

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 784**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2008 E 08701892 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2109621**

54 Título: **Polimorfismos del factor H en el diagnóstico y terapia de enfermedades inflamatorias tales como degeneración macular relacionada con la edad**

30 Prioridad:

23.01.2007 GB 0701213

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

24.06.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS
LIMITED (100.0%)
30-36 NEWPORT ROAD
CARDIFF CF24 0DE, GB**

72 Inventor/es:

**MORGAN, BRYAN PAUL;
HARRIS, CLAIR LOUISE y
HAKOBYAN, SVETLANA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 538 784 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

Polimorfismos del factor H en el diagnóstico y terapia de enfermedades inflamatorias tales como degeneración macular relacionada con la edad

5 La invención se refiere a un método de diagnóstico para determinar la existencia de un factor de riesgo para degeneración macular relacionada con la edad (AMD); un kit para el mismo y partes componentes del mismo y, en particular, anticuerpos usados en la metodología y kit anteriormente mencionados.

10 La Degeneración Macular Relacionada con la Edad es una causa habitual de ceguera y su incidencia, en el mundo occidental y en particular en Norteamérica y Europa, está aumentando, parcialmente debido a la creciente edad de la población (1). Se concluye por lo tanto que la importancia de esta enfermedad con respecto a costes en el cuidado de la salud y calidad de vida para los individuos afectados probablemente aumente durante los próximos años.

15 La enfermedad se caracteriza por la aparición de depósitos retinianos, denominados drusas, que se cree que forman una barrera entre el epitelio pigmentado retiniano y la circulación coroidal. Los depósitos conducen al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos del coroides a la retina. Estos nuevos vasos tienden a ser delicados y pueden tener fugas o sangrar. Este síntoma da lugar a la forma "húmeda" de la Degeneración Macular Relacionada con la Edad y provoca degeneración disciforme que conduce a una distorsión de la imagen y pérdida rápida de la visión. Sin embargo, incluso si esto no sucede, algunas áreas de la retina pueden atrofiarse, posiblemente debido a la anoxia. Este último síntoma se conoce como la forma "seca" de la enfermedad, también conocida como atrofia geográfica.

20 Como se apreciará, manifestaciones tardías de la enfermedad dan como resultado la incapacidad para leer y realizar tareas diarias. Existe por lo tanto una necesidad urgente para el diagnóstico temprano de la afección y por lo tanto el uso temprano de medidas profilácticas o terapéuticas para evitar la pérdida irreversible de la visión central.

Existe varios tipos de tratamiento para la enfermedad incluyen inyección intravítrea de anti VEGF así como corticosteroides. Otras formas de tratamiento incluyen terapia con láser y tratamiento quirúrgico tal como traslocación de la retina y terapia fotodinámica.

25 Se ha mostrado que una variante en el gen del Factor H del Complemento (CFH), aumenta el riesgo de AMD (2) (2a). Esta variante es un polimorfismo que resulta de la sustitución del nucleótido T a C en la posición 1277 en el exón 9; una forma de CFH tiene el aminoácido histidina en la posición 402 (H402) y la otra variante tiene una tirosina (Y402). Es la forma de histidina la que se asocia con AMD y otras enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, el mismo factor de riesgo (CFH H402) se asocia con otras patologías en las que está implicado el complemento, incluyendo infarto de miocardio (3). Aunque la asociación de este factor de riesgo de Y402H con la enfermedad es significativa en AMD, se piensa que el diagnóstico de este riesgo junto con otros factores de riesgo (tales como H402 además de niveles elevados de CRP) es particularmente importante.

CFH tiene un papel importante que desempeñar en el control del sistema del Complemento.

35 El sistema de complemento es una defensa importante contra patógenos. Tras su activación, el sistema del complemento conduce la inflamación, activa células inmunitarias y destruye directamente a invasores. Este potente sistema proinflamatorio tiene el potencial de provocar daño a uno mismo cuando se activa en un grado inapropiado o en un sitio inapropiado. Para restringir esta tendencia a perjudicar a uno mismo, el complemento está estrechamente controlado por una batería de proteínas reguladoras presentes tanto en el plasma como en las membranas celulares. El Factor H del Complemento es un regulador de complemento de fase fluida, presente en plasma a 0,2 – 40 0,5 g/l, desempeña un papel clave en la regulación del sistema de complemento, específicamente el bucle de amplificación de la ruta alternativa. En los pocos individuos con deficiencia heredada del Factor de Complemento H, el sistema de complemento experimenta activación incontrolada, que consume las proteínas del complemento y hace al individuo deficiente en el complemento (y por lo tanto susceptible a infecciones) (4). También se han ligado recientemente cambios más sutiles en el Factor de Complemento H con la enfermedad humana. Las mutaciones 45 agrupadas en el dominio carboxilo terminal de la proteína se han ligado con síndrome urémico hemolítico atípico y, como se ha mencionado, un polimorfismo común que provoca una sustitución de un único aminoácido en el medio de la molécula en la posición 402 está asociado fuertemente con la Degeneración Macular Relacionada con la Edad (AMD) (5). Homocigotos individuales para histidina en la posición 402, aproximadamente 10 % de la población caucásica, tienen un riesgo aumentado 6-7 veces de desarrollar AMD en comparación con los homocigotos para 50 tirosina en esta posición (2, 5). 50 % de la población caucásica son heterocigotos para los dos alelos, H402 e Y402, estos individuos tienen un riesgo aumentado aproximadamente 3 veces. La razón precisa por la que este cambio pequeño en la molécula del factor H grande altera tan profundamente el riesgo de AMD no está clara, aunque se están acumulando pruebas de que las dos formas difieren en su capacidad para unirse a células y tejidos (6).

55 Conocer el estado polimórfico del Factor de H del Complemento de un individuo en riesgo de AMD (esencialmente, todas las personas ancianas) y otras enfermedades mediadas por el complemento sería útil tanto en la predicción del riesgo como en la orientación de las intervenciones o modificaciones de comportamiento para reducir el riesgo. Por ejemplo, el tabaquismo y la obesidad están asociados de forma independiente con el riesgo aumentado de AMD y en homocigotos H402 podrían realizarse grandes esfuerzos para eliminar estos factores modificables. En la

actualidad, la única manera de descubrir el estado polimórfico del Factor H del Complemento de un individuo es secuenciar el gen. Esto implica obtener sangre nueva, extraer ADN de células y secuenciar la región relevante del gen que codifica el Factor H del Complemento, métodos que son tediosos, consumen tiempo y solo son posibles en un laboratorio especialista. Un sencillo análisis de sangre que identificara con fiabilidad el estado polimórfico del factor H permitiría la exploración rápida de los ancianos en cuidados primarios o clínicas oculares.

El Factor H del Complemento consiste en 1213 aminoácidos dispuestos en 20 unidades homólogas, cada una de aproximadamente 60 aminoácidos de longitud. Las unidades repetidas de 60 aminoácidos de longitud son homólogas de las halladas en un gran número de otras proteínas del complemento y no del complemento. Dado que las dos variantes polimórficas difieren solamente en un único aminoácido de los 1213 restos de la proteína, no fue evidente que pudieran generarse anticuerpos que distinguieran las dos formas variantes de CFH.

Sin embargo, usando métodos de exploración selectivos, los inventores han sido capaces de producir un anticuerpo que es específico para la variante H402 y un anticuerpo adicional que es específico para la variante Y402, cada uno, o ambos, de estos anticuerpos permite la producción de un ensayo de diagnóstico fiable y repetible a partir de muestras de plasma para determinar los individuos en riesgo de AMD.

