética de Investigación Médica, Norte de Noruega, aprobación n°: 2009/1585).

Anticuerpos

Se generó un mAb IgG1 específico de HPA-1a, clon 26,4, por immortalización de células B de memoria específicas de antígeno de una mujer HPA-1a inmunizada en relación con el embarazo y expresada de forma recombinante. El IgG1 se purificó del sobrenadante del cultivo celular mediante precipitación con sulfato de amonio saturado al 40 % seguido de cromatografía de afinidad con proteína G (proteína G Sepharose 4 FastFlow, GE Healthcare).

El reactivo de referencia internacional establecido por la OMS para la cuantificación de anticuerpos anti-HPA-1a se obtuvo del Instituto Nacional de Estándares y Controles Biológicos (NIBSC, código 03/152) (Allen D, et al. Vox Sanguinis. 2005;89(2):100-4).

Genotipado HPA-1

Las muestras de donantes se genotiparon con HPA-1 usando el ensayo de nucleasa TaqMan 5' como se describió anteriormente (Bugert P, McBride S, Smith G, Dugrillon A, Klüter H, Ouwehand WH, et al. Transfusion. 2005;45(5):654-9).

Fenotipo HPA-1 por citometría de flujo sanguíneo completo

55

El mAb 26,4 IgG1 purificado se conjugó con el colorante fluorescente Alexa Fluor 488 según las instrucciones del fabricante (Molecular Probes). El grado de marcado (DOL) se calculó utilizando la fórmula: colorante molar/proteína molar. Cuarenta microlitros del mAb diluido en PBS que contenía 0,3 % de EDTA y 0,2 % de BSA se añadieron a 10 µl de sangre completa anticoagulada con EDTA y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de agregar 0,5 ml de PBS 0,3 % EDTA 0,2 % BSA buffer, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (FACSCanto, BD Biosciences). Las plaquetas HPA-1aa y HPA-1bb se usaron como controles. Se registraron las intensidades medias de fluorescencia FITC (MFI) de los controles y cada muestra. Los datos de

citometría de flujo fueron analizados por el software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EE. UU.). Las muestras de sangre fueron fenotipadas con HPA-1 dentro de los 10 días de almacenamiento, ya que las muestras más antiguas eran viscosas y difíciles de pipetear.

5 Prueba de mAb 26,4 como estándar para la cuantificación de anticuerpos anti-HPA-1a por MAIPA

El mAb 26.4 IgG1 purificado se intercambi6 con tamp6n en soluci6n salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía azida s6dica al 0,02 % y se añadi6 albúmina de suero bovino (BSA) a una concentraci6n del 0,5 %. La concentraci6n de mAb se determin6 mediante ELISA, como se describe en el ejemplo 1. El mAb26.4 se cuantific6 mediante el ensayo de inmovilizaci6n de antígenos de plaquetas con anticuerpos monoclonales (MAIPA) con CD61 de rat6n antihumano, clon Y2/51 (Dako, Dinamarca), utilizado como anticuerpo de captura (Killie MK, Salma W, Bertelsen E, Skogen B, Husebekk A. 2010;43(2):149-54.). MAIPA fue descrita originalmente por Kiefel *et al.* (*supra*); NIBSC (ensayo r6pido modificado MAIPA modificado) recomienda el protocolo r6pido modificado con los reactivos. <http://www.nibsc.org> y Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, Golebiowska E, Randen I, Hauge R, et al. Blood. 2007;110(3):833-9.

Las r6plicas de las diluciones de duplicaci6n (1:8 - 1:512) del est6ndar policlonal internacional anti-HPA-1a NIBSC junto con la preparaci6n de mAb 26.4 se usaron para crear una curva est6ndar lineal. Se analizaron cuatro muestras de plasma con diferentes niveles de anticuerpos anti-HPA-1a contra plaquetas HPA-1aa. Los niveles de anticuerpos específcos en las muestras se calcularon usando una ecuaci6n de regresi6n lineal.

Para evaluar la variabilidad (precisi6n) dentro del ensayo, las muestras se analizaron por triplicado. El coeficiente de variaci6n del ensayo interno (CV del ensayo interno) es el promedio de los CV individuales y se calcula utilizando la f6rmula: $\%CV = \text{Media de DE} \times 100 / \text{Media}$.

Para evaluar la variabilidad entre ensayos (reproducibilidad), el ensayo se repiti6 tres veces. Se expresa mediante el coeficiente de variaci6n entre ensayos (CV entre ensayos) y se calcula con la siguiente f6rmula: $\%CV = \text{DE de media} \times 100 / \text{Media}$.

Resultados

30 El MAb 26,4 IgG1 es un reactivo de fenotipo HPA-1a potencial

Para probar si el mAb 26.4 IgG1 puede distinguir entre las plaquetas HPA-1a y HPA-1b en muestras de sangre completa, primero, marcamos fluorescentemente el mAb con el colorante AlexaFuor 488. El grado de etiquetado (DOL) se calcul6 en alrededor de 3 (recomendado por el fabricante, el DOL 6ptimo debería ser ~2 fluor6foros por anticuerpo). Determinamos la cantidad de mAb conjugado con AlexaFuor 488 que nos permiti6 distinguir las muestras positivas para HPA-1a de las negativas (Figura 8).

Fenotipamos 143 muestras de sangre de donantes (muestras de donantes aleatorias junto con muestras de individuos con genotipo HPA-1 conocido, Tabla A).

Tabla A. Muestras de sangre de donantes genotipadas y fenotipadas HPA-1.

Número total de muestras	HPA-1aa	HPA-1ab	HPA-1bb
143	98	30	15

45 Las intensidades de fluorescencia FITC (MFI) medias registradas de todas las muestras positivas para HPA-1a fueron significativamente más altas (5 veces o más) que la MFI de las muestras HPA-1a negativas. Todas las muestras de sangre fueron genotipadas con HPA-1. En la recolecci6n de muestras de sangre analizadas, no detectamos discrepancias fenotipo-genotipo.

50 El MAb 26,4 IgG1 se puede usar como est6ndar para la detecci6n y cuantificaci6n de anticuerpos anti-HPA-1a mediante el ensayo MAIPA

Para evaluar el uso de mAb 26,4 IgG1 como est6ndar en MAIPA cuantitativa, alineamos MAb 26,4 IgG1 con el est6ndar policlonal internacional anti-HPA-1a NIBSC. A una concentraci6n de 5 µg/ml, el mAb tenía una actividad anti-HPA-1a correspondiente a 100 UI/ml.

Comparamos las gráficas generadas por los valores medios de absorbancia para replicar las diluciones duplicadas del est6ndar policlonal internacional anti-HPA-1a NIBSC y el est6ndar mAb 26,4 IgG1 en el ensayo MAIPA. La linealidad y el rango de los dos est6ndares fueron comparables (Figura 9). Se usaron las porciones lineales de los gráficos para

determinar los niveles de anti-HPA-1a de las muestras. Los valores medios de las actividades anti-HPA-1a en las muestras A, B, C y D medidos en tres ensayos se presentan en la Figura 10.

La variación intra ensayo describe la variación de resultados dentro de un conjunto de datos obtenido de un experimento (precisión). Se calculó que los CV intraensayo ($n=12$) eran de alrededor del 6 % para ambos, NIBSC y mAb 26,4. La variación entre ensayos describe la variación de los resultados obtenidos de experimentos repetidos (reproducibilidad). Se calculó que los CV interensayo ($n=3$) eran de alrededor del 9 % y del 10 % para ambos, NIBSC y mAb 26,4.

10 Análisis de resultados

Existe una demanda de un reactivo que pueda usarse para establecer una técnica simple y confiable para identificar individuos HPA-1a negativos. Las técnicas de genotipado HPA-1a son confiables pero requieren mucho tiempo o requieren equipos sofisticados. El ensayo basado en ELISA disponible comercialmente es costoso y poco confiable debido a resultados falsos positivos. Los dos ensayos basados en citometría de flujo publicados anteriormente se basan en el anticuerpo SZ21. El mAb SZ21 es pseudoespecífico para el HPA-1a; se une a las plaquetas negativas para HPA-1a en concentraciones crecientes de anticuerpos. Un mAb altamente específico para HPA-1a sería ventajoso para los ensayos de fenotipado que reducen la probabilidad de resultados falsos positivos.

Para validar si un nuevo mAb 26,4 específico de HPA-1a humano puede distinguir HPA-1a del alotipo -b en muestras de sangre completa, fenotipamos 143 muestras de sangre completa HPA-1 usando el conjugado de fluoróforo 26,4 y no encontramos discrepancias de fenotipo-genotipo. El fenotipo de HPA-1 basado en citometría de flujo sanguíneo completo usando este mAb es una técnica rápida y confiable adecuada para fines de detección.

El fenotipado puede complementarse con el genotipado de las muestras HPA-1a negativas identificadas.

La cuantificación de los anticuerpos anti-HPA-1a tiene un valor predictivo en el diagnóstico de TFNA. El material de referencia disponible de NIBSC anti-HPA-1a (código NIBSC: 03/152) consiste en plasma agrupado de seis donantes inmunizados con HPA-1a y su suministro depende de la disponibilidad de dichos donantes. Razonamos que el anticuerpo monoclonal recombinante facilitaría un suministro ilimitado de un reactivo estandarizado y relativamente económico. Encontramos que el 26,4 muestra una alta precisión y reproducibilidad, similar al material de referencia NIBSC, cuando se usa como estándar para la cuantificación de muestras con diferentes niveles de anticuerpos anti-HPA-1a.

35 Ejemplo 3

El MAb 26,4 inhibe la unión de la IgG policlonal anti-HPA-1a a las plaquetas

Ensayo de inhibición de MAIPA

El fragmento MAb 26,4 $F(ab')_2$ se preparó utilizando el Kit de preparación Pierce $F(ab')_2$ (Pierce, Appleton, WI). La concentración del fragmento purificado $F(ab')_2$ (0,7 mg/ml) se determinó mediante espectrofotometría a partir de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de $1,4 \text{ L} \times \text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. La capacidad de 26,4 para bloquear la unión de anticuerpos policlonales maternos anti-HPA-1a IgG se evaluó mediante una adaptación modificada de la técnica MAIPA (Griffin H, Ouwehand W. 1995. Blood 86: 4430-6). En pocas palabras, se incubaron plaquetas frescas homocigóticas HPA-1a (2×10^7) con 50 μl de 26,4 $F(ab')_2$ durante 1 hora a temperatura ambiente antes de agregar 100 μl de muestras de suero diluidas 1:10 durante 15 minutos. Además, el ensayo MAIPA se realizó como se describió anteriormente (Kiefel V et al. 1987. Blood 70: 1722-6; Killie MK et al. 2010. Transfusion and Apheresis Science 43: 149-54). Probamos un panel de 10 muestras de suero de donante con actividad anti-HPA-1a que oscila entre 10 y 150 UI/ml, medida por MAIPA cuantitativa (Killie MK et al. 2010. Transfusion and Apheresis Science 43: 149-54).

