

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 290**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2011 E 11842681 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2635702**

54 Título: **Inmunoensayo de flujo lateral para la activación de complemento y métodos de uso para evaluación del sitio de atención de trastornos asociados a complemento**

30 Prioridad:

02.11.2010 US 409297 P

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

21.03.2016

73 Titular/es:

**KYPHA, INC. (100.0%)
4320 Forest Park Avenue, Suite 303
Saint Louis, MO 63108, US**

72 Inventor/es:

**OLSON, PAUL y
MOSS, DONALD**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 564 290 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

Inmunoensayo de flujo lateral para la activación de complemento y métodos de uso para evaluación del sitio de atención de trastornos asociados a complemento.

5

La materia objeto actualmente divulgada se refiere a inmunoensayos de flujo lateral para la medición de la activación de complemento. Específicamente, la materia objeto actualmente divulgada se refiere a un inmunoensayo de flujo lateral para la medición cuantitativa de C3 intacto e iC3b en una muestra y métodos de uso del mismo en la evaluación y el tratamiento de individuos en riesgo de trastornos asociados al complemento, tal como distrés inflamatorio.

10

La inflamación es la respuesta fisiológica del tejido vascularizado a una lesión, infección y ciertas enfermedades. El proceso inflamatorio es un requisito biológico para la cicatrización después de una lesión traumática y para la depuración de la infección. Sin embargo, la inflamación también puede dañar el propio tejido. Por esta razón, la inflamación se considera a menudo un arma de doble filo.

15

El complemento es el brazo más antiguo del sistema inmunitario y está profundamente arraigado en el proceso inflamatorio. La cascada de proteínas de complemento es una primera línea de defensa contra microbios invasores y un componente esencial en el proceso de cicatrización. La cascada de complemento comprende más de 30 proteínas celulares y séricas y tiene funciones importantes en la inmunidad innata y adaptativa. La activación del complemento puede presentarse a través de tres rutas principales: la ruta clásica, alternativa y de lectina. Las tres rutas principales de la activación de complemento convergen en el componente de complemento de proteína central 3 (C3). El C3 es un mediador central de la inflamación y se activa por muchos factores que provocan inflamación. Las figuras 1 y 2 proporcionan vistas generales de C3 y sus productos de activación.

20

25

El complemento, y en particular C3, está asociado a varias indicaciones de enfermedades, tanto agudas como crónicas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, trauma, dificultad respiratoria, sepsis, otras formas de infección, enfermedades infecciosas (por ejemplo, fiebres hemorrágicas), fallo multiorgánico, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, nefritis glomerular, isquemia/lesión por reperfusión, enfermedad inflamatoria del intestino, hemorragia intracraneal, infarto de miocardio y parada cardíaca.

30

Varios pacientes con trauma presentan retos clínicos únicos. Una valoración precisa de la severidad de lesión es importante para la intervención inicial y la estabilización del paciente, así como para la clasificación de pacientes (por ejemplo, después de incidentes con víctimas masivas). Los pacientes admitidos en la UCI, incluso después de la estabilización inicial, siguen en alto riesgo de complicaciones mortales secundarias que implican disfunción orgánica, dificultad respiratoria y sepsis, entre otras. Muchas de estas afecciones implican eventos hiperinflamatorios que pueden aumentar rápidamente y provocar un daño significativo antes de que se detecten los síntomas clínicos. Estos eventos van precedidos en general por una homeostasis cada vez más inestable de la respuesta inflamatoria. La capacidad para controlar frecuentemente la inflamación (por ejemplo, cada hora o dos) y la fiabilidad en los puntos temporales más tempranos tras la lesión tiene un tremendo valor clínico y mejorará los resultados clínicos para pacientes de cuidados críticos.

35

40

Varios informes han mostrado que la activación del complemento se produce inmediatamente después de la lesión y se correlaciona con la severidad de la lesión. En un estudio, se descubrió que los niveles circulantes de la proteína de complemento en pacientes con trauma se correlacionaban con el resultado del paciente. Véase Hecke, y col., *Circulating complement proteins in multiple trauma patients-correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome*, Crit. Care Med. 25(12): 2015-24 (1997). En este estudio, los autores midieron las concentraciones en plasma tanto de C3a como de C3 total directamente después de la lesión y en la UCI en los días siguientes a la lesión. Detectaron evidencia de la activación de complemento C3 en los puntos temporales más tempranos después de la lesión. Sin embargo, la activación del complemento fue más pronunciada en los no supervivientes que en los supervivientes durante las primeras ocho horas. En los puntos temporales más tempranos, el grado de activación de C3 se correlaciona con el resultado del paciente. Hecke y col., también descubrieron que la relación del producto de degradación de C3, C3a, cuando se toma como una relación con respecto al complemento total, fue un mejor predictor de los resultados que C3a en solitario.