15 **Declaraciones de invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona por lo tanto un método para determinar la existencia de un factor de riesgo para Degeneración Macular Relacionada con la Edad (AMD) en una muestra de plasma obtenida de un individuo que comprende:

a) exponer dicha muestra a al menos un anticuerpo, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específica para:

i) la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad; o

ii) la variante de tirosina 402 de los Factores H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad;

b) determinar la unión específica de dicho anticuerpo con el Factor H del Complemento en plasma y en el que la unión del anticuerpo secretado por el clon depositado con la referencia 07042601 tiene lugar concluyendo que está presente la variante de histidina 402, o en el que la unión del anticuerpo secretado por el clon depositado con la referencia 08011002 tiene lugar concluyendo que la variante de tirosina 402 está presente; y

c) en el que la variante de histidina 402 está presente, concluyendo que el individuo tiene, o está en riesgo aumentado de desarrollar una AMD, o en el que la unión del anticuerpo específico de tirosina indica un estado homocigoto para la variante de tirosina concluyendo que el individuo está en riesgo reducido de desarrollar AMD.

En un método preferido de la invención la etapa b) implica, idealmente, los dos anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos que comprenden al menos las Regiones Determinantes de Complementariedad, por el que la unión de los dos anticuerpos puede compararse y en el que se usan los anticuerpos específicos tanto de histidina como de tirosina y la unión del anticuerpo específico de histidina tiene lugar concluyendo que el individuo tiene, o está en riesgo de desarrollar, AMD.

La referencia de la presente memoria a un fragmento de anticuerpo incluye referencia a al menos la Región o las Regiones Determinantes de Complementariedad de dicho anticuerpo.

En un método preferido de la invención en el que la etapa b) implica el uso de solamente el anticuerpo, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específico para la variante de tirosina 402 se lleva a cabo un ensayo cuantitativo, preferentemente como se describe en la presente memoria, para determinar si el individuo es homocigoto para la variante de tirosina.

En un método preferido de la invención se expone plasma a dicho anticuerpo, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, y seguido por un procedimiento que retira anticuerpos no unidos de modo que la determinación posterior de unión puede llevarse a cabo sin, o con una mínima cantidad de, interferencia de fondo a partir de anticuerpos no unidos.

En un método alternativo de la invención se expone plasma a fase sólida (placa) recubierta con anticuerpo o fragmento de anticuerpo (policlonal o monoclonal) que reconoce ambas variantes del factor H, se retira por lavado cualquier proteína del plasma no unida antes de incubarse la placa con anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad específica para la variante His402 o variante Tyr 402. De esta manera se retiran proteínas del plasma no unidas de modo que pueda llevarse a cabo una determinación posterior de la unión sin, o con la mínima cantidad de, interferencia de fondo de proteínas no unidas.

En ambos de los métodos anteriores, la determinación posterior de la unión implica un anticuerpo secundario que se

une con los anticuerpos monoclonales específicos de isoforma o los anticuerpos específicos de isoforma se ligan directa, o indirectamente a un sistema de marcaje tal como una enzima que cataliza el desarrollo de color.

5 Por lo tanto, en una realización preferida adicional de la invención la exposición de dicho plasma a anticuerpo (que puede denominarse anticuerpo primario) se sigue además del uso de (lo que puede llamarse) anticuerpo secundario que se une con el anticuerpo monoclonal específico de H402 o Y402 o un fragmento del mismo que comprende al menos la región determinante de complementariedad. Adicionalmente, preferentemente, este anticuerpo secundario se acopla con un sistema indicador o de marcaje que produce una medida de la unión de, uno o ambos, el anticuerpo primario o secundario con su diana y produce de este modo una medida de la unión del anticuerpo específico de variante con el Factor H del Complemento en el plasma del individuo para ensayar.

10 Más convenientemente, los sistemas indicadores o de marcaje incluyen, pero sin limitación, sistemas de ELISA convencionales o sistemas indicadores bioluminiscentes, quimioluminiscentes o pigmentados.

Son ensayos preferidos para determinar la unión de anticuerpo con CFH los basados en inmunoensayo e incluyen, pero sin limitación, uno cualquiera o más de los ejemplos conocidos posteriores.

- 15 1. ELISA convencional.
2. Ensayos nefelométricos/de turbidez, en los que se añade anticuerpo al plasma para unirse con CFH. El monoclonal puede desencadenarse para que provoque turbidez por modificación química o añadiendo un anticuerpo de entrecruzamiento.
3. Ensayos fluorescentes basados en perlas (en uso en laboratorios clínicos para medir por ejemplo citocinas). Las perlas se recubren con un anticuerpo que reconoce ambas formas del factor H. Se añaden a la muestra de plasma anticuerpos específicos de variante que se han marcado con fluorescencia (colores diferentes), esta muestra de plasma se expone a perlas que se analizan después usando equipamiento basado en citometría de flujo. El color detectado indica qué variantes del factor H están.
- 20 4. "Varilla de inmersión". Por ejemplo, las varillas tienen tres puntos: uno con anti H402, uno con anti Y402 y uno con anticuerpo que reconoce ambas formas (este punto es un control). La varilla se sumerge en el plasma, CFH se une con el punto relevante. La presencia de factor H se detecta usando un anticuerpo secundario unido a un cromóforo (podría ser policlonal) que detecta CFH (cualquier isoforma). Al revelar, si se revelan el punto de H402 y control - H402 Homocigoto, Y402 y control = Y402 homocigoto, los tres puntos = heterocigoto.

Véase Figura 5 en la que se ilustra esta tecnología.

30 En métodos preferidos de la invención, usando los inmunoensayos anteriores, pueden desarrollarse dos tipos de ensayo:

1. Un ELISA cuantitativo que mide el CFH total y la cantidad de His402. Este ensayo requiere un monoclonal genérico que detecte cualquier isoforma de CFH y un monoclonal específico de His y, idealmente, un anticuerpo de CFH policlonal para capturar el CFH en el plasma para aislarlo para cuantificación.
- 35 2. Un ensayo cuantitativo que detecta la presencia de solamente la forma de His, o solamente la forma de Tyr o la presencia de ambas formas. De forma similar a la de la figura 3, también podría ser un ELISA. Este ensayo requiere dos anticuerpos monoclonales específicos y uno policlonal (o monoclonal no específico) para capturar el CFH en el plasma para aislarlo para identificación.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un kit para llevar a cabo la metodología anteriormente mencionada comprendiendo dicho kit un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad específica para la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601 y/o la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002. Este anticuerpo es monoclonal.

45 En un kit preferido de la invención el kit también incluye un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad que reconoce cualquier isoforma de CFH, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal para CFH.

50 Más preferentemente aún, el kit incluye además medios indicadores o de marcaje que permiten determinar la unión de dichos uno o más anticuerpos con el Factor H del Complemento en plasma. Incluye por lo tanto, en una opción, un anticuerpo secundario que se acopla con un ensayo de ELISA o un ensayo dependiente de pigmento o activado por luz. El anticuerpo secundario es específico para dichos uno o más anticuerpos para CFH tales como los anticuerpos específicos de variante, de la invención.

55 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un anticuerpo, o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, que es específico para la variante H402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601. En consecuencia se proporciona un anticuerpo, o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, que reacciona con la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento pero no reacciona con la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento.

En consecuencia se proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, que es específico para la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento caracterizado por una cualquiera o más de las propiedades anteriores y se secreta por el clon con el siguiente número de referencia A 07042601 (ECACC).

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un anticuerpo, o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, que es específico para la variante de Y402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002.

En consecuencia se proporciona un anticuerpo, o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, que reacciona con la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento pero no reacciona con la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento.

10 En consecuencia se proporciona un anticuerpo monoclonal, o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, que es específico para la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento caracterizado por una cualquiera o más de las propiedades anteriores y se secreta por el clon con el siguiente número de referencia A 08011002 (ECACC).

- 15 En consecuencia también se enseña un anticuerpo, o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, que reconoce una de las isoformas del Factor H del Complemento.