Un posible uso terapéutico del mAb 26,4 implicaría bloquear el acceso de los anticuerpos patógenos anti-HPA-1a a las plaquetas fetales. Por lo tanto, probamos la capacidad de 26,4 para inhibir la unión de IgG policlonal materna anti-HPA-1a utilizando la técnica MAIPA. La unión a plaquetas homocigotas HPA-1a en 10 de 10 muestras se inhibió considerablemente después de la incubación previa de plaquetas con fragmento 26,4 $F(ab')_2$. La inhibición varió de 65 % a 100 % a una concentración de fragmento más alta de 35 μg en un volumen de 50 μl (Figura 11). Se utilizó el software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA) para presentar los datos del ensayo de inhibición MAIPA.

Sin limitarse a la teoría, se cree que los anticuerpos que tienen una función efectora reducida o eliminada (por ejemplo, un fragmento $F(ab')_2$ de 26,4) sería útil en el tratamiento con TFNA ya que dichos anticuerpos atravesarían la placenta y se unirían a las plaquetas fetales, lo que dificultaría la unión de los anticuerpos IgG anti-HPA-1a maternos funcionales y protegería los tejidos y las plaquetas fetales de los anticuerpos anti-HPA-1a maternos potencialmente dañinos. La

demostración de que el mAb 26,4 puede bloquear eficazmente la IgG policlonal materna específica de HPA-1a de varios donantes de plaquetas de unión sugiere que el mAb también podría interferir con la unión a receptores en clones de células B específicas de HPA-1a en mujeres susceptibles a la inmunización.

5 **Ejemplo 4**

ELISA de péptido de eliminación de dominio

Los anticuerpos anti-HPA-1a son heterogéneos en su huella en la integrina β_3 y se clasifican como anticuerpos tipo I y tipo II (Liu LX et al., Blood, 1996;88(9):3601-7; Valentin N et al., Blood, 1995;85(11):3028-33; Stafford P et al. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008;6(2):366-75). Los anticuerpos tipo I se unen a los residuos dentro del dominio plexina/semaforina/integrina (PSI), los primeros 54 residuos de la integrina β_3 que contiene el polimorfismo HPA-1 en la posición 33. El epítipo de los anticuerpos tipo II se extiende a los residuos distantes del dominio PSI: los dominios del factor de crecimiento epidérmico (EGF) e híbrido.

Se decidió probar si el epítipo 26,4 está restringido al dominio PSI o si abarca varios dominios de la integrina β_3 . Para estudiar esto, se empleó la técnica ELISA de péptido de eliminación de dominio descrita anteriormente (Stafford P et al. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008;6(2):366-75).

20 **Materiales**

Anticuerpos

Se usaron clones específicos de mAb murino Y2/51 específicos de integrina β_3 (Beckman Coulter, Pasadena, CA) y SZ21 (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se usó el clon de α IIb mAb específico de integrina SZ22 (Beckman Coulter, Pasadena, CA). El clon de mAb humano específico para HPA-1a, B2G1 se aisló de las células B maternas de un caso de TFNA usando la presentación en fagos (Griffin H, Ouwehand W, Blood 1995;86(12):4430-6) y producido de forma recombinante (Garner et al., British Journal of Haematology, 2000;108(2):440-7) (amablemente proporcionado por Cedric Ghevaert, Departamento de Hematología, Facultad de Medicina Clínica, Universidad de Cambridge, Reino Unido). El MAb 26,4 deriva de una sola célula B aislada de una mujer inmunizada con HPA-1a en relación con el embarazo (descrita en esta solicitud). Como anticuerpos secundarios se usaron IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) e IgG antihumana de cabra conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, West Grove, PA).

35 **Péptidos recombinantes con dominio eliminado**

Se usaron los siguientes péptidos: $\Delta\beta$ A-Leu33, $\Delta\beta$ A-Pro33, PSI-Leu33 y GPVI (hDID2) como control negativo (péptidos amablemente proporcionados por Rosey Mushens, International Blood Group Reference Laboratory, NHS Blood and Transplant, Filton, Bristol, Reino Unido; Winnie Chong, Departamento de histocompatibilidad e inmunogenética, NHS Blood and Transplant, Colindale Avenue, Londres, Reino Unido; Willem H Ouwehand, Universidad de Cambridge & Wellcome Trust Sanger Institute, NHS Blood and Transplant, Reino Unido; Stafford P et al. describir estos péptidos en Revista de trombosis y hemostasia, 2008; 6 (2): 366-75) El péptido de unión a CaM N9A acoplado a BSA fue amablemente proporcionado por Peter Smethurst y Nicola Foad (descrito por Smethurst PA et al., Blood 2004; 103 (3): 903-11).

45

Procedimientos

La clonación, expresión y purificación de los péptidos de eliminación de dominios recombinantes con la etiqueta calmodulina (CaM) se describe en Stafford et al. (Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008;6(2):366-75). ELISA se realizó como se describió anteriormente (Abou-Chaker K et al., Tissue Antigens 2009;73(3):242-4). Brevemente, los péptidos β_3 se inmovilizaron en placas ELISA mediante péptido de unión a CaM N9A acoplado a BSA (Smethurst PA et al., Blood 2004; 103(3):903-11). Se utilizaron mAb murinos y humanos a concentraciones de 1 y 10 μ g/ml. La unión de MAb se detectó mediante IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP o IgG de cabra antihumano conjugada con HRP. La absorbancia a 492 nm se leyó en un fotómetro de microplaca (Multiskan EX, Thermo Scientific, Waltham, MA). Cada muestra se probó por duplicado y se usaron valores de absorbancia promedio para generar el gráfico (Figura 12 y Figura 13).

Resultados

La unión de los mAbs murinos, los clones Y2/51 y SZ21, a péptidos de eliminación de dominio se publicó anteriormente (Stafford P et al., Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008;6(2):366-75) y se utilizó como control del sistema. El MAb Y2/51 a concentraciones de 1 y 10 μ g/ml se unió al péptido multidominio $\Delta\beta$ A, Leu33 y Pro33, variantes. El MAb

SZ21 a 1 µg/ml unido a ΔβA-Leu33, cuando se unió a ΔβA-Pro33 y PSI-Leu33, generó una respuesta relativamente baja. MAb SZ21 a 10 µg/ml de péptidos multidominio unidos ΔβA, independientemente de la variante Leu33 o Pro33, así como un péptido de dominio único PSI-Leu33. Ninguno de los mAbs se unió al péptido de control. Los resultados fueron consistentes con los publicados anteriormente (Stafford P et al. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 5 2008;6(2):366-75). Se usó MAb SZ22 (específico para αIIb, CD41) como control negativo de mAb murino y no se unió a ninguno de los péptidos (datos no mostrados).

MAb 26,4 unido exclusivamente al péptido multidominio ΔβA-Leu33; no se observó unión al ΔβA-Pro33, el péptido de dominio único PSI-Leu33 o el control negativo del péptido. MAb B2G1 tenía un patrón de unión idéntico, consistente 10 con los resultados publicados anteriormente (Stafford P et al. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008;6(2):366-75).

Los resultados descritos anteriormente sugieren que el epítipo del 26,4 abarca varios dominios de integrina β₃, y 26,4 es un anticuerpo anti-HPA-1a tipo II.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Tromso, Hospital Universitario del Norte de Noruega, Michaelsen, Terje Ihle, Oistein

20

<120> Anticuerpos contra HPA-1a

<130> 59.15.115553/03

25

<150> GB1405775.6

<151> 31/03/2014

<150> GB1417614.3

<151> 06/10/2014

30

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

35

<210> 1

<211> 405

<212> ADN

<213> humano

40

<400> 1

caggtacagt tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctgtcactc	60
acctgtgcc a tctccgggga cagtgtcagc agcaacagtg ctgcttggaa ctggatcagg	120
cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat acttcaggtc caactggtac	180
aatgattatg cagcatctgt gaaaagtcga ataaccatca accaagacac atccaagaac	240
cagctctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctatgta ttactgtgca	300
agagatgggg cctgggggtgg cagcagctgg tggccaggcc ttcctcacca ctactactct	360
ggatggacg tctggggcca ggggaccacg gtcaccgtct cctca	405

<210> 2

45

<211> 324

<212> ADN

<213> humano

ES 2 757 596 T3

<400> 2

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcattgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaagcct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaaa gggccactgg catcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcagtctca ccatcagaag cctcagagcct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacag cgtagcgact ggccagggact cactttcggc      300
ggagggacca aggtggagat caaaa                                           324
    
```

5 <210> 3
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> humano

10 <400> 3

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1          5          10          15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20          25          30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35          40          45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Phe Arg Ser Asn Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50          55          60

Ala Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Gln Asp Thr Ser Lys Asn
65          70          75          80

Gln Leu Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Met
85          90          95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ala Trp Gly Gly Ser Ser Trp Trp Pro
100         105         110

Gly Leu Pro His His Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
115         120         125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130         135
    
```

<210> 4

ES 2 757 596 T3

<211> 108
<212> PRT
<213> humano

5 <400> 4

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Gln Gly
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
10 <211> 10
<212> PRT
<213> humano

<400> 5
15

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 9
20 <212> PRT
<213> humano

<400> 6

Thr Tyr Phe Arg Ser Asn Trp Tyr Asn
1 5

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
30 <213> humano

ES 2 757 596 T3

<400> 7

Ala Arg Asp Gly Ala Trp Gly Gly Ser Ser Trp Trp Pro Gly Leu Pro
1 5 10 15

His His Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val
20 25

5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> humano

10

<400> 8

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

15

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> humano

20 <400> 9

Asp Ala Ser
1

25

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> humano

30

<400> 10

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Gln Gly Leu Thr
1 5 10

35

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> humano

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

40

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser
20 25

<210> 12

ES 2 757 596 T3

<211> 17
<212> PRT
<213> humano

5 <400> 12

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 13
10 <211> 38
<212> PRT
<213> humano

<400> 13
15

Asp Tyr Ala Ala Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Gln Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
35

<210> 14
20 <211> 11
<212> PRT
<213> humano

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25

<210> 15
30 <211> 26
<212> PRT
<213> humano

<400> 15

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25

35

<210> 16
<211> 17

ES 2 757 596 T3

<212> PRT
<213> humano

<400> 16

5

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 17
<211> 36
10 <212> PRT
<213> humano