45

50

55

Un estudio similar de Zilow, y col., *Complement activation and the prognostic value of C3a in patients at risk of adult respiratory distress syndrome*, Clin. Exp. Immunol. 79: 151-57 (1990), descubrió de manera retrospectiva que el control de C3a y C3 total a intervalos frecuentes (6 h) podría ser útil para identificar pacientes en alto riesgo o en las etapas tempranas de dificultad respiratoria. Estos investigadores extrajeron la primera muestra de plasma en un

plazo de 2 horas de la lesión y muestreos repetidos de 6 horas durante las primeras 48 horas y después a intervalos diarios posteriormente. Zilow y col., descubrieron una correlación significativa entre los niveles de C3a y la relación de C3a:C3 total a las 6 y 12 horas, así como desde 5 días en adelante.

- 5 En el campo de atención de traumas, la primera hora después de la lesión se denomina a veces como la "Hora de Oro". Sin desear quedar ligado a la teoría, en general se cree que la intervención dentro de la primera hora tras la lesión traumática aumenta en gran medida el resultado del paciente. La mejor información de diagnóstico proporcionada más temprano ayudará a mejorar la intuición del especialista de cuidados críticos al tomar decisiones de tratamiento.
- 10 Hasta ahora, no se conoce en la técnica un ensayo de sitio de atención para medir la activación de complemento dentro de la ventana accionable de tratamiento. Aunque que se han reconocido desde hace tiempo las asociaciones entre el complemento y la enfermedad o trauma, C3 se controla en un pequeño número de enfermedades o afecciones. Incluso en estos casos, los métodos actuales de ensayo tienen limitaciones. En primer lugar, en la mayor
- 15 parte de los casos, los ensayos de complemento tradicionales se dirigen a C3 total como el analito diana (por ejemplo, a través de ensayos de turbidez y ELISA). C3 total es una combinación de productos de activación y desactivación de C3 intacto (o nativo) y C3. Estas pruebas detectan en general disminuciones en los niveles circulantes de C3. Por lo tanto, los niveles disminuidos de C3 total sólo miden el empobrecimiento de C3 debido a la activación masiva. Sin embargo, otros factores, tales como la dieta o el ejercicio, pueden provocar menores niveles
- 20 en estado estable de C3. Puesto que los ensayos de C3 total no miden la renovación, no se pueden distinguir las causas de la activación. Adicionalmente, una prueba que mide el C3 total no puede controlar los cambios en tiempo real en el patrón de activación de C3 que serían útiles para dirigir el cuidado del paciente. Por ejemplo, los pacientes que padecen trauma o lupus sistémico (marcado por niveles disminuidos de C3) se beneficiarían del control de activación de C3 mejorado. Actualmente, la eficacia de tratamiento para el lupus sistémico se mide por un retorno de
- 25 los niveles de C3 deprimidos a los niveles normales. Sin embargo, el facultativo tiene dificultad en discernir si el proceso de enfermedad subyacente se ha curado o sólo se ha retrasado lo suficiente para que los mecanismos homeostáticos devuelvan a C3 a los niveles fisiológicamente normales.
- Una segunda limitación en las pruebas de C3 actuales es el tiempo requerido para realizar la mayoría de los
- 30 ensayos. Un ensayo ELISA típico para la detección de la activación de complemento requiere horas para realizarse y la fácil disponibilidad de un laboratorio y un técnico experto. Por lo tanto, esta plataforma de ensayo no es útil para indicaciones de disfunción inflamatoria, en las que los biomarcadores cambian en el orden de minutos y se requiere intervención clínica en una escala de tiempo similar.
- 35 Una tercera limitación en las pruebas de C3 actuales reside en la naturaleza de la propia cascada de proteínas. El complemento es notoriamente arduo y se puede llegar a activar en virtud de procedimientos normales de análisis (manipulación, almacenamiento y exposición a materiales extraños que entran en contacto con C3 durante el análisis). El complemento es muy eficaz en la lisis de microbios invasores y en el inicio de la respuesta de cicatrización en los sitios de lesión. Esta eficacia se debe en parte a la capacidad de C3 para activarse por
- 40 materiales extraños, tal como componentes de la pared celular bacteriana. Aunque esta propiedad es útil al dirigir una respuesta inmunitaria a nuevos patógenos extraños, esta misma propiedad presenta retos tremendos en un estudio experimental y diagnóstico. Los materiales, tal como plásticos usados en la manipulación de la muestra, la manipulación de la propia muestra, y las condiciones inapropiadas de almacenamiento también pueden desencadenar la activación de complemento. Cuantas más etapas de procesamiento y manipulación se requieran
- 45 para realizar un ensayo determinado, más falsos positivos pueden esperarse, debido a la activación del complemento en virtud del propio ensayo. Estos falsos positivos complican las pruebas tradicionales y vuelven inadecuados los métodos de prueba actuales para su uso en el direccionamiento de la atención al paciente casi en tiempo real.
- 50 Una consideración adicional en las pruebas de activación de complemento es la selección del mejor biomarcador para detectar los cambios en tiempo real en la respuesta inflamatoria. C3 tiene varias cualidades atractivas como un biomarcador en la inflamación. En primer lugar, al igual que la proteína central del sistema de complemento, C3 se activa por la mayoría de los estímulos que provocarán activación de complemento. En segundo lugar, C3 se activa en proporción al grado de lesión o infección. En tercer lugar, C3 responde casi en tiempo real a un agravio
- 55 fisiológico. La activación del complemento se produce en respuesta directa a un agente que provoca una crisis, a diferencia de otros marcadores inflamatorios de fase aguda que tardan horas o días en responder. Esta propiedad de respuesta rápida no está presente en otros biomarcadores usados frecuentemente en la clínica.