Este anticuerpo que reconoce la isoforma es bien monoclonal o bien policlonal y en el caso en que el anticuerpo sea policlonal, idealmente, es un anticuerpo policlonal purificado por afinidad para el Factor H del Complemento.

20 En consecuencia se enseña un anticuerpo monoclonal, o fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, preparado por un método que comprende las siguientes etapas:

- a) inmunizar un animal mamífero no humano con al menos un fragmento del Factor H del Complemento incluyendo dicho fragmento o dichos fragmentos una, o ambas, de la variante de histidina 402 o la variante de tirosina 402;
- 25 b) extraer al menos una parte del bazo del animal y recuperar células del bazo inmunitarias;
- c) fusionar las células inmunitarias del bazo con células de mieloma y recuperar las células híbridas fusionadas;
- d) clonar las células por dilución limitante para generar clones de células que secretan cada uno un anticuerpo seleccionado;
- e) cultivar las células híbridas clonadas en condiciones que den lugar a la producción de anticuerpo monoclonal;
- 30 y
- f) recuperar anticuerpo monoclonal del cultivo.

35 Idealmente, dicho animal no humano se inmuniza con una proteína de fusión que comprende dicho fragmento de variante de histidina 402 del Factor H del Complemento y una parte Fc de IgG4 humano. Mas preferentemente aún, dicho animal no humano se inmuniza con un fragmento adicional, o alternativo, del Factor H del Complemento que comprende un fragmento de tipo silvestre de tirosina 402, producido como una proteína de fusión y acoplado de este modo con una parte Fc de IgG4 humano.

40 Como apreciarán los expertos en la materia, cuando se práctica el método anterior, la inmunización de un animal con dicha primera de las proteínas de fusión anteriores dará como resultado, entre cosas, la producción de anticuerpos monoclonales específicos para la variante de histidina 402 y, de forma similar, la inmunización de dicho animal con la segunda de las proteínas de fusión anteriormente descritas dará como resultado, entre otras cosas, la producción de anticuerpos monoclonales específicos para la variante de tirosina 402 de CFH. Sin embargo, adicionalmente, también se producirán anticuerpos monoclonales que reconozcan otros epítopos compartidos de las dos proteínas inmunizadoras y de este modo, usando esta técnica, es posible obtener tres tipos de anticuerpo monoclonal: específico de histidina 402; específico de tirosina 402 y monoclonal que reconozca cualquiera de las formas de CFH.

- 45 Aún más preferentemente, dicho animal no humano se inmuniza con ambas de las proteínas de fusión anteriormente mencionadas y de este modo, al final del procedimiento, se obtienen anticuerpos monoclonales para una de las variantes del Factor H del Complemento nativas, bien H402 o bien Y402.

Idealmente, la etapa d) se sigue de un proceso de exploración que explora los clones de células para identificar los que producen anticuerpos monoclonales específicos contra las variantes del factor H.

- 50 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un clon que secreta un anticuerpo depositado con la referencia 07042601 o con la referencia 08011002.

En consecuencia también se enseña un anticuerpo policlonal que reconoce una de las isoformas del Factor H del Complemento preparado por un método que comprende las siguientes etapas:

- a) inmunizar un animal mamífero no humano con el Factor H del Complemento o un fragmento del mismo;

- b) extraer plasma de dicho animal;
- c) fraccionar el plasma para extraer anticuerpo específico para el Factor H del Complemento.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso *in vitro* de un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específico para la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601; o la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002;

para inhibir la unión del Factor H del Complemento con ligandos o tejidos. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un producto terapéutico que comprende un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específica para la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601; o la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se deposita con la referencia 08011002.

Como se enseña en la presente memoria este producto terapéutico es útil para superar enfermedades mediadas por complemento evitando la participación del Factor H del Complemento en afecciones inflamatorias mediadas por el complemento.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso diagnóstico de un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específico para

- i) la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601; o
- ii) la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002; para el diagnóstico *in vitro* de AMD.

En este aspecto de la invención el anticuerpo se usa para detectar la presencia de una isoforma específica del Factor H del Complemento en tejido, por ejemplo, se puede usar para detectar la presencia del Factor H del Complemento en el ojo para ayudar a evaluar la presencia de, o el comienzo de, degeneración macular relacionada con la edad.

Además, se enseña en la presente memoria una proteína de fusión como se describe en la presente memoria para la producción de anticuerpo monoclonal.

Además, se enseña en la presente memoria cebadores útiles para la producción de una proteína de fusión como se describe en la presente memoria.

Se describirá ahora una realización de la invención como ejemplo solamente con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La Figura 1a muestra un análisis de transferencia de western del Factor H del Complemento (fH) de plasma. El plasma que se sometió a electroforesis en un gel a 7,5 % como se indica, se transfirió a nitrocelulosa y se exploró con (a) mAb MBI-7 específico para CFH de histidina (HfH) y (b) con un mAb que identifica ambas formas de CFH (fH);

La Figura 1b muestra análisis de transferencia de western del Factor H del Complemento de plasma (fH). Se sometió a electroforesis plasma de donantes (HH402: homocigoto para la forma His, YY402: homocigoto para la forma Tyr, YH402: heterocigoto) en un gel a 7,5 % como se indica. Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se exploraron con mAb como se indica. OX24 identifica ambas formas de CFH (fH), MBI-7 es específico para el CFH de histidina (HfH);

La Figura 1c es un análisis de transferencia de western del Factor H del Complemento de plasma realizado como se describe en la Figura 1a. El mAb usado para explorar la mancha de transferencia es específico de MBI-7 para HfH y específico de MBI-8 para el CFH de tirosina (YfH) como se indica;

La Figura 2a muestra la transferencia puntual de CFH endógeno purificado de individuos homocigotos para H CFH (HfH) o Y CFH (YfH). El mAb MBI-7 identificó solamente H CFH (HfH);

La Figura 2b muestra la transferencia puntual de CFH endógeno purificado de individuos homocigotos para HfH (HH402) o YfH (YY402). Se exploraron las manchas de transferencia con MBI-7, MBI-8 u OX24 (que se une con ambas formas). El MBI-7 identificó solamente HfH, MBI-8 detectó solamente YfH y OX24 detectó tanto HfH como YfH;

La Figura 3a muestra un ELISA que demuestra la detección específica de CFH en plasma de donantes que se sabe que son homocigotos H CFH (HfH) o Y CFH (YfH) o heterocigotos para el polimorfismo de Y402H. En los dos ejemplos de este ensayo ilustrado en la Figura 3, la dilución del plasma está en el eje x y A490 en el eje y;

La Figura 3b muestra ELISA que demuestra la detección específica de CFH en plasma de donantes que se sabe que son homocigotos HfH (HH402, rombos), u homocigotos YfH (YY402, triángulos), o heterocigotos para el polimorfismo de Y402H (YH402, cuadrados). Las placas se recubrieron con anticuerpo policlonal para captura y se usó MBI-7 o MBI-8 para detectar según se indica. En los dos ejemplos de este ensayo ilustrado en la Figura 3, la cantidad de plasma se indica en el eje x (μ l de plasma en 100 μ l de tampón de volumen final) y la A492 en el

eje y;

La Figura 4 muestra un fragmento de la estructura de la secuencia de nucleótidos y la de aminoácidos correspondiente de CFH que muestra sustitución de T a C en 1277 y variante H402Y, respectivamente;

La Figura 5a muestra un procedimiento para un ensayo de varilla de inmersión para determinar el genotipo del Factor H del Complemento en un individuo para ensayar; y

La Figura 5b muestra un ensayo de varilla de inmersión para determinar el genotipo de CFH en un individuo para ensayar. En este ejemplo, se cargaron 20 µg de cada anticuerpo (policlonal, MBI-7 y MBI-8 como se indica) en la membrana. Después de bloquear las membranas se cortaron en tiras, que después se incubaron con muestras de plasma de individuos que eran homocigotos YY402, heterocigotos YH402 u homocigotos HH402, se diluyó plasma (plasma 2 % v/v) en PBS/leche. Después de 30 minutos, las tiras se lavaron en PBS/Tween, después se incubaron con anticuerpo policlonal conjugado directamente con peroxidasa de rábano rusticano. Después de 15 minutos, las tiras se lavaron en PBS/Tween y se detectó el fH unido usando revelado del color (revelado con cloronaftol).