<400> 17

Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

15

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
20 <213> humano

<400> 18

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

25

<210> 19
<211> 1398
<212> ADN
<213> humano

30

<400> 19

ES 2 757 596 T3

caggtgcagc tgcagcagtc cggccctggg ctggtgaagc ctagccagac cctgtccctg 60
 acatgcgcca tctcaggcga cagcgtgagc tccaactctg ccgcttgaa ttggattaga 120
 cagagcccat cccgcgggct ggagtggctg ggacggacct acttcagaag caactggtac 180
 aatgactatg ccgcttccgt gaagtctcgg atcaccatta accaggatac atctaaaaat 240
 cagctgagtc tgcagctgaa ctcaagtact cccgaagaca ccgcatgta ctattgtgct 300
 agggatggcg cttggggcgg gtctagttgg tggccaggac tgccccacca ttactatagc 360
 ggcatggacg tgtggggaca gggcaccaca gtgacagtgt caagcgccag cactaagggc 420
 ccttccgtgt ttcctctggc tccatcctct aaatctacaa gtggaggcac tgccgctctg 480
 ggggtgtctg tgaaggatta tttccctgag ccagtgactg tgagttgaa ctcaggcgcc 540
 ctgactagcg ggggtcacac ctttcccgtg gtgctgcaga gttcagggct gtacagcctg 600
 agctccgtgg tgaccgtgcc ttctagttca ctgggaactc agacctatat ctgcaacgtg 660
 aatcacaagc cttctaatac aaaagtggac aagaaagtgg agccaaagag ttgtgataaa 720
 acacatactt gccctccctg ccctgccctt gaactgctgg gcggcccaag cgtgttcctg 780
 tttccacca agcccaaaga tacaactgatg attagccgga ctccggaggt cacatgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga ggatcctgaa gtgaagttca actggtacgt ggacggcgctg 900
 gaagtgcata atgccaagac caaaccacgg gaggaacagt acaactctac atatagagtg 960
 gtgagtgtgc tgactgtgct gcaccaggat tggctgaacg ggaaagagta taagtgcaaa 1020
 gtgagcaata aggccctgcc tgctccaatc gagaaaacca tttccaaggc caaaggacag 1080
 cccagggaac ctcaggtgta cacaactgcc cctagtcgcg acgagctgac taagaaccag 1140
 gtgtctctga cctgtctggt gaaaggcttc tatccatccg atatcgctgt ggagtgggaa 1200
 tctaattggc agccccgaaa caattacaag accacaccac ccgtgctgga cagcgatgga 1260
 tccttctttc tgtattcaaa gctgactgtg gacaaaagcc ggtggcagca gggcaacgtg 1320

 tttagctggt ccgtgatgca tgaggctctg cacaatcatt acaccagaa gtctctgagt 1380
 ctgtcaccgg ggaaatga 1398

<210> 20

<211> 648

5 <212> ADN

<213> humano

<400> 20

ES 2 757 596 T3

```

gagatcgtgc tgactcagtc tccagccacc ctgtccctgt ctccaggaga acgggccact      60
ctgtcttgca gagctagtca gtcagtgagc tcctacctgg cctgggatca gcagaagcca      120
ggacaggctc cccggctgct gatctacgac gcctccaaaa gggctacagg cattcccgct      180
cgcttcagcg gctccgggtc tggaacagat ttttcctga ctatcagaag cctggagcct      240
gaagacttcg ccgtgtacta ttgccagcag agatctgatt ggcaggggct gacctttggc      300
gggggaacaa aggtggagat caaaaggacc gtggccgctc caagcgtggt catctttccc      360
cctagcgacg aacagctgaa gtcagggaca gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaatttc      420
taccctcgcg aggccaaggt gcagtggaaa gtggataacg ctctgcagag tggaaattca      480
caggagagcg tgactgaaca ggactccaag gattctacct atagtctgtc tagtaccctg      540
aactgagca aagccgacta cgagaagcac aaagtgtatg cttgcgaagt gacacatcag      600
ggcctgtcaa gccctgtgac taagagcttc aaccggggcg agtgttga      648

```

<210> 21
 <211> 465
 5 <212> PRT
 <213> humano

<400> 21

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1          5          10          15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
          20          25          30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
          35          40          45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Phe Arg Ser Asn Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50          55          60

Ala Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Gln Asp Thr Ser Lys Asn
65          70          75          80

Gln Leu Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Met

```

ES 2 757 596 T3

85

90

95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ala Trp Gly Gly Ser Ser Trp Trp Pro
 100 105 110

Gly Leu Pro His His Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240

ES 2 757 596 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

ES 2 757 596 T3

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 22
<211> 215
5 <212> PRT
<213> humano

<400> 22

ES 2 757 596 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Gln Gly
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

ES 2 757 596 T3

<211> 1545
 <212> ADN
 <213> humano

5 <400> 23

caggtgcagc tgcagcagtc cgggccagga ctggtgaaac cctcacagac actgagcctg 60
 acttgtgcc a tcagtggcga ttcagtgagc tccaacagcg ccgcttgaa ttggattagg 120
 cagagtcctt cacgcggact ggaatggctg ggccggacct acttcagatc caactggtagc 180
 aatgactatg ccgccagcgt gaagtcccgg atcacaatta accaggatac ttccaaaaat 240
 cagctgtctc tgcagctgaa cagtgtgacc ccagaggaca cagccatgta ctattgcgcc 300
 agagatgggg cttggggcgg gtctagttgg tggccaggcc tgccccacca ttactatagc 360
 gggatggacg tgtggggaca ggaaccaca gtgaccgtga gcagcgcctc aaccaaaggg 420
 cctagcgtgt ttctctggc tccatgcagc aggtccactt ctggaggcac cgccgctctg 480
 ggatgtctgg tgaaggacta tttccccgaa cctgtgaccg tgtcttgaa cagtggggcc 540
 ctgacctctg gagtgcacac atttcccgt gtgctgcagt cctctggact gtacagcctg 600
 agttcagtg tgaccgtgcc aagctcctct ctgggcacac agacttatac ctgtaacgtg 660
 aatcacaagc ccagcaatac aaaggtggac aaacgggtgg agctgaaaac acctctgggc 720
 gatactacc atacttgccc acgggtgtcca gagccccaaa gctgtgacac ccctccccca 780
 tgccaagat gtctgaacc aaaatcttgt gatacacccc ctccatgccc taggtgtccc 840
 gagcctaaga gttgtgacac tccccctcca tgtcctagat gtctctgctcc ggaactgctg 900
 ggcgggtccga gcgtgtttct gttcccggcg aaaccgaaag atacctgat gattagtcgc 960
 acgccggaag ttacctgcgt ggttgtggat gtgagccatg aagaccgga agttcagttt 1020
 aaatggtatg tggatggtgt tgaagtgcac aacgcaaaaa ccaaaccgcg tgaagaacag 1080
 tacaatagca cgttccgcgt tgtgtctgtt ctgaccgtgc tgcacagga ttggctgaac 1140
 ggcaaagaat acaaatgtaa agtttctaac aaagcactgc cggcgccgat tgaaaaaacg 1200
 atcagtaaaa ccaagggca gccgcgtgaa ccgcaggtgt acaccctgcc gccgagcctg 1260
 gaagaaatga cgaaaaacca agttagtctg acctgcctgg tgaaaggctt ttaccgagc 1320
 gatattgcag tggaatggga aagctctggt cagccggaaa acaattataa taccacgccg 1380
 ccgatgctgg atagtgatgg cagctttttc ctgtatagta aactgaccgt tgataaaagc 1440
 cgttggcagc agggtaacat ctttagttgc agcgtgatgc atgaagcgt gcacaatcgc 1500
 ttcaccaga aatctctgag tctgagcccg ggcaaaggta aataa 1545

ES 2 757 596 T3

<210> 24
<211> 648
<212> ADN
5 <213> humano

<400> 24