Específicamente, el C3 intacto (o nativo) es un marcador valioso del estado inflamatorio. C3 intacto representa la

cantidad de C3 disponible para la activación. El C3 total representa el C3 intacto, así como todos los productos de activación de C3. En la actualidad, los ensayos de complemento normales miden en general el C3 total a través de ensayos de turbidez o ELISA. Aunque técnicamente son más fáciles de realizar, los ensayos de C3 total no pueden detectar el agotamiento de C3 de forma tan precisa como los ensayos de C3 intacto. El control del C3 intacto, especialmente con el tiempo, es útil para seguir los eventos de activación de complemento masivos, tal como los que se presentan en trauma y otras indicaciones de activación de complemento sistémicas. El control del C3 intacto en el tiempo permite a un médico detectar el inicio de un estado inmunosupresor provocado por el agotamiento de C3. Adicionalmente, el C3 intacto puede ser más útil que el C3 total cuando al calcular los índices de activación de complemento (por ejemplo, la relación C3a:C3 total usada por Zilow y Hecke). Los ensayos de C3 intacto han probado históricamente ser difíciles de administrar o dependen, en parte de que C3 intacto es muy inestable y puede desnaturalizarse o auto-activarse si no se manipula apropiadamente.

El producto de degradación de C3, iC3b, también es un marcador valioso de la respuesta inflamatoria. iC3b tiene una semivida de 30 a 90 minutos, que sirve como un biomarcador menos volátil (por ejemplo, en comparación con C3a), pero aún rápidamente sensible. Sin embargo, iC3b está presente a niveles mucho menores que el C3 intacto en las muestras de los pacientes. Incluso un pequeño grado de intercomunicación (por ejemplo, 1 %) entre la proteína de C3 intacto y el ensayo específico de iC3b produce un señal de falso positivo de iC3b a un nivel dos veces el de iC3b circulante normal. Por lo tanto, aunque es marcador deseable de inflamación, hasta la fecha iC3b ha presentado retos significativos en las pruebas de diagnóstico.

El documento WO 2010/135717, de Zhang y col., publicado el 25 de noviembre de 2010, se refiere a métodos para evaluar la activación de complemento a través de los biomarcadores C3 intacto, iC3b y C3 total. Sin embargo, Zhang y col., se limita a los inmunoensayos tradicionales de tipo sandwich, tal como ELISA, que requieren procesamiento en laboratorio y la experiencia de técnicos expertos. Adicionalmente, los ensayos y métodos de Zhang y col., requieren etapas de preparación, almacenamiento y manipulación de muestras que se sabe que activan el C3 intacto inestable y producen resultados de ensayo con falsos positivos, impidiendo la capacidad de medir exactamente el C3 intacto. Además, los ensayos y métodos de Zhang y col. requieren horas de procesamiento y, por lo tanto, son incapaces de proporcionar los datos casi en tiempo real que pueden afectar al cuidado del paciente en los puntos temporales tempranos después de la crisis fisiológica.

Palarasah y col. J. of Immunological Methods, 262 (2010) 142-150 muestra el uso de anticuerpos monoclonales contra C3c como una manera para controlar el estado inflamatorio de un paciente y no divulga el uso de C3 nativo/intacto e/o iC3b como marcadores de inflamación.

Aún existe la necesidad de un ensayo de sitio de atención rápido para la medición de C3 intacto y de iC3b en un paciente en riesgo de un trastorno asociado a complemento que minimice la activación de complemento debido a la manipulación de la muestra y permita que un médico actúe tras los cambios en los niveles de activación de complemento en tiempo casi real, a fin de guiar el tratamiento del paciente y controlar la respuesta inflamatoria.

Ahora, los presentes inventores han desarrollado un método y un ensayo de sitio de atención para la medición cualitativa y cuantitativa de C3 intacto y de iC3b, adecuado para su uso en la dirección del cuidado del paciente en los puntos temporales más tempranos e inmediatamente después de lesión traumática u otras crisis fisiológicas. Seleccionando cuidadosamente los pares de anticuerpos de captura y de detección que evitan la intercomunicación de interferencia y aplicando la tecnología a una plataforma de inmunoensayo de flujo lateral, los inventores han descubierto de forma sorprendente que es posible detectar y cuantificar los biomarcadores, C3 intacto e iC3b, mientras que se evitan los resultados de falso positivo que abundan en los métodos de ensayo convencionales para estos analitos.