Declaración del método

15 Proteínas

El polimorfismo de H402Y reside en el dominio 7 de repetición consenso corta (SCR) del factor H. Para dirigirse a esta región, las proteínas de fusión que comprenden la parte Fc de IgG4 humano unido con SCR 6, 7 y 8 del factor H humano se modificaron técnicamente y se expresaron esencialmente como se describe (7).

1. Se aisló ARN de PBL humano y se convirtió a ADNc por RT-PCR
2. Se usaron cebadores específicos para amplificar ADN que codificaba SCR6-8. (a) Cebador con sentido: (5') gcgtctagaacctgaaacctgtgattatcc (3')

(b) Cebador antisentido: (5') cagggatccagatttaatgcacgtgggtg (3')

Estos cebadores contienen secuencias de nucleótidos adicionales para permitir la digestión por enzimas de restricción y ligamiento en el vector de expresión.

3. El ADN se ligó en un plásmido cadena abajo y en fase con ADN que codificaba el péptido señal de CD33. El plásmido resultante se usó como molde para PCR posterior donde el producto de ADN amplificado incluía la secuencia que codificaba el péptido señal y el factor H.

4. Se ligó ADN purificado que codificaba el péptido señal y SCR del factor H en un plásmido cadena arriba del ADN que codificaba la región Fc de IgG4 humano. Esta metodología generó una construcción de ADN que codificaba la variante de His de CFH.

5. Para generar una construcción que codificaba la forma Tyr del factor H, se diseñaron nuevos cebadores que introducían una mutación puntual en la construcción de His previamente generada. Se usó PCR de dos estadios para generar una nueva construcción que contenía ADN que codificaba la variante de Tyr del factor H.

Cebador 1 (usado con el cebador (b) anterior): (5') aatcaaaattatggaagaaag (3')

Cebador 2 (usado con el cebador (a) anterior): (5') ctttctccataattttgatt (3')

6. Se ligó ADN que codificaba la variante de Tyr en los vectores de expresión como se ha descrito anteriormente en 3 y 4 de modo que el ADN que codificaba la variante de Tyr estaba en fase con ADN que codificaba el péptido señal CD33 y ADN que codificaba la región Fc de IgG4 humano.

7. Se transfectaron células CHO con el vector que codificaba una de las construcciones.

8. Se purificó la proteína de fusión del sobrenadante de líneas celulares transfectadas.

Se generaron dos proteínas de fusión, una con H en la posición relevante de SCR 7 (HfH-Fc) y una con Y en esta posición (YfH-Fc). Las proteínas de fusión recombinantes se purificaron hasta su homogeneidad en proteína A sepharose.

Para obtener factor H nativo de solamente una isoforma, bien H402 (HfH) o bien Y402 (YfH), se identificaron donantes apropiados por genotipación, se tomaron muestras sanguíneas y se purificó el factor H del plasma por cromatografía de afinidad en anticuerpo anti factor H inmovilizado. Las proteínas purificadas se evaluaron con respecto a pureza por análisis de SDS-PAGE.

Protocolos de inmunización

Se inmunizaron ratones Balb/C con las proteínas de fusión HfH-fc o la YfH-Fc en adyuvante completo de Freund. Cuatro semanas después, los ratones se reforzaron con la misma proteína en adyuvante incompleto de Freund y se administraron dos refuerzos adicionales a intervalos de 3 semanas. Después se tomaron muestras de sangre de los ratones y se ensayaron las respuestas de anticuerpo en suero en ELISA frente a las dos proteínas de fusión y las formas H e Y de factor de H purificado. Se proporcionó a los ratones que daban fuertes respuestas contra las proteínas de fusión relevantes y factor H purificado un refuerzo final sin adyuvante. Después se recogieron bazo y células del bazo fusionadas con células de mieloma para generar hibridomas secretores de anticuerpo usando

protocolos convencionales. Se repartieron en alícuotas mezclas de fusión en seis placas de 24 pocillos o seis placas de 96 pocillos y se colocaron en un incubador a 37 °C. Después de dos semanas, se recogieron los sobrenadantes y se exploraron por ELISA con respecto a anticuerpos contra el factor H purificado (mezcla de HfH e YfH). Se sometieron pocillos positivos a clonación de dilución limitante en placas de 96 pocillos. Después de dos semanas adicionales, se exploraron sobrenadantes de placas de clones por ELISA con respecto a anticuerpos reactivos con el factor H; se realizaron dos exploraciones separadas contra HfH e YfH, respectivamente. Las células de pocillos que mostraban fuerte reactividad contra una variante del factor H pero no la otra se volvieron a clonar y el proceso se repitió dos veces más. Se cultivaron clones que permanecían específicos para una forma del factor H al final de este proceso a granel para la generación de anticuerpos.

10 **Caracterización de anticuerpos anti factor H**

Se ensayaron la clase y subclase de inmunoglobulina para cada anticuerpo usando un kit de isotipación comercial. Se ensayó la especificidad por HfH sobre YfH (o viceversa) en ELISA y transferencia de western usando HfH e YfH.

Los clones que secretaban los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria se han depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) en Porton Down con los siguientes números de referencia:

15 Monoclonal específico para la variante H402 del Factor H del Complemento A 07042601, 26 de abril de 2007 (Clon MB1-7).

Anticuerpos monoclonales (IgM) específicos para la variante Y402 del Factor H del Complemento A 08011002, 10 de enero de 2008 (Clon MB1-8) y A 08071501, 15 de julio de 2008.

20 Anticuerpos monoclonales (IgG1) específicos para la variante Y402 del Factor H del Complemento A 08071502, 15 de julio de 2008 (Clon MB1-6).

Anticuerpos monoclonales específicos para una de las isoformas del Factor H del Complemento A 08011003, 10 de enero de 2008 (Clon MB1-9).

Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC)

Agencia de Protección de la Salud

25 Centro para Preparación y Respuesta a Emergencias

Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG. Reino Unido

Desarrollo de un ELISA que detecta específicamente HfH en muestras de plasma

30 Se recubrieron placas de ELISA con policlonal antifactor H (policlonal antifactor H purificado por afinidad interno o comercial) y se bloqueó con BSA. Se diluyeron muestras de plasma de individuos de estado de factor H conocido (de genotipación) (homocigoto HfH, homocigoto YfH o heterocigoto) en PBS/Tween y se incubó en los pocillos. Después de lavar, el anticuerpo de ensayo diluido en PBS/BSA se incubó en los pocillos. Después de lavados adicionales, las placas se incubaron finalmente con un reactivo de inmunoglobulina anti ratón conjugado con HRP (comercial). Las placas se revelaron usando O-fenildiamina (OPD) y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de placas.

35 **Regiones determinantes de complementariedad**

Los ensayos también pueden usar fragmentos de anticuerpos monoclonales generados por tecnología recombinante o por digestión enzimática.