```
gagatcgtgc tgactcagtc tccagccacc ctgtccctgt ctccaggaga acggggcact      60
ctgtcttgca gagctagtca gtcagtgagc tcctacctgg cctggatatca gcagaagcca      120
ggacaggctc cccggctgct gatctacgac gcctccaaaa gggctacagg cattcccgct      180
cgcttcagcg gctccgggtc tggaacagat ttttccctga ctatcagaag cctggagcct      240
gaagacttcg ccgtgtacta ttgccagcag agatctgatt ggcaggggct gacctttggc      300
gggggaacaa aggtggagat caaaaggacc gtggccgctc caagcgtggt catctttccc      360
cctagcgacg aacagctgaa gtcagggaca gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaatttc      420
tacccccgcg aggccaaggt gcagtggaaa gtggataacg ctctgcagag tggaaattca      480
caggagagcg tgactgaaca ggactccaag gattctacct atagtctgtc tagtaccctg      540
aactgagca aagccgacta cgagaagcac aaagtgtatg cttgcgaagt gacacatcag      600
ggcctgtcaa gccctgtgac taagagcttc aaccggggcg agtgttga      648
```

10
<210> 25
<211> 514
<212> PRT
<213> humano

15
<400> 25

ES 2 757 596 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Phe Arg Ser Asn Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60

Ala Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Gln Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

Gln Leu Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Met
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ala Trp Gly Gly Ser Ser Trp Trp Pro
 100 105 110

Gly Leu Pro His His Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

ES 2 757 596 T3

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly
 225 230 235 240

ES 2 757 596 T3

Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 245 250 255
 Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr
 260 265 270
 Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro
 275 280 285
 Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 290 295 300
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 325 330 335
 Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 340 345 350
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 355 360 365

ES 2 757 596 T3

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 370 375 380

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 385 390 395 400

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 405 410 415

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 420 425 430

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 435 440 445

Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 450 455 460

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 465 470 475 480

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

485

490

495

Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500 505 510

Gly Lys

- 5 <210> 26
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> humano

10 <400> 26

ES 2 757 596 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Gln Gly
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

ES 2 757 596 T3

<210> 27
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> humano

5

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Gly His
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Met Thr Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asn Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 28
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> humano

15 <400> 28

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

ES 2 757 596 T3

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95

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

<210> 29
 <211> 114
 5 <212> PRT
 <213> ratón
 <400> 29

Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Asn Pro Gly Ala Ser Met Lys
 1 5 10 15

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn
 20 25 30

Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
 35 40 45

Asn Pro Tyr His Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys
 50 55 60

Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 65 70 75 80

Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg
 85 90 95

Asp Ala Asn Tyr Val Phe Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

10 Val Thr
 <210> 30

ES 2 757 596 T3

<211> 102
 <212> PRT
 <213> ratón

5 <400> 30

Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
 1 5 10 15

Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Gly Val Ser Tyr Ile His Trp
 20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
 35 40 45

Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala
 65 70 75 80

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr Phe Gly
 85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que es capaz de unirse al aloantígeno HPA-1a y que no se une significativamente al aloantígeno HPA-1b, y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y al menos una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR, donde dicha región variable de la cadena ligera comprende:
- (a) una CDR1 ligera variable (LV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8,
 (b) una CDR2 LV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9, y
 10 (c) una CDR3 LV que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y donde dicha región variable de la cadena pesada comprende:
 (d) una CDR1 pesada variable (PV) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5,
 (e) una CDR2 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, y
 (f) una CDR3 PV que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.
- 15 2. El anticuerpo según la reivindicación 1, donde dicha región variable de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma y/o donde dicha región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, preferiblemente dicha región
 20 variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y dicha región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3.
3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG de longitud completa.
- 25 4. El anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.
5. El anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo
 30 biespecífico.
6. El anticuerpo según la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo
- (i) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o una secuencia que
 35 tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, o
 (ii) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma y/o una cadena ligera que comprende la secuencia
 40 de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, preferiblemente dicho anticuerpo
 (iii) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, o
 (iv) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera
 45 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.
7. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho anticuerpo es capaz de unirse a la integrina $\alpha V\beta 3$ que contiene el antígeno HPA-1a; y/o donde dicho anticuerpo permanece unido al menos en un 35 % a una integrina $\alpha V\beta 3$ purificada e inmovilizada de
 50 individuos HPA-1a positivos al final del período de disociación en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; y/o
 donde dicho anticuerpo se une a HPA-1a en plaquetas intactas; y/o
 donde dicho anticuerpo es capaz de unirse a la integrina plaquetaria $\alpha IIb\beta 3$ purificada de individuos HPA-1a positivos; y/o
 55 donde dicho anticuerpo es capaz de inducir fagocitosis de plaquetas positivas para HPA-1a; y/o
 donde dicho anticuerpo no inhibe la agregación de plaquetas HPA-1bb; y/o
 donde dicho anticuerpo tiene una función efectora reducida o eliminada.
8. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un
 60 anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Una composición que comprende uno o más anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a

7 mezclada con un diluyente, portador o excipiente adecuado.

10. Un procedimiento de fabricación de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de

5

(i) cultivar una célula huésped que comprenda una o más moléculas de ácido nucleico como se define en la reivindicación 8 o uno o más vectores de expresión recombinantes que comprendan una o más de dichas moléculas de ácido nucleico en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo codificado; y

(ii) aislar u obtener el anticuerpo o la proteína de la célula huésped o del medio de crecimiento/sobrenadante.

10

11. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en terapia, y preferiblemente dicha terapia es el tratamiento o la profilaxis de la trombocitopenia aloimmune fetal y neonatal (TFNA).

12. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en la prevención de la aloimmunización con HPA-1a en un sujeto.

13. Un procedimiento *in vitro* para detectar HPA-1a, que comprende poner en contacto una composición sospechosa de contener HPA-1a con un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en condiciones efectivas para permitir la formación de complejos de HPA-1a/anticuerpo y detectar los complejos así formados.

20

14. Un procedimiento para analizar la presencia o ausencia de HPA-1a en una muestra que se ha obtenido de un sujeto, y dicho procedimiento comprende las etapas de

(a) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que se une específicamente a HPA-1a; y

25

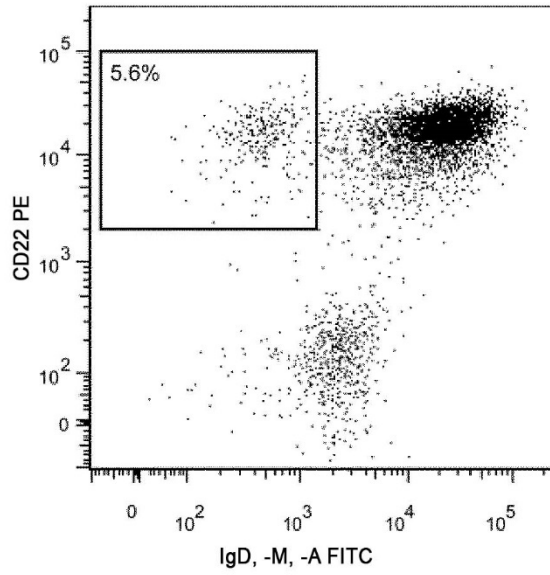
(b) analizar la presencia o ausencia de complejos de anticuerpos anti-HPA-1a-HPA-1a (antígeno),

y preferiblemente dicha muestra es una muestra que contiene plaquetas.

30 15. Uso *in vitro* de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como un estándar de referencia para cuantificar anticuerpos anti-HPA-1a en una muestra, y preferiblemente dicha muestra es una muestra de sangre completa o una muestra de plasma.

Figura 1

(A)



(B)

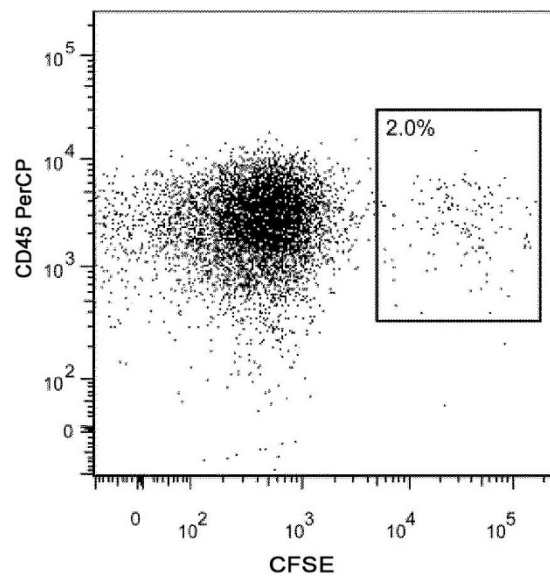


Figura 2

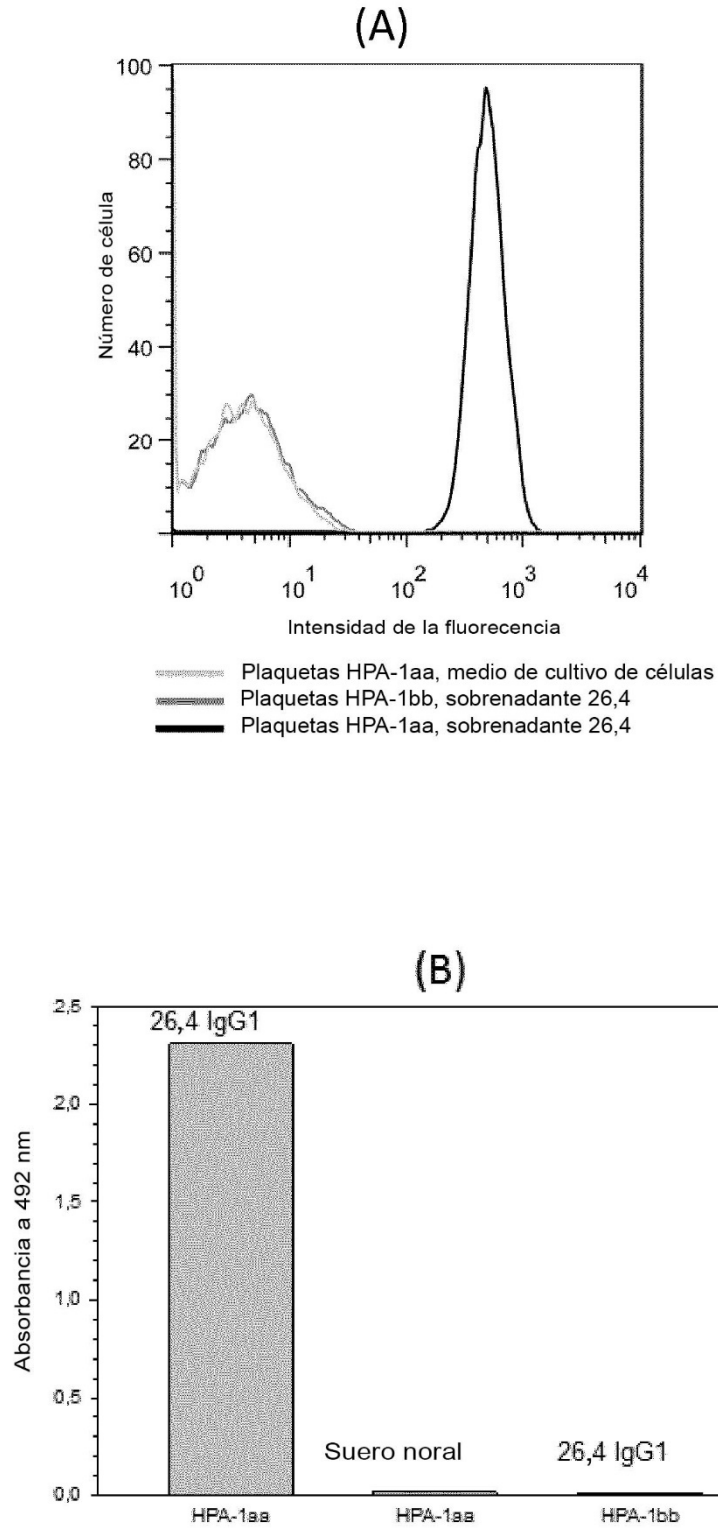


Figura 3

Cadena pesada

26,4 IGHV
 IGHV6-1*01

26,4 IGHV
 IGHV6-1*01

26,4 IGHV
 IGHV6-1*01

26,4 IGHV
 IGHV6-1*01

26,4 IGHV
 IGHV6-1*01

26,4 IGHV
 IGHV6-1*01

26,4 IGHV
 IGHV6-1*01

26,4 IGHV
 IGHV6-1*01