Por consiguiente, se proporciona un inmunoensayo de flujo lateral para la detección del sitio de atención de un marcador de activación de complemento en una muestra de fluido corporal que comprende proteínas de complemento como se define en las reivindicaciones adjuntas a la presente.

La invención encuentra aplicación en diversas formas de diagnóstico y tratamiento, se divulga en el presente documento un método para tratar un individuo en riesgo de un trastorno asociado a complemento, que comprende: (a) obtener una muestra de un fluido corporal del individuo; (b) medir un nivel de activación de complemento en la muestra a través de un inmunoensayo de flujo lateral en el sitio de atención; (c) correlacionar el nivel de activación de complemento en la muestra con un riesgo de un trastorno asociado a complemento comparando el nivel de activación de complemento en la muestra con un nivel de referencia en un control, donde una desviación en el nivel de activación de complemento en la muestra en comparación con el nivel de referencia en el control indica que el

individuo está en riesgo de padecer un trastorno asociado a complemento; (d) seleccionar un tratamiento para el individuo, basándose en la correlación de la etapa (c); y (e) tratar al individuo con el tratamiento seleccionado de acuerdo con la etapa (d).

- 5 También se describe en el presente documento un método para controlar a un individuo que está recibiendo tratamiento para una afección fisiológica y que padece un trastorno asociado a complemento, comprendiendo el método: (a) obtener muestras seriadas de un fluido corporal del individuo; (b) determinar un nivel de activación de complemento en cada una de dichas muestras a través de un inmunoensayo de flujo lateral en el sitio de atención; (c) comparar los niveles de activación de complemento en las muestras seriadas para detectar un cambio en un nivel de activación de complemento en el tiempo; y (d) modificar el tratamiento para el individuo, basándose en la correlación de la etapa (c).

Otras realizaciones de la invención se describen en las reivindicaciones adjuntas en la presente.

- 15 Estos y otros objetos, características, realizaciones y ventajas se harán más evidentes para los expertos en la técnica a partir de la lectura de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

La **figura 1** proporciona una vista general esquemática del sistema de complemento. El complemento se activa por tres rutas principales, cada una de las cuales converge en la activación de C3 intacto. La activación proteolítica de C3 produce los productos de degradación de C3, C3a y C3b. C3b se modifica adicionalmente de forma proteolítica para formar iC3b, un biomarcador para la activación de C3. C3 intacto e iC3b se señalan con un círculo en el esquema.

La **figura 2** proporciona una representación esquemática de la activación y desactivación de C3. C3 intacto se activa proteolíticamente en C3a y C3b. Algunas moléculas de C3b se unen covalentemente a superficies; otras reaccionan con agua y permanecen en circulación. C3b se desactiva por el Factor de proteasa 1. El primer producto de desactivación es iC3b, que se forma por la actividad del Factor 1 que elimina un péptido corto, C3f. iC3b se degrada adicionalmente en C3c y C3dg, estando este último degradado en C3d.

La **figura 3** es una representación esquemática del reconocimiento específico de C3 intacto e iC3b por pares de anticuerpo. **(A)** C3 Intacto se reconoce por dos anticuerpos: un primer anticuerpo reconoce C3a, que solo está presente en la molécula de C3 intacto; un segundo anticuerpo reconoce una región en C3d que está presente tanto en C3 intacto como en iC3b. El segundo anticuerpo participa en la distinción de C3 y sus derivados de otras moléculas de proteína pero no de C3 intacto e iC3b. Un par alterno de anticuerpos para C3 intacto incluyen anticuerpos que reconocieron C3a y C3f. **(B)** La proteína iC3b se reconoce por otro par de anticuerpos. El primer anticuerpo entra en contacto con la proteína en un neopéptido que se cree que está localizado cerca de la región C3g. Este epítipo se revela una vez que el Factor I elimina el fragmento C3f. El neopéptido se obstruye una vez que el Factor I degrada iC3b en C3c y C3dg. El segundo anticuerpo reconoce el epítipo de C3d. Un par alterno para iC3b incluye el anticuerpo de iC3b que se ha mencionado anteriormente y un segundo que reconoce C3d activado (Quidel® A250).

La **figura 4** es una representación esquemática de una realización de un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención.

La **figura 5** es una representación esquemática de dos realizaciones de un inmunoensayo de flujo lateral. **(A)** muestra un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de un único analito. **(B)** muestra un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de dos analitos separados (C3 intacto e iC3b) en tiras de membrana paralelas.

La **figura 6** es una representación de tres realizaciones de inmunoensayos de flujo lateral de analito individual. (A) muestra un casete de ensayo para un inmunoensayo de flujo lateral de C3 total. (B) muestra un casete de ensayo para un inmunoensayo de flujo lateral de C3 intacto. (C) muestra un casete de ensayo para un inmunoensayo de flujo lateral de iC3b.