40 Los Fv monocatenarios son unidades de unión a antígeno que comprenden una única cadena polipeptídica codificada por un gen. ScFv también puede fusionarse con otros dominios proteicos o peptídicos usando tecnología recombinante. Se generan forman pequeñas, recombinantes del anticuerpo aislando ARNm del hibridoma (por ejemplo MBI7, MBI8, etc.) y generando ADN que codifica las regiones variables por RT-PCR. Se clona ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera en un vector de expresión apropiado. El vector de expresión puede codificar también una secuencia líder para expresión y un dominio de unión entre las dos regiones variables (por ejemplo, (GGGSGGGGS)₂). En algunos casos, puede clonarse ADN que codifica un dominio proteico (o dominio peptídico) adicional en fase con ADN que codifica el fragmento de anticuerpo. Se usan vectores adecuados para expresión de proteína recombinante en células eucariotas o procariotas, en este último caso los fragmentos de anticuerpo recombinantes se repliegan a partir de cuerpos de inclusión y se purifican usando técnicas cromatográficas clásicas.

50 En algunos casos se clona ADN que codifica el scFv en un vector de fagémido que se transforma en bacterias apropiadas. El rescate de fagos (por infección con fagos auxiliares) y selección posterior de fagos aislados en el factor H permite el aislamiento de un clon que se une con el factor H con la afinidad deseada. Los fagos rescatados de selección pueden usarse después para infectar una cepa bacteriana adecuada dando como resultado scFv soluble.

55 Los anticuerpos monoclonales también pueden fragmentarse en unidades más pequeñas para su uso en ensayos. La digestión enzimática con enzimas, por ejemplo pepsina o papaína, dará como resultado fragmentos tales como

Fab₂ o Fab que pueden purificarse a partir de la mezcla por técnicas cromatográficas clásicas.

Resultados

Caracterización de anticuerpos

5 A partir de placas de clonación originales, se identificaron muchos clones que eran reactivos con CFH purificado. De estos, varios reaccionaron predominantemente o exclusivamente con HfH o YfH en la segunda exploración de ELISA. Uno de estos mAb, denominado MBI-7, se ensayó en transferencia de western frente a plasma de donantes que se sabía que eran homocigotos con respecto a HfH o YfH o donantes heterocigotos. El mAb MBI-7 detectó una fuerte banda al tamaño correcto para CFH en HfH y donantes heterocigotos pero fue completamente negativo cuando se usó para explorar plasma de donantes homocigotos YfH (Figura 1a). Un segundo anticuerpo, MBI-8, se ensayó de forma similar en transferencia de western frente a plasma de donantes y detectó una fuerte banda al tamaño correcto para CFH en YfH y donantes heterocigotos pero fue completamente negativo cuando se usó para explorar plasma de donantes de HfH (Figura 1b). Por el contrario, se detectó CFH en todas las muestras de plasma por un anticuerpo monoclonal que se sabe que se une tanto con HfH como con YfH (Figura 1a). Tanto mAb MBI-7 como mAb MBI-8 mostraron la misma especificidad por HfH purificado en transferencia puntual (Figura 2).

15 Establecimiento de un ensayo de ELISA específico para HfH

En el ELISA usando el mAb MBI-7 de HfH como reactivo de detección, el plasma de donantes que se sabe que son homocigotos HfH dio un fuerte desplazamiento en todo el intervalo de dilución ensayado. Por el contrario, el plasma de homocigotos YfH fue esencialmente negativo en el ensayo. Las muestras de plasma de individuos heterocigotos para el polimorfismo dieron valores intermedios y se distinguieron fácilmente de cualquiera de los homocigotos (Figura 3).

Demostración de un ensayo de varilla de inmersión

Se ilustra un ejemplo de un ensayo de varillas de inmersión en el que se aplican MBI-7, MBI-8 o anticuerpo policlonal a la membrana en puntos distintos (Figura 5). La membrana se usa para capturar CFH de muestras de plasma y se detecta CFH unido con anticuerpo policlonal conjugado con HRPO. Se reveló el color usando cloronaftol. MBI-7 dio una señal positiva de donantes HfH homocigotos o heterocigotos mientras que MBI-8 dio una señal positiva de donantes YfH homocigotos o heterocigotos. Cuando se usó anticuerpo policlonal como captura, se obtuvo señal con todos los anticuerpos de captura.

Análisis

30 Se describe la generación de dos mAb, cada uno específico para una de las dos variantes polimórficas en el resto 402 en el factor H. Estos reactivos únicos permiten la fenotipación rápida y sencilla de individuos usando ELISA. Los mAb también proporcionan un medio para detectar la deposición específica de una variante polimórfica particular en tejidos en enfermedad y proporcionan una herramienta para inhibir la unión de CFH con ligandos en tejidos.

Referencias

- 35 1. Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS. Age-related macular degeneration-emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med.* 2006; 38(7): 450-71.
2. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 15 Abr 2005; 308(5720): 385-9.
- 40 (2a) Documento WO 2006/088950
3. Kardys I, Klaver CC, Despriet DD, Bergen AA, Uitterlinden AG, Hofman A, Oostra BA, Van Duijn CM, de Jong PT, Witteman JC. A common polymorphism in the complement factor H gene is associated with increased risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study. *J Am Coll Cardiol.* 18 Abr 2006; 47(8): 1568-75.
4. Thompson RA, Winterborn MH. Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1 H globulin. *Clin Exp Immunol.* Oct 1981; 46(1): 110-9.
- 45 5. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olsson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Noureddine M, Gilbert JR, Schetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 15 Abr 2005; 308(5720): 419-21.
6. Clark SJ, Higman VA, Mulloy B, Perkins SJ, Lea SM, Sim RB, Day AJ. His-384 allotypic variant of factor H associated with age-related macular degeneration has different heparin binding properties from the non-disease-associated form. *J Biol Chem.* 2006 25 Ago; 281(34): 24713-20.
- 50 7. Harris CL, Lublin DM, Morgan BP. Efficient generation of monoclonal antibodies for specific protein domains using recombinant immunoglobulin fusion proteins: pitfalls and solutions. *Journal of Immunological Methods,* 2002, Vol 5.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la existencia de un factor de riesgo para Degeneración Macular Relacionada con la Edad (AMD) en una muestra de plasma obtenida de un individuo que comprende:
 - 5 a) exponer dicha muestra a al menos un anticuerpo, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específico para:
 - i) la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región determinante de Complementariedad; o
 - 10 ii) la variante de tirosina 402 de Factores H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad;
 - 15 b) determinar la unión específica de dicho anticuerpo con el Factor H del Complemento de plasma y cuando tenga lugar unión del anticuerpo secretado por el clon depositado con la referencia 07042601 concluir que la variante de histidina 402 está presente, o cuando tenga lugar la unión del anticuerpo secretado por el clon depositado con la referencia 08011002 concluir que está presente la variante de tirosina 402; y
 - c) cuando esté presente la variante de histidina 402 concluir que el individuo tiene, o está en mayor riesgo de desarrollar AMD, o cuando la unión del anticuerpo específico de tirosina indique un estado homocigoto para la variante de tirosina concluir que el individuo está en menor riesgo de desarrollar AMD.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa b) implica el uso solamente de anticuerpo secretado por el clon depositado con la referencia 08011002, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, y la etapa c) implica un ensayo cuantitativo para determinar si el individuo es homocigoto para la variante de tirosina.
- 25 3. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que después de la etapa b) se retiran los anticuerpo no unidos de modo que la determinación posterior de la unión pueda llevarse a cabo sin, o con la mínima cantidad de, interferencia de fondo de anticuerpos no unidos.
- 30 4. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la etapa a) se sigue de una etapa que implica exponer plasma al anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad que reconoce ambas variantes del Factor H del Complemento en el que el anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011003 y cualquier proteína de plasma no unida se retira por lavado antes de exponer adicionalmente los anticuerpos unidos a anticuerpos secundarios específicos para la variante His402 o la variante Tyr 402.
- 35 5. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que implica además el uso de un anticuerpo secundario que se une con un anticuerpo específico de isoforma o un fragmento de anticuerpo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad y en el que dicho anticuerpo secundario se une directamente, o indirectamente, con un sistema de marcaje.
- 40 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicho sistema de marcaje incluye uno cualquiera o más de los siguientes: sistemas de ELISA, sistemas bioluminiscentes, sistemas quimioluminiscentes o sistemas indicadores pigmentados.
- 45 7. Un kit para llevar a cabo el método de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 en el que dicho kit comprende un anticuerpo, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específico para:
 - i) la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601; y/o
 - ii) la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002.
8. El kit de acuerdo con la reivindicación 7 en el que dicho kit incluye además un anticuerpo, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, que reconoce cualquier isoforma del Factor H del Complemento en el que el anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011003.
9. El kit de acuerdo con la reivindicación 8 en el que dicho anticuerpo es monoclonal o policlonal.
- 50 10. El kit de acuerdo con las reivindicaciones 7-8 en el que dicho kit incluye además medios de marcaje que permiten determinar la unión de dichos uno o más anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, con el Factor H del Complemento.
11. El kit de acuerdo con la reivindicación 10 en el que dicho kit incluye un anticuerpo secundario que se acopla con un sistema de ELISA o un sistema de ensayo activado por luz o un sistema de ensayo pigmentado.