```

<-----FR1----->
Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q I L S L I C A
cag gta cag tgg cag tca ggt cca gga cgg gtg aag ggc tcy cag acc ctg tca ctc acc tgt gcc
-----C-----
-----FR2-----
I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S P S R G
atc tcc ggg gac agt gtc agc aac agt gct gct tgg aac tgg atc agg cag tcc cca tcy aga ggc
-----FR3-----
L E W L C R I Y F R S N W Y N D Y A A S V K S
ctt gag tgg ctg gga agy aca tac ttc agy tcc aac tgg tac aat gat tat gca gca tct gtg aaa agt
-----FR4-----
R I T I N Q D I S K N Q L S L Q L N S V T P E
cga ata acc aac caa gac aca tcc aag aac cag ctg tcc ctg cag ctg aac tct gtg act ccc gag
-----FR5-----
D T A M Y Y C A R D G A W G C S S W W P G L
gac acg gct atg tat tac tgt gca aga gat ggg gcc tgg ggt ggc agc agc tgg tgg cca ggc ctt
-----FR6-----
P R H Y Y S G M D V W G Q G I T V T V S S
cct cac cac tac tac tct ggt atg gac gtc tgg ggc cag ggg acc acg gtc acc gtc tcc taa
    
```

Continuación de la Figura 3

Cadena ligera

26,4 ICKV
 ICKV3-11+01
 E I V L I Q S P A T L S L S P G E R A T L S C
 gaa att ggg tgg aca cag tct cca gcc acc atg tca tgg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc
 ----- FRI -----

26,4 ICKV
 ICKV3-11+01
 R A S Q S V S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L
 agy gcc agt cag agt gtt agc agc kac tta gcc tgg tac cca cag aag cct ggc cag gct ccc agg ctc
 ----- FRI -----

26,4 ICKV
 ICKV3-11+01