La **figura 7** es una representación de dos realizaciones de un casete de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de analito doble, para la evaluación de C3 intacto y de iC3b. (A) muestra un casete de ensayo que comprende dos puertos separados para la carga de muestra y dos tiras de membrana en paralelo, una para cada analito. (B) muestra un casete de ensayo con un único puerto para la carga de muestra y dos tiras de membrana en paralelo, una para cada analito.

La **figura 8** es una representación de dos realizaciones de un casete de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de triple analito, para la evaluación de C3 total, C3 intacto y de iC3b. (A) muestra un casete de ensayo que comprende tres puertos separados para la carga de muestra y tres tiras de membrana en paralelo, una para cada analito. (B) muestra un casete de ensayo con un puerto individual para la carga de muestra y tres tiras de membrana en paralelo, una para cada analito.

La **figura 9** es una representación esquemática de dos realizaciones de un inmunoensayo de flujo lateral. **(A)** muestra un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de un analito individual. **(B)** muestra un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de dos analitos separados (C3 intacto e iC3b) en serie en la misma tira de membrana.

5 La **figura 10** es una representación de dos realizaciones de un inmunoensayo de flujo lateral para múltiples analitos en serie. **(A)** muestra un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de dos analitos y un control en serie en la misma tira de membrana. **(B)** muestra un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de tres analitos y un control en serie en la misma tira de membrana. Los analitos se seleccionan entre C3 total, C3 intacto e iC3b tanto para **(A)** como **(B)**.

10 La **figura 11** muestra una comparación de sensibilidades, intervalo dinámico, variabilidad de prueba a prueba, y el tiempo de ensayo para tres realizaciones de los presentes inmunoensayos de flujo lateral. **(A)** muestra una gráfica de la curva estándar del flujo lateral para una tira de ensayo que detecta iC3b sin una funda de casete. **(B)** muestra una gráfica de curva estándar de una realización del inmunoensayo de flujo lateral en el que las tiras de ensayo se encierran en un casete, lo que permite una administración más controlada del volumen de muestra de ensayo. La concentración de la solución de anticuerpo usada para conjugación con oro es de 0,5 mg/ml y se incluye BSA en la mezcla de reacción. **(C)** muestra una gráfica de curva estándar de otra realización de una tira de ensayo integrada en un casete, donde la concentración de la solución de anticuerpo usada para conjugación con oro es de 1 mg/ml y se elimina el BSA de la mezcla de reacción. La sensibilidad del ensayo alcanza 10 ng/ml con un intervalo dinámico que se extiende a 10 ug/ml.

20 La **figura 12** muestra la sensibilidad de un inmunoensayo de flujo lateral para iC3b descrito en el presente documento. La sensibilidad varía de 10 ng/ml a 10 ug/ml. El error estándar es menor del 3 % en 20 minutos. R cuadrado = 0,9892. Los valores se verificaron por ELISA.

25 La **figura 13** muestra la sensibilidad de un inmunoensayo de flujo lateral para C3 intacto descrito en el presente documento. La sensibilidad varía de 20 ng/ml a 10 ug/ml. El error estándar es menor del 3 % en 20 minutos. R cuadrado = 0,9964. Los valores se verificaron por ELISA. Se muestran barras de error, pero son más pequeñas que los puntos trazados.

La **figura 14** muestra la intercomunicación entre los anticuerpos de C3 intacto y de iC3b en inmunoensayos de flujo lateral.

30 La **figura 15** muestra los niveles de C3 intacto e iC3b en lágrimas basales de un único individuo en intervalos de 12 horas, como se ensayó por inmunoensayos de flujo lateral descritos en el presente documento.

35 La **figura 16** muestra los niveles de C3 intacto y de iC3b en sangre total de un individuo sano normal. Los resultados muestran aproximadamente 2500 veces más C3 intacto que iC3b en sangre total de un donante sano.

La **figura 17** muestra los niveles de C3 intacto y de iC3b en sangre total de un individuo sano. Los resultados muestran aproximadamente 333 veces más C3 intacto que iC3b en la sangre total de un donante sano.

40 La **figura 18** muestra los niveles de C3 intacto y de iC3b en un individuo normal 2 horas después de ejercicio pesado (paseo en bicicleta de 100 millas (160,93 kilómetros)). Los resultados muestran más de 1000 veces más C3 intacto que iC3b en sangre total de un individuo sano después del ejercicio.

La **figura 19** es una tabla de fluidos corporales ejemplares adecuados para su uso con los ensayos y métodos divulgados en el presente documento.

45 Los detalles de una o más realizaciones de la materia objeto actualmente divulgada se exponen en este documento. Las modificaciones a las realizaciones descritas en este documento, y otras realizaciones, serán evidentes para los expertos en la técnica después de un estudio de la información proporcionada en este documento.

50 Aunque se cree que los siguientes términos se entenderán bien por un experto en la técnica, se exponen definiciones para facilitar la explicación de la materia objeto actualmente divulgada.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la materia objeto actualmente divulgada.