12. El kit de acuerdo con la reivindicación 11 en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo específico de isoforma.
- 5 13. Un anticuerpo que es específico para la variante de histidina H402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601, o un fragmento del mismo que comprende la menos la Región Determinante de Complementariedad.
14. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es específico para la variante de tirosina Y402 del Factor H del Complemento en el que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad.
- 10 15. El uso *in vitro* de un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específico para:
- i) la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601; o
 - ii) la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002;
- 15 para inhibir la unión del Factor H del Complemento con ligandos o tejidos.
16. Un producto terapéutico que comprende un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específico para:
- 20 i) la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601; o
 - ii) la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002.
17. Uso de un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo que comprende al menos la Región Determinante de Complementariedad, específico para:
- 25 i) la variante de histidina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 07042601; o
 - ii) la variante de tirosina 402 del Factor H del Complemento en la que dicho anticuerpo se secreta por el clon depositado con la referencia 08011002; para el diagnóstico *in vitro* de AMD.
18. Un clon que secreta un anticuerpo depositado con la referencia 07042601 o con la referencia 08011002 o con la referencia 08011003.

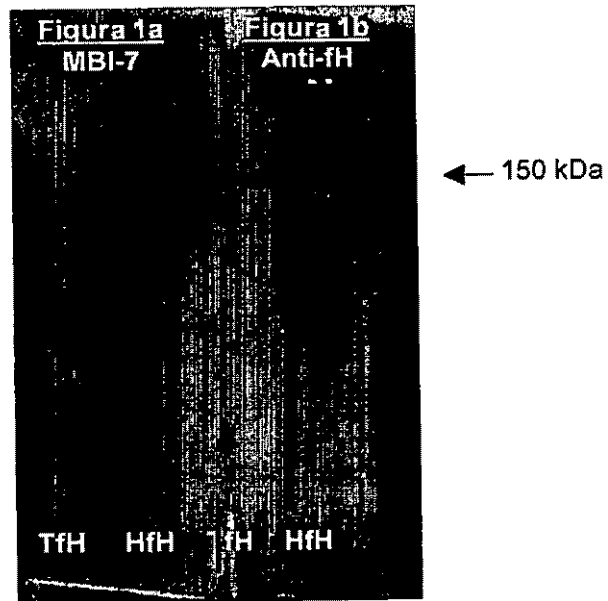


FIGURA 1(a)

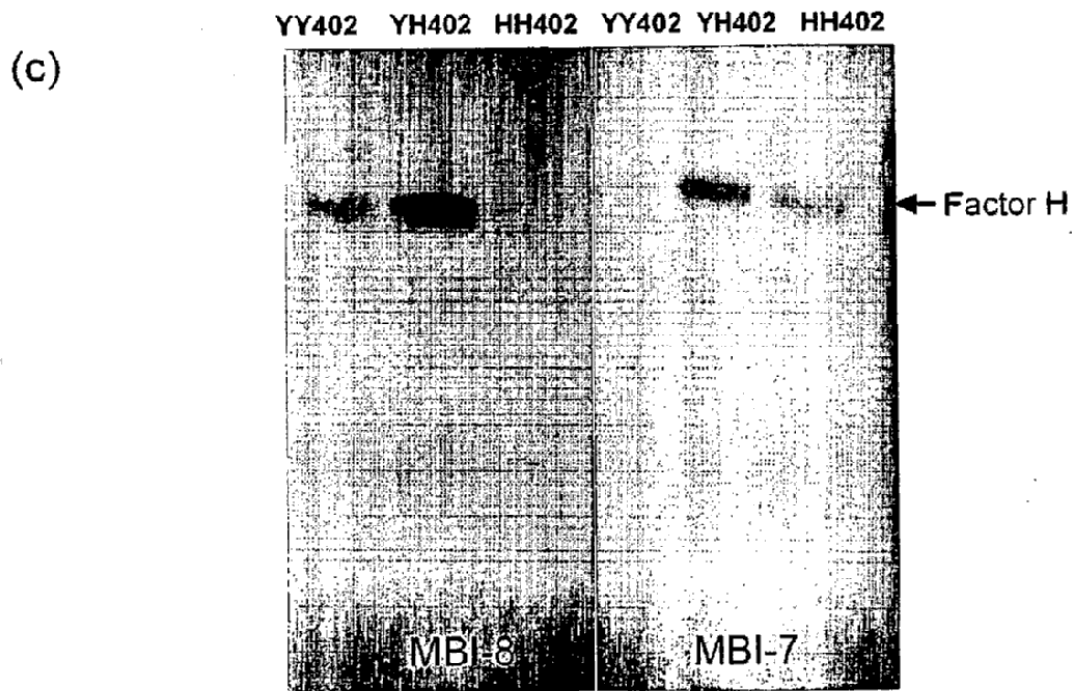
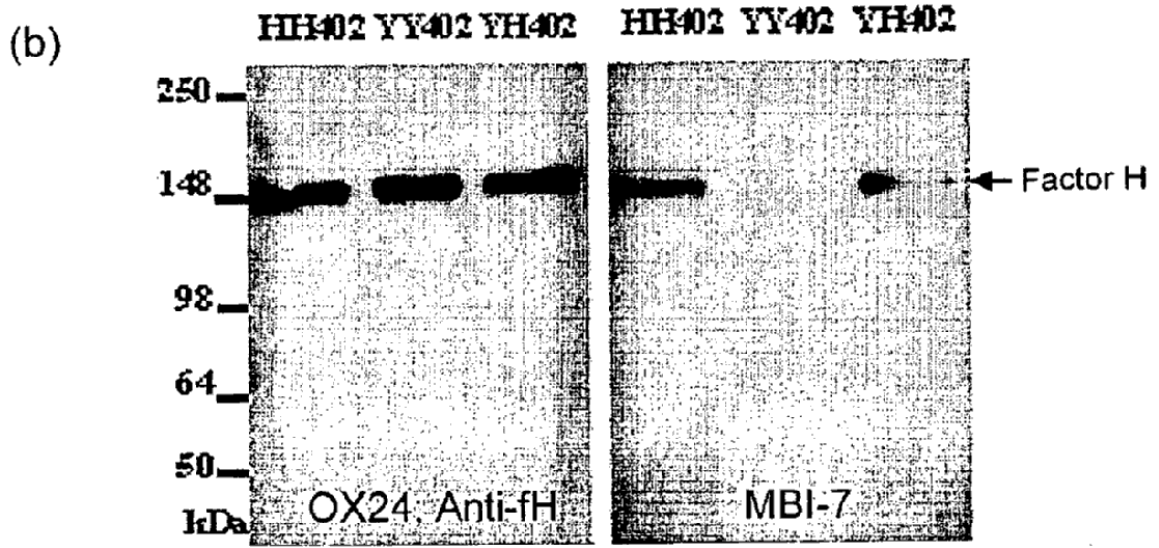