 L I Y D A S K R A T G I P A R F S G S G S G T
 ctc atc tat gat gca tcc aaa agy gcc act ggc atc cca gcc agy ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca
 ----- FRI -----

26,4 ICKV
 ICKV3-11+01
 D F S L I I R S L E P E D F A V Y Y C Q R S
 gac ttc agt ctc acc atc aga agc ctc gag cct gaa gat ttt gaa gtt tat tac tgt caa cag cgt agc
 ----- FRI -----

26,4 ICKV
 ICKV3-11+01
 D W Q C L T F G C T K V E I K
 gac tgg cag gga ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gfg gag atc aaa
 ----- FRI -----

Figura 4

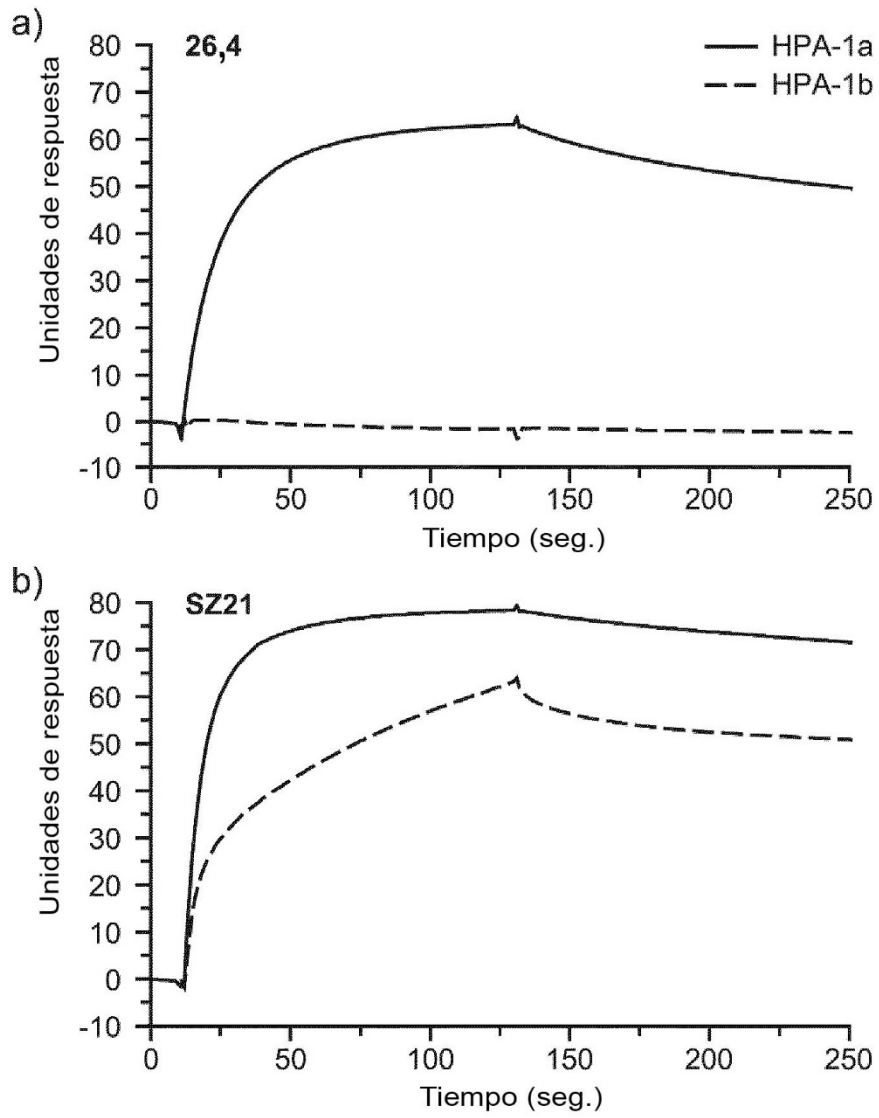
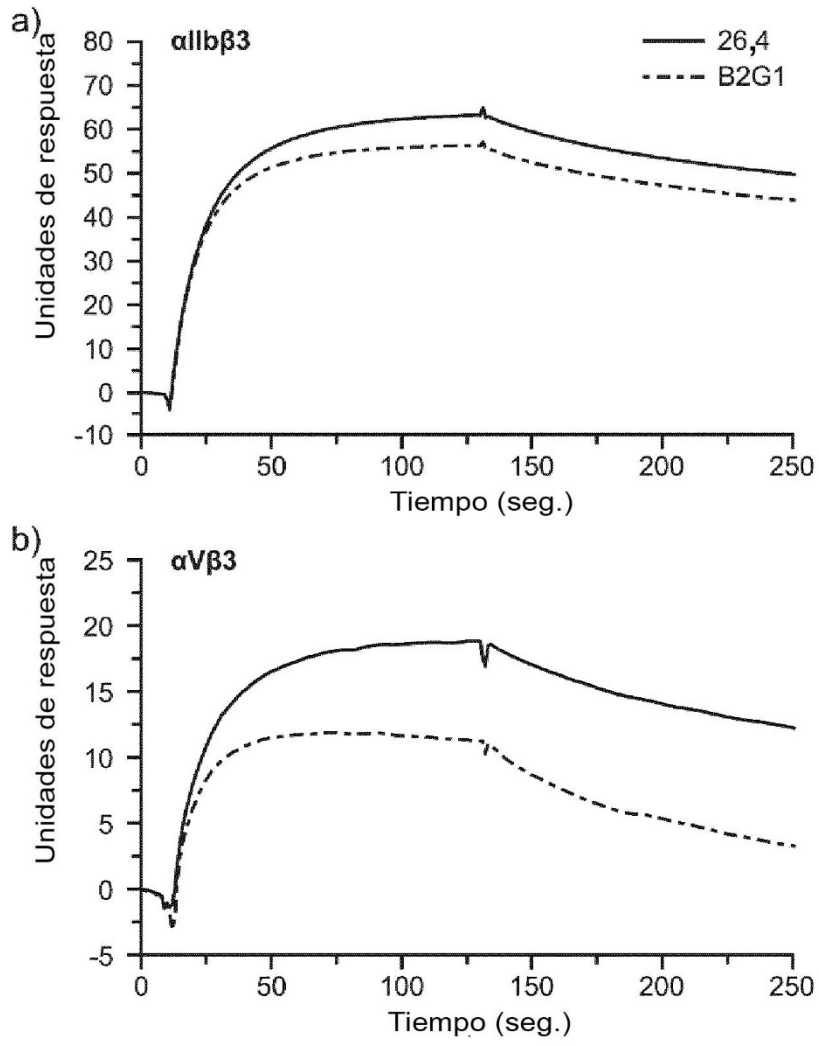
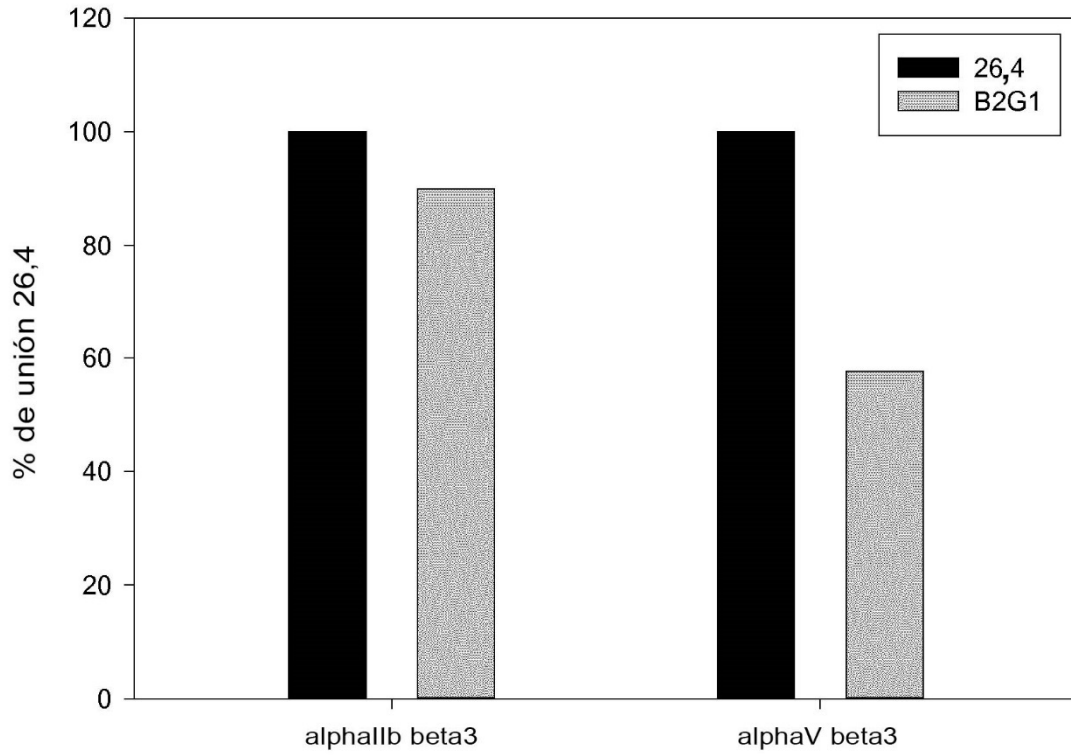


Figura 5



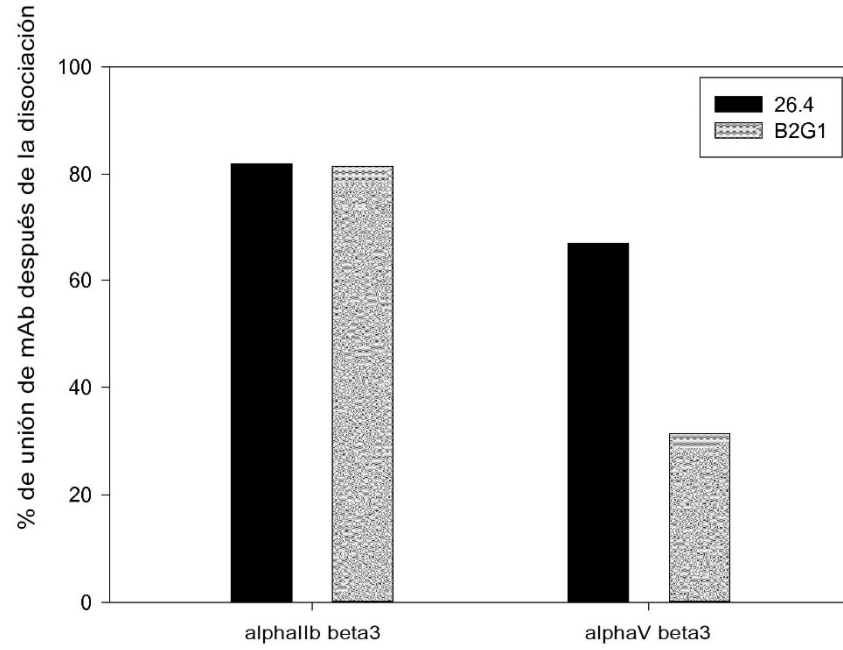
Continuación de la Figura 5