55 A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades, tal como condiciones de reacción, y demás usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones se entenderán como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones son

aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la materia objeto actualmente divulgada.

- Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor o una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje pretende incluir variaciones en algunas realizaciones de $\pm 20\%$, en algunas realizaciones de $\pm 10\%$, en algunas realizaciones de $\pm 5\%$, en algunas realizaciones de $\pm 1\%$, en algunas realizaciones de $\pm 0,5\%$, y en algunas realizaciones de $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, puesto que dichas variaciones son apropiadas para realizar el método divulgado.
- 10 "Analito" se refiere a cualquier entidad, particularmente una entidad química, bioquímica o biológica que se va a evaluar, por ejemplo, cuyo cantidad (por ejemplo, concentración o masa), actividad, composición u otra propiedad o propiedades se desea detectar, medir, cuantificar, evaluar, analizar, etc. Un "analito" puede ser una única especie molecular o puede estar compuesto por múltiples especies moleculares distintas.
- 15 "Anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas y/o de longitud completa de los tipos IgA, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM, IgY, fragmentos de unión a antígeno o cadenas individuales de inmunoglobulinas completas (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, scFv (variable monocatenario), y fragmentos dAb), y otras proteínas que incluyen al menos un región variable de inmunoglobulina de unión a antígeno, por ejemplo, una proteína que comprende una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una región variable de cadena pesada (H) (VH) y una región variable de cadena ligera (L) (VL). Las cadenas ligeras de un anticuerpo pueden ser de tipo kappa o lambda. Un anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Un anticuerpo policlonal contiene moléculas de inmunoglobulina que difieren en secuencia de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) y, por lo tanto, reconocen típicamente diferentes epítopes de un antígeno. Frecuentemente, un anticuerpo policlonal se obtiene a partir de múltiples líneas de linfocitos B diferentes que producen cada una un anticuerpo con una diferente especificidad. Un anticuerpo policlonal puede estar compuesto en su mayor parte por varias subpoblaciones de anticuerpos, cada una de las cuales se obtiene a partir de una línea de linfocitos B individual. Un anticuerpo monoclonal está compuesto por moléculas de inmunoglobulina individual que comprenden CDR con la misma secuencia y, por lo tanto, reconocen el mismo epítipo (es decir, el anticuerpo es mono-específico). Frecuentemente, un anticuerpo monoclonal se obtiene a partir de una línea de linfocitos B individual o hibridoma. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo "humanizado" en el que, por ejemplo, un dominio variable de origen de roedor se fusiona a un dominio constante de origen humano o en el que algunos o todos los aminoácidos de la región determinante de complementariedad frecuentemente junto con uno o más aminoácidos estructurales se "injertan" de un anticuerpo de roedor, por ejemplo, murino, a un anticuerpo humano, conservando de este modo la especificidad del anticuerpo de roedor.
- 35 En otra realización, los agentes de captura y/o detección incluyen otros ligandos, tales como receptores naturales para C3 activado (por ejemplo, receptores de complemento 1, 2, y 3), aptámeros, péptidos, otros ligandos de molécula pequeña, y similares.
- 40 Un aspecto de ciertas realizaciones de la invención es la selección de anticuerpos para su uso como agentes de captura y de detección. Los inventores descubrieron que muchos anticuerpos publicados y disponibles en el mercado mostraban cruce aparente entre C3 intacto y varios productos de escisión de C3 o entre diferentes productos de escisión de C3. Por ejemplo, ciertos anticuerpos monoclonales contra C3a humano muestran reactividad cruzada significativa e inesperada con C3b y con iC3b. Se reconoció que la reactividad cruzada puede ser una fuente significativa de inexactitud en ciertas situaciones. De interés particular en el desarrollo de un ensayo para iC3b fue el cruce aparente entre C3 intacto e iC3b observado con muchos de los anticuerpos de iC3b probados. Ensayos adicionales mostraron que el cruce aparente entre C3b e iC3b fue aún más significativo con al menos algunos de estos anticuerpos. Esto fue de interés debido a que se espera que los niveles de iC3b estén presentes a niveles mucho menores que C3 intacto en muestras de paciente. Un aspecto de ciertas realizaciones de la invención es la selección de anticuerpos con especificidad para C3 intacto o iC3b para reducir al mínimo este cruce aparente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos con especificidad para C3 intacto o para iC3b, no son sustancialmente reactivos de forma cruzada. En este contexto, "sustancialmente no reactivo de forma cruzada" se refiere a menos de aproximadamente el 0,1 % reactivo de forma cruzada, lo que significa que una solución a 1 $\mu\text{g/ml}$ de C3 debe registrar como menos de aproximadamente 1 ng/ml de iC3b. El umbral de aproximadamente el 0,1 % se basa en los niveles fisiológicos de C3 intacto y de iC3b en un individuo normal. Los niveles normales de iC3b son aproximadamente el 0,5 % aquellos de C3 total en circulación. Si el cruce aparente de C3 contribuye más de aproximadamente el 25 % a la señal de iC3b en un ensayo de activación de complemento, el ensayo puede producir resultados con falsos positivos que anulan la utilidad del ensayo.