FIGURA 1

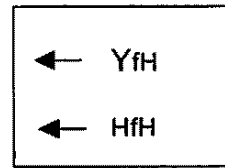
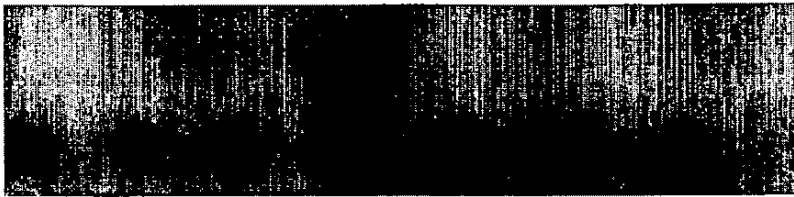


FIGURA 2(a)

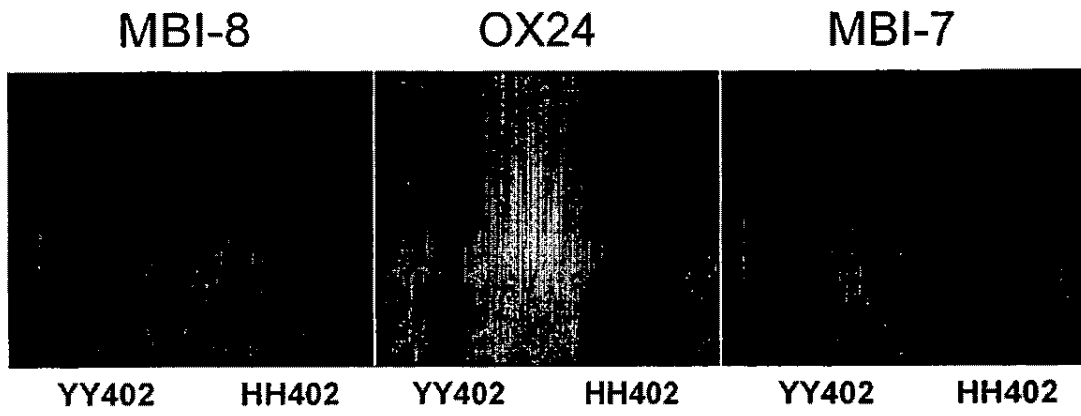


FIGURA 2(b)

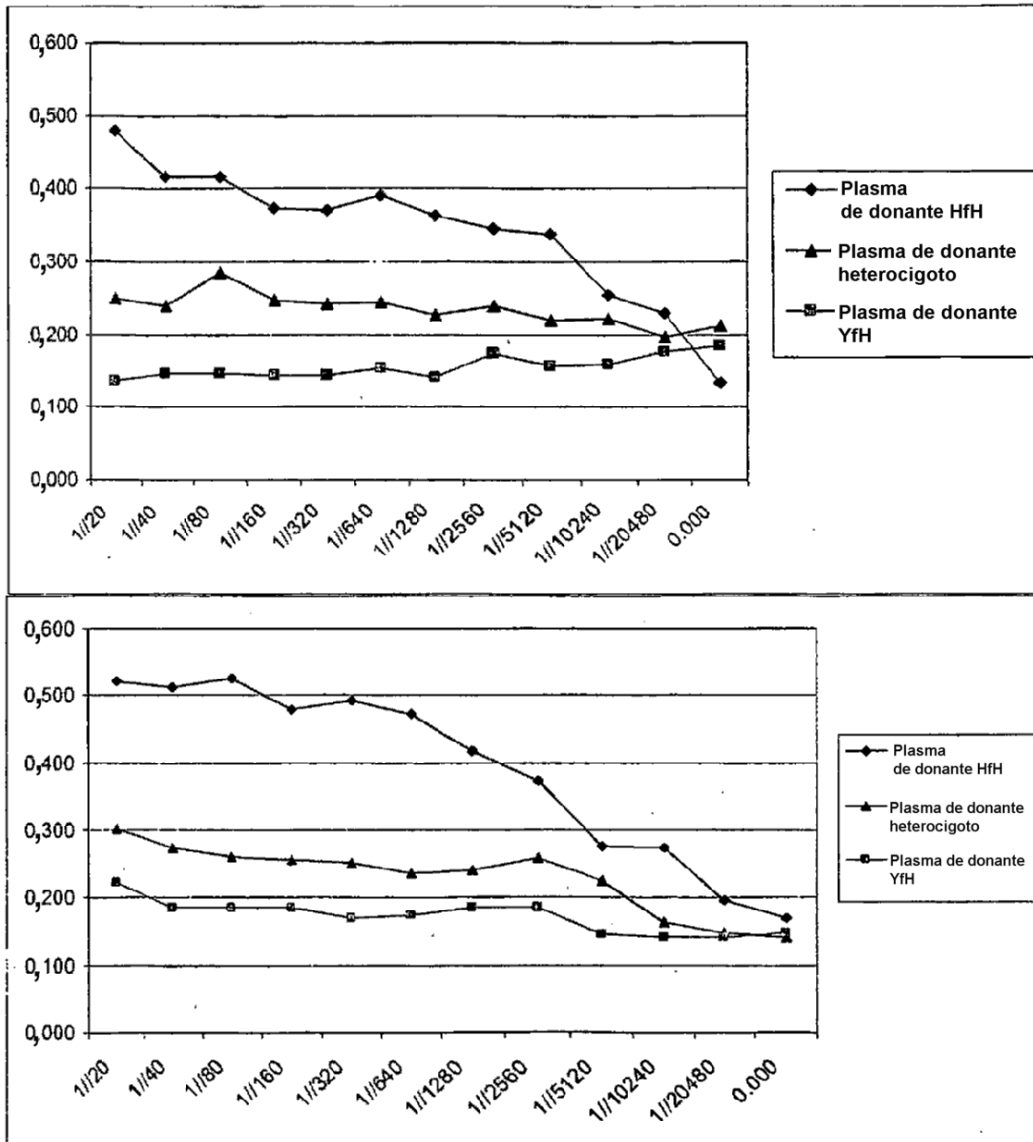


FIGURA 3(a)