c)



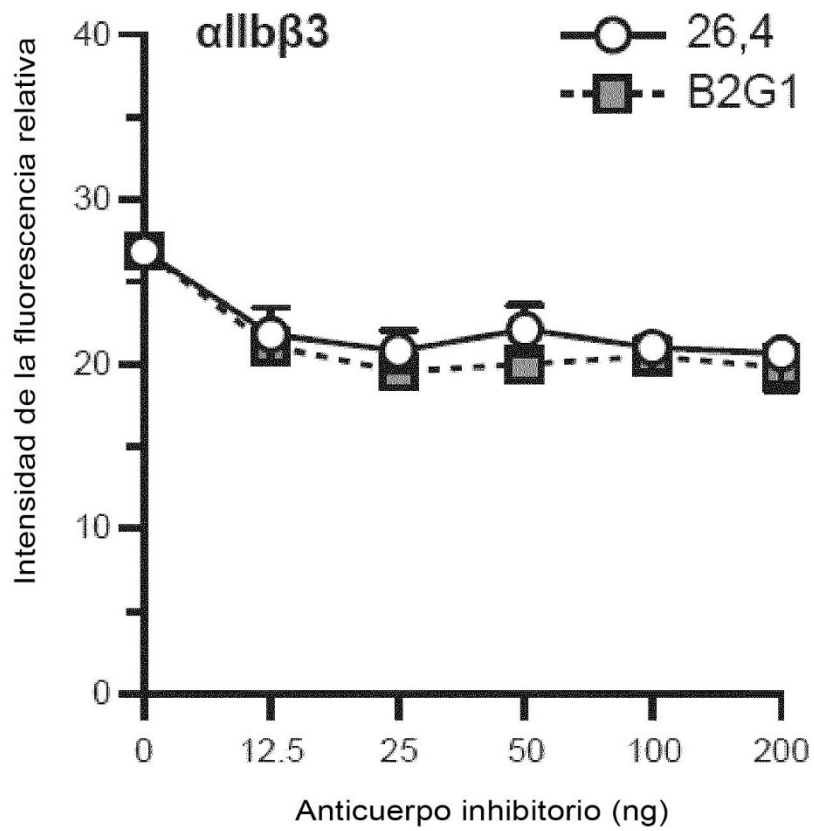
Continuación de la Figura 5

d)



Continuación de la Figura 5

e)



Continuación de la Figura 5

f)

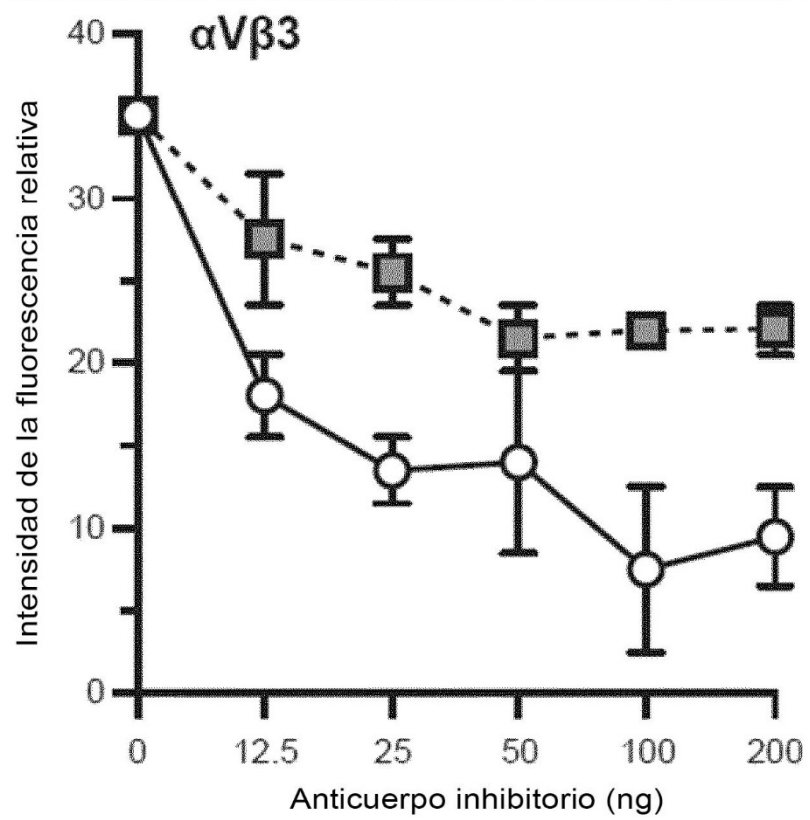
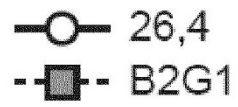


Figura 6

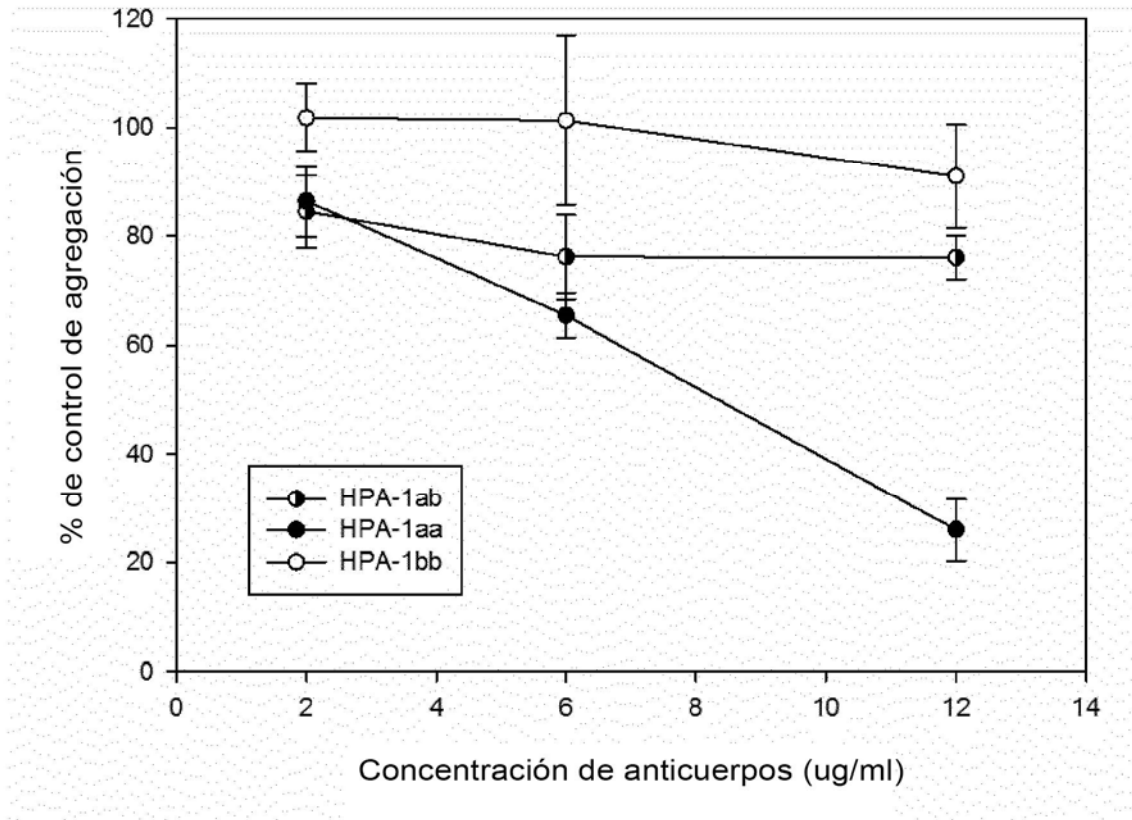


Figura 7A

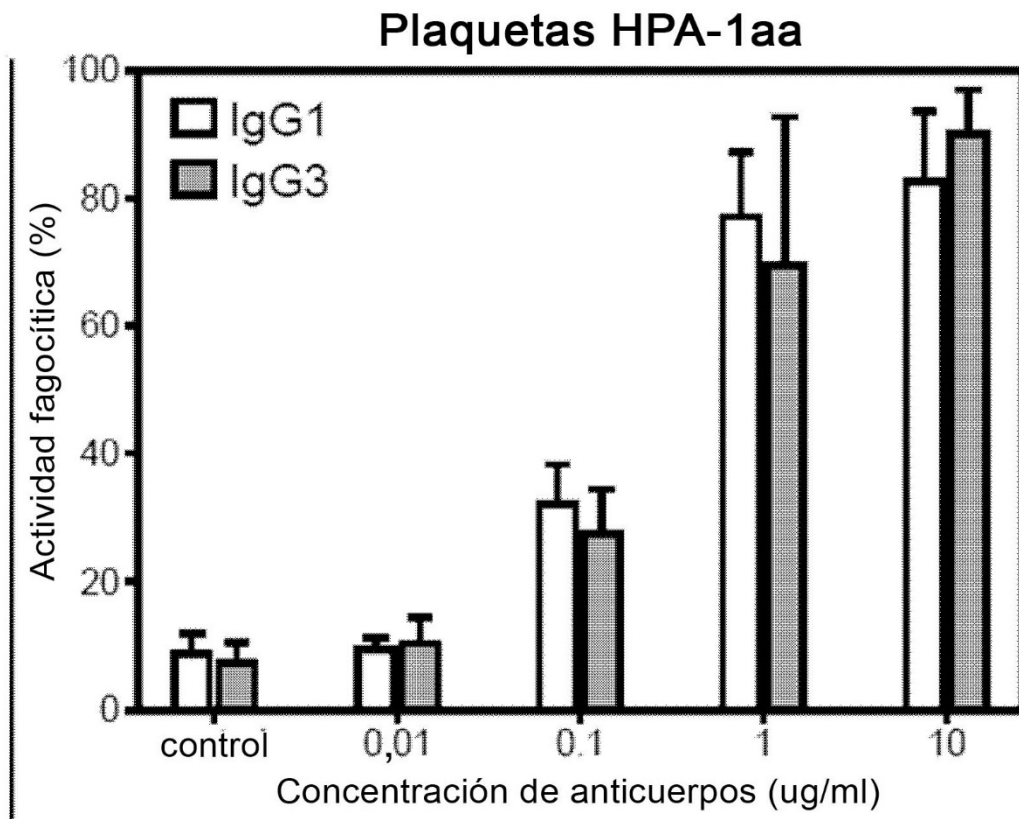


Figura 7B

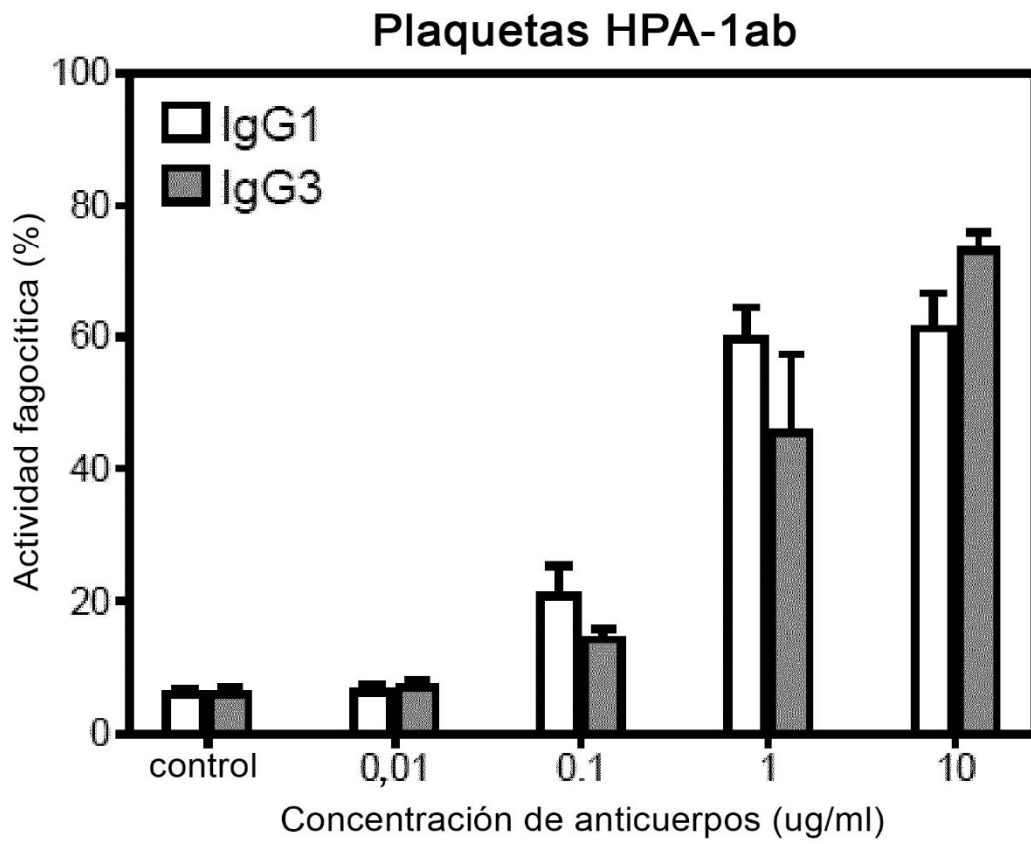


Figura 8

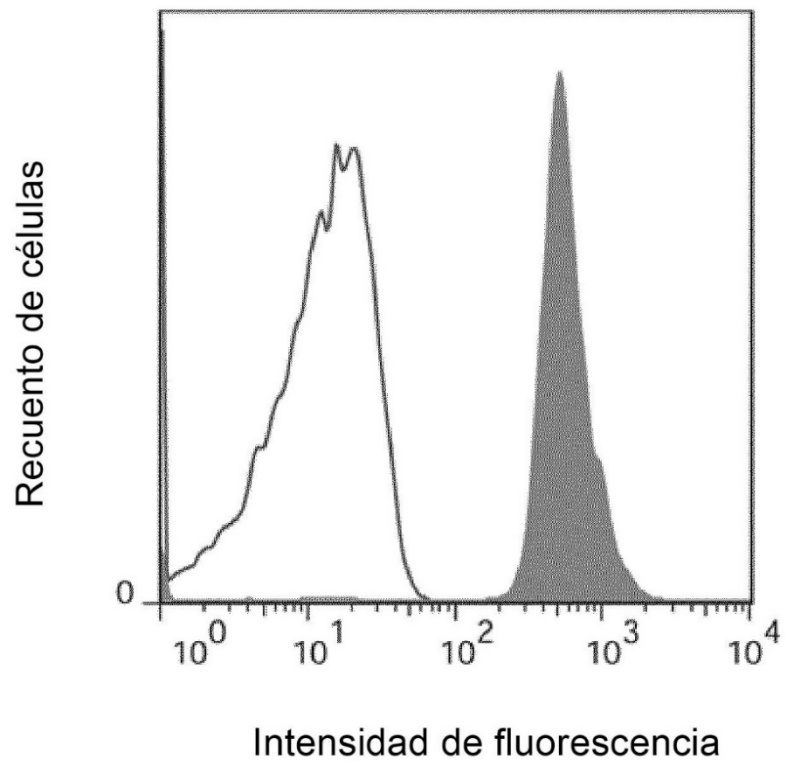
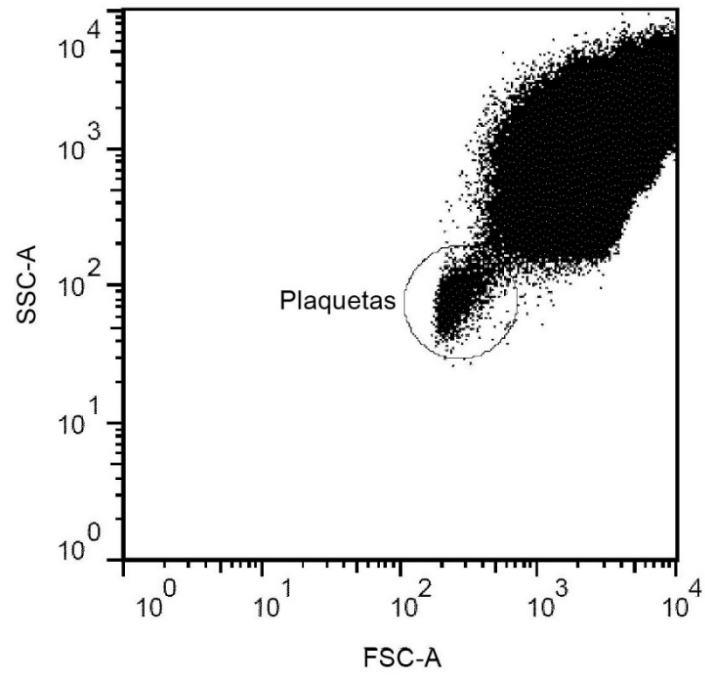


Figura 9

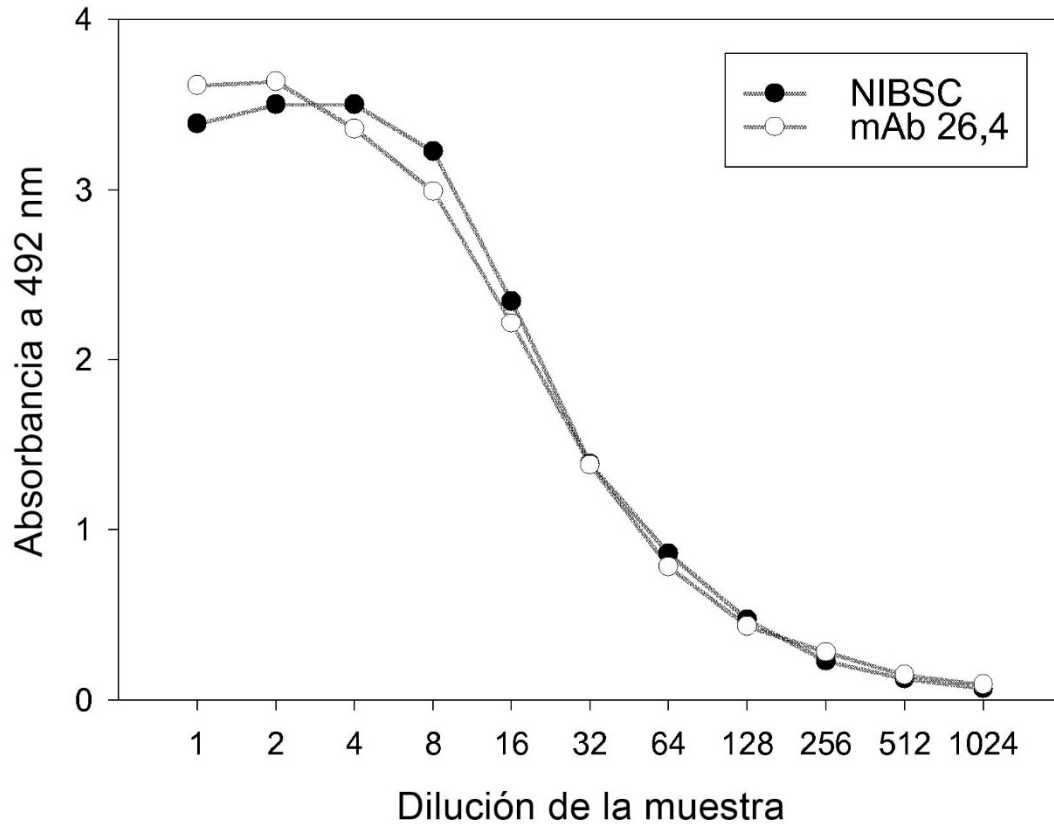


Figura 10

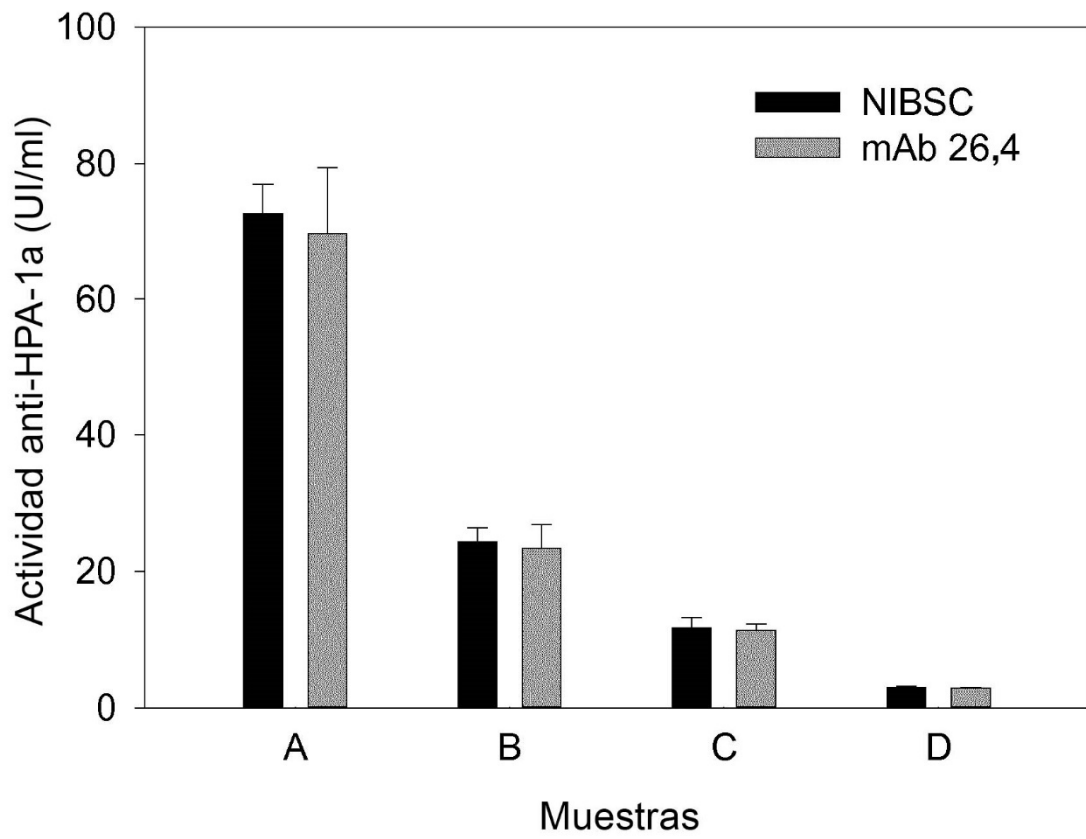


Figura 11

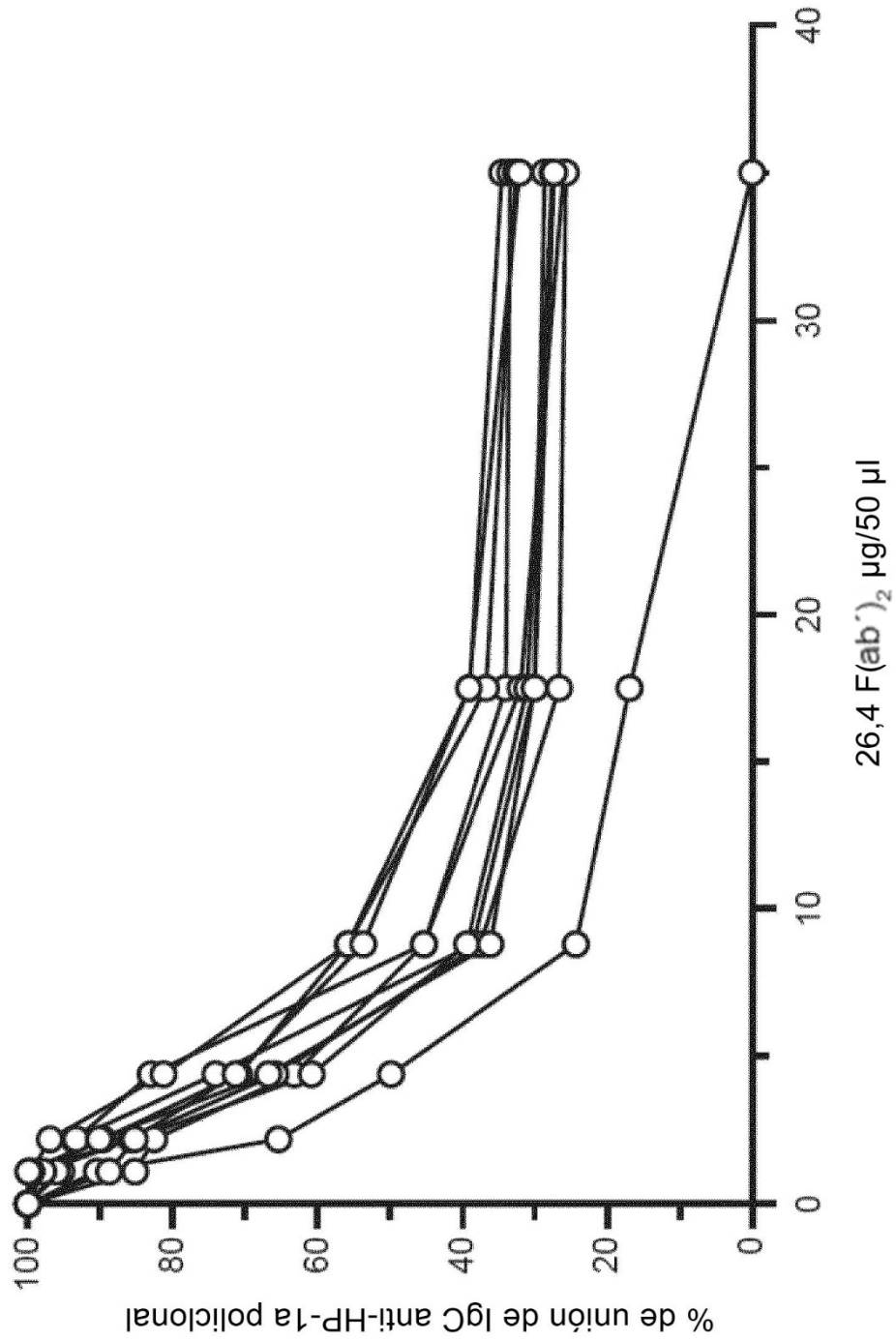


Figura 12

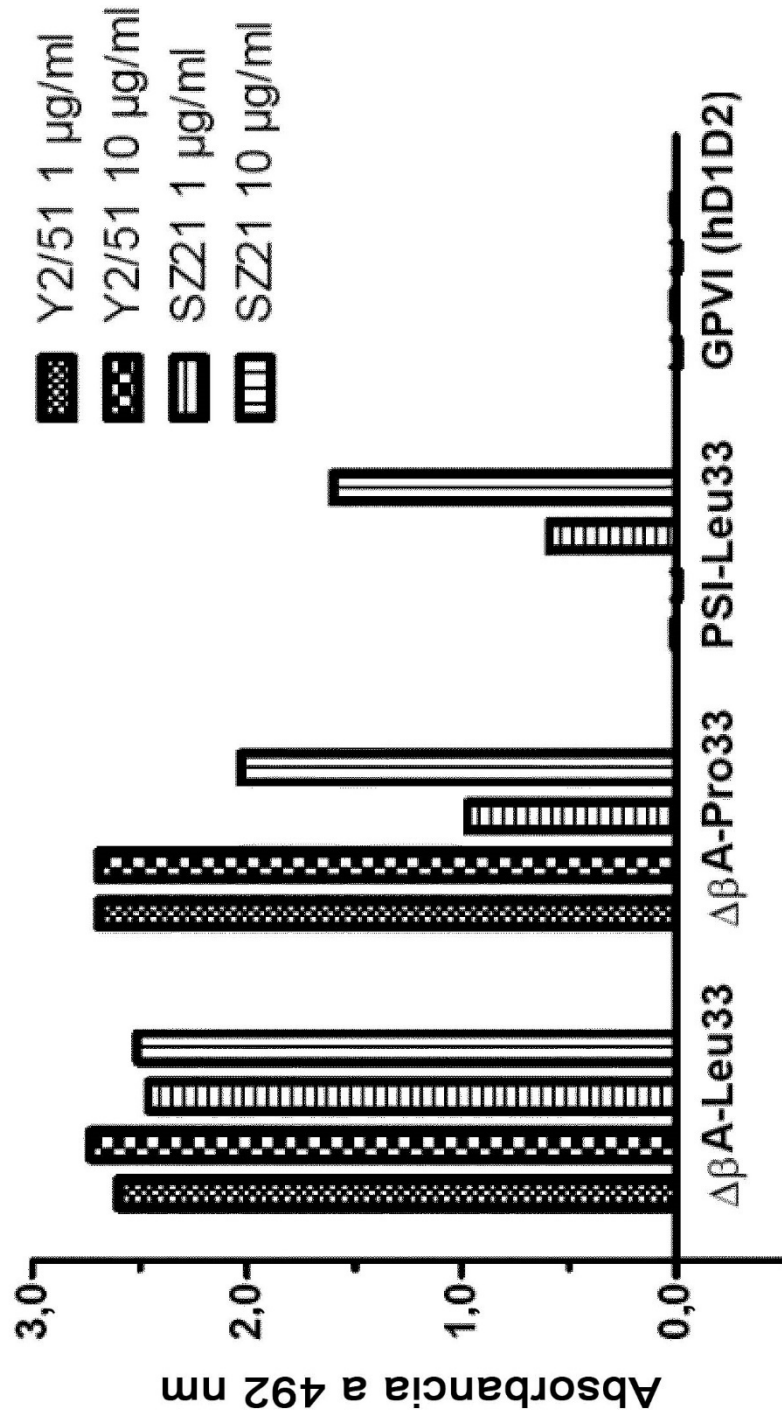


Figura 13