"Fluido corporal" se refiere a cualquier fluido en el cuerpo que pueda ensayarse para la activación de complemento. Los fluidos corporales incluyen, pero sin limitación, sangre total, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de herida, fluido de lavado bronqueoalveolar y líquido cefalorraquídeo. Véase la figura 19 para una lista no limitante de fluidos corporales adecuados.

5

"Nivel de activación de complemento" se refiere a la cantidad de complemento (en general, C3), que se activa en un punto temporal determinado. Las cantidades (es decir, niveles) de C3 intacto, iC3b y/o C3 total se expresan típicamente en cuanto a la concentración, pero se pueden expresar en cuanto a masa o peso. La concentración se puede expresar de diversas maneras, por ejemplo, en cuanto a molaridad, molalidad, fracción molar, fracción en masa (masa de una sustancia en una mezcla como una fracción de la masa de la mezcla completa), masa por volumen unitario, etc. Con fines de descripción en el presente documento, en general se usará la concentración (por ejemplo, masa por volumen unitario). El nivel de activación de complemento también puede describirse como una relación de iC3b con respecto a C3 intacto o total, o como una relación de C3a con respecto a C3 total.

10

"Trastorno asociado a complemento", como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno o afección caracterizada por una modificación en la activación de complemento. Los ejemplos de trastornos asociados a complemento incluyen, pero sin limitación, trauma, tal como lesión traumática de cerebro, lesión de médula espinal, cirugía y presión intracraneal; dificultad respiratoria, tal como alergias graves, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), fallo multiorgánico (MOF), síndrome de dificultad respiratoria aguda o en adultos (ARDS), choque séptico y conmoción; hemoglobinuria nocturna paroxismal (PNH); angioedema hereditario, enfermedad renal, tal como nefritis glomerular, infección, nefritis lúpica y enfermedad renal que requiere trasplante de órgano, enfermedad autoinmune, tal como diabetes mellitus I, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, miastenia gravis, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico; isquemia/lesión por reperfusión, enfermedades del corazón, tal como infarto de miocardio y parada cardíaca; embarazo, incluyendo preeclampsia y síndrome de hipoxia fetal; enfermedad ocular, tal como degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de ojo seco e infección ocular; trasplante de órgano, incluyendo rechazo de trasplante, detección de rechazo inminente, detección de infección, y control de ajustes en regímenes de fármacos inmunosupresores; infección, incluyendo sepsis, neumonía, infección de vejiga, infección del tracto urinario e infección renal y trastornos neurológicos, incluyendo esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y trastorno de estrés post-traumático.

20
25
30

"Control" se refiere a una muestra que tiene un nivel de conocido de referencia de activación de complemento. En algunas realizaciones, el control tiene un nivel de activación de complemento comparable al de un individuo que no está experimentando un trastorno asociado a complemento, de tal forma que una muestra de ensayo que tiene un nivel de activación de complemento que se desvía en comparación al control es indicativa de un trastorno asociado a complemento. En ciertas realizaciones, un trastorno asociado a complemento se indica cuando el nivel de activación de complemento de la muestra de prueba se desvía de manera estadísticamente significativa en comparación al control.

35

"Patrón de activación de C3", como se usa en el presente documento, se refiere a cambios en los niveles de activación de C3 con el paso del tiempo.

40

"Desviado" y "una desviación" como se usan en el presente documento, se refieren a las desviaciones estadísticamente significativas en comparación con un nivel de referencia en un control. Dependiendo del analito que se ensaya, un nivel desviado de muestra de ensayo se puede elevar o disminuir con respecto al nivel de control.

45

"Disminuido", en comparación con un nivel de referencia en un control, se refiere a disminuido de manera estadísticamente significativa. En una respuesta inflamatoria aguda, los niveles de C3 intactos se empobrecen según C3 se descompone en sus productos de activación. En ciertas realizaciones, los niveles de C3 intactos se consideran disminuidos en comparación con un nivel de referencia en un control en aproximadamente un 10 %.

50

"Elevado", en comparación con un nivel de referencia en un control, se refiere a elevado de manera estadísticamente significativa. En una respuesta inflamatoria aguda, los niveles de iC3b se aumentan según C3 se compone en sus productos de activación. En ciertas realizaciones, una relación de iC3b con respecto a C3 intacto que se eleva en comparación con la relación normal de 0,005 es indicativa de activación de C3.

55

"Epítope" se refiere a la porción mínima de una molécula que se reconoce por, y de esta manera determina la inmunoespecificidad de, un anticuerpo que se une a tal epítope. El término también se usa en el presente documento para referirse a la porción mínima de una molécula que se reconoce por un agente de unión no

específico de anticuerpo. A menos que se indique otra cosa, se asume en el presente documento que un agente de unión específica que se une a una proteína de complemento se une a un epítoto presente y accesible para la unión en la proteína nativa, es decir, el epítoto no es un neopítoto.