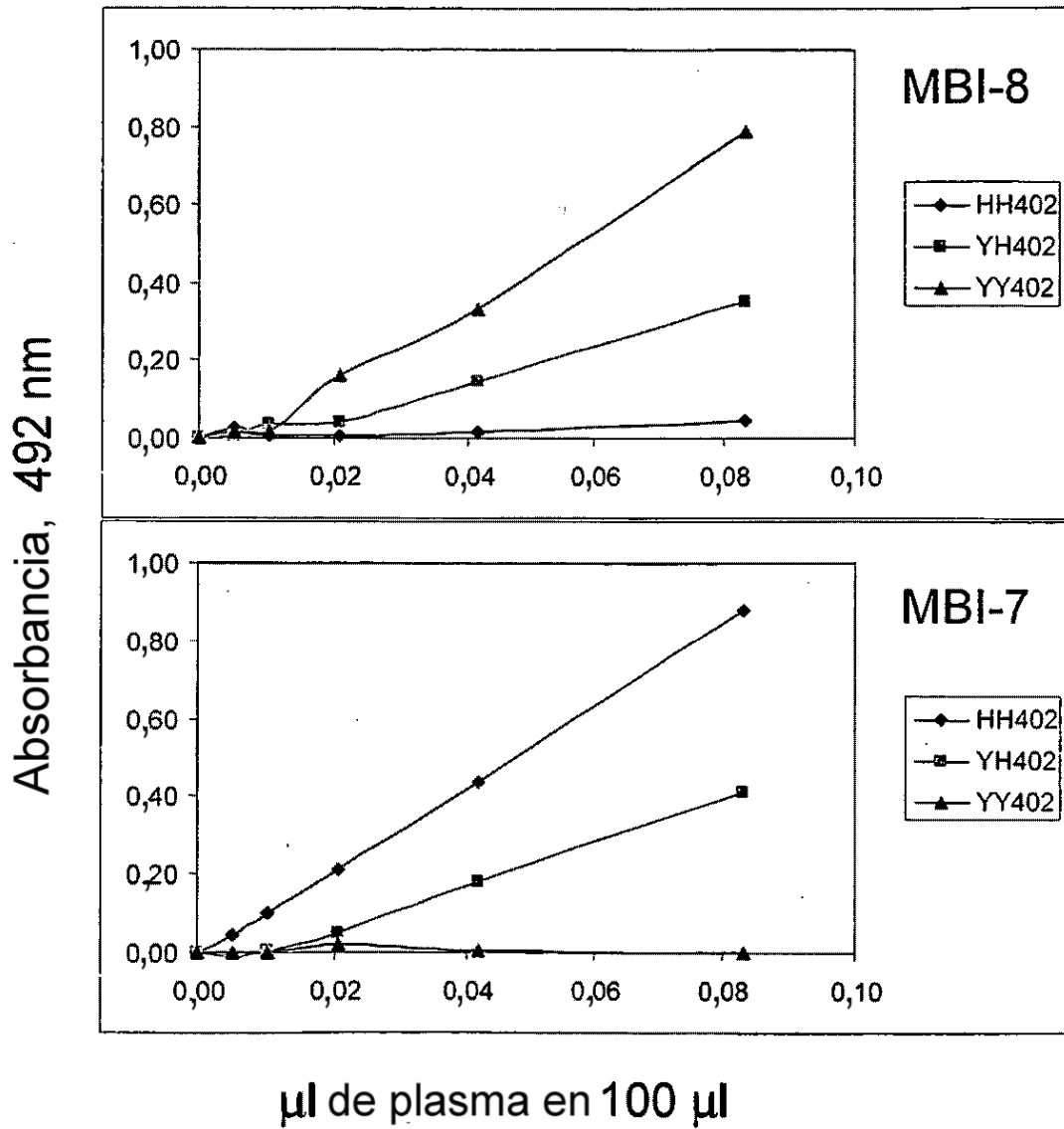


FIGURA 3(b)

SNP rs1061170

gen CFH

exón 9

1277T>C

cambio de tirosina a histidina (Y402H)

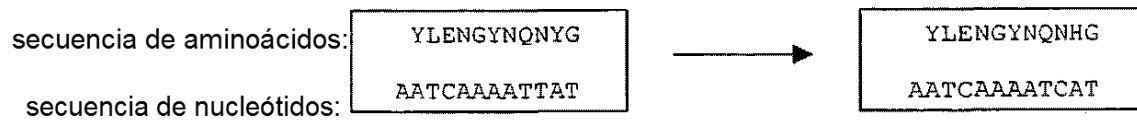
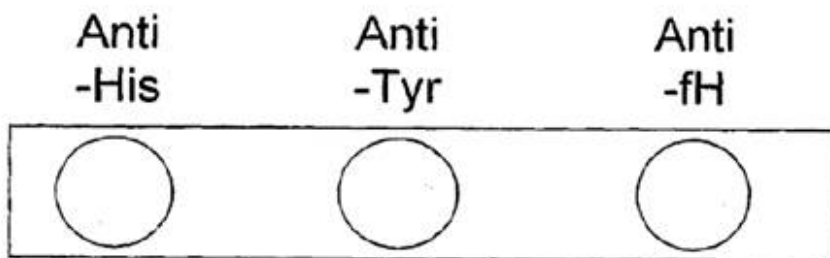


FIGURA 4

Posible formato de ensayo:

Tres monoclonales diferentes



- Sumergir en plasma
- Lavar
- Añadir poli o monoclonal (epítipo diferente) anti fH que está unido a enzima
- Lavar y revelar

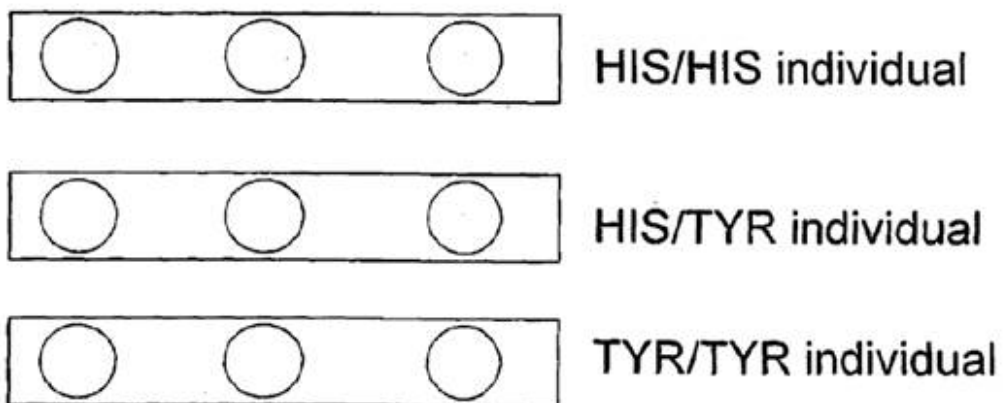


FIGURA 5(a)

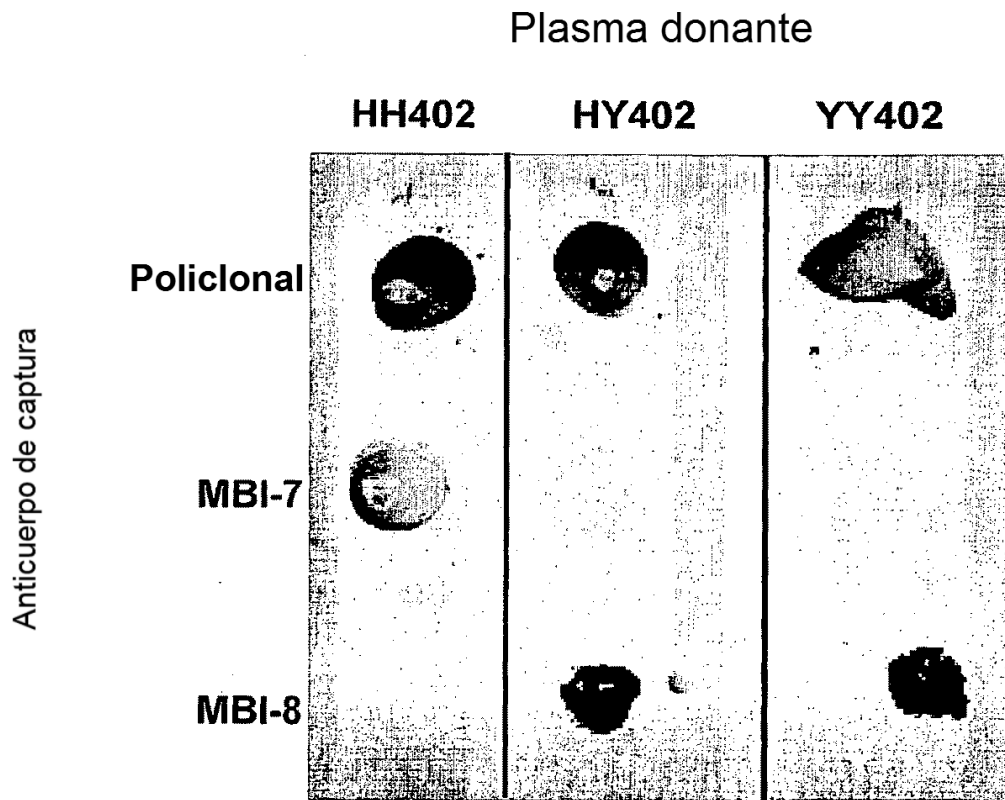


FIGURA 5(b)