- 5 Un "distrés inflamatorio" o "disfunción inflamatoria" se produce cuando la respuesta inflamatoria es incapaz de resolver o eliminar los estímulos hacia los que se dirige la respuesta inflamatoria. En casos graves, la respuesta inflamatoria aumenta hasta que se desgasta el control homeostático sobre el proceso. En una realización, un nivel de activación de complemento determinado por los ensayos y métodos divulgados en el presente documento se correlaciona directamente con la gravedad de la dificultad respiratoria que se experimenta por un individuo. Por ejemplo, cuando la concentración de iC3b es aproximadamente el 1-2,5 % de C3 intacto, puede decirse que el distrés inflamatorio del paciente es levemente grave. Cuando la concentración de iC3b es aproximadamente 2,5-5 % de C3 intacto, se puede decir que el distrés inflamatorio del paciente es moderadamente grave. Cuando la concentración de iC3b está por encima del 5 % de C3 intacto, se dice que el distrés inflamatorio del paciente es altamente grave. El entendimiento de la gravedad del distrés inflamatorio de un paciente puede informar del tratamiento del médico del individuo. Por ejemplo, si el individuo presenta un nivel altamente grave de distrés inflamatorio, como se indica por los ensayos y métodos descritos en el presente documento, el médico puede proporcionar el tratamiento médico de emergencia dentro de los puntos temporales más tempranos del distrés inflamatorio, a fin de minimizar el daño de la respuesta inflamatoria.
- 10
- 15
- 20 "Etiqueta" se refiere a un resto que facilita la detección directa o indirecta y/o la medición cuantitativa o relativa de una molécula a la que se une. Una etiqueta detectable produce frecuentemente una señal tal como fluorescencia, quimioluminiscencia, radioactividad, color, propiedades magnéticas o paramagnéticas, etc., que la vuelven detectable, por ejemplo, por el uso de instrumentos que detectan fluorescencia, quimioluminiscencia, radioactividad, color, campo magnético, resonancia magnética, etc., o en algunos casos por inspección visual. La etiqueta puede ser, por ejemplo, sustancia fluorescente; pigmento; sustancia quimioluminiscente o luminiscente; sustancia coloreada; sustancia magnética, o una partícula metálica no magnética tal como coloide de oro. En una realización específica, los anticuerpos detectores adecuados para su uso en los presentes métodos y ensayos se conjugan con una etiqueta de oro coloidal, que proporciona una señal de color.
- 25
- 30 "Neopítoto" se refiere a un epítoto que se genera o se vuelve detectable como resultado de la escisión proteolítica de un componente de complemento o producto de escisión.

En ciertas realizaciones de los ensayos y métodos desvelados en el presente documento, el complemento presente en la muestra de fluido corporal ensayada no se activa de manera sustancial por el propio ensayo o método. "No activado sustancialmente", como se usa en este contexto, significa que los resultados del inmunoensayo de flujo lateral están sustancialmente libres de activación *in vitro* provocada por los métodos y/o materiales de ensayo. De esta manera, se evitan resultados de ensayo con falsos positivos para la activación de complemento, puesto que el inmunoensayo de flujo lateral es rápido y requiere menos manipulación de muestra, evitando de este modo muchos de los estímulos que contribuyen a la activación de complemento *in vitro*.

35

40

"Sitio de atención", como se usa en el presente documento, se refiere a un dispositivo o método que se puede usar o realizar en la cama del paciente o en el sitio de lesión del paciente. Las pruebas en el sitio de atención en general no requieren envío de una muestra a un laboratorio para su procesamiento o la experiencia de un técnico de laboratorio experto. Los métodos y pruebas en el sitio de atención que se describen en el presente documento permiten que un médico reciba información crítica en la cama del paciente, o en el sitio de lesión traumática o clasificación, lo que puede dirigir la atención del paciente durante los primeros momentos críticos después de una crisis fisiológica que desencadena la activación de complemento.

45

"Lector" se refiere a un instrumento adecuado para la detección de la señal producida por la etiqueta. Se conocen en la técnica diversos instrumentos para la detección de señales de etiqueta en pruebas de diagnóstico. En una realización específica de la presente invención, la etiqueta es oro coloidal y el lector es un instrumento adecuado para la detección cualitativa y/o cuantitativa de la señal de color producida por la etiqueta. Los lectores adecuados están disponibles en el mercado en una diversidad de proveedores, incluyendo BioAssay Works (Ijamsville, MD), ESE-Quant de Qiagen (Hilden, Alemania), Easterline LRE (Nordlingen, Alemania), y Detekt Biomedical (Austin, TX).

50

55 En una realización específica, el lector es un lector portátil que cuantifica la cantidad o concentración de C3 intacto, iC3b o C3 total.

"Tratamiento", como se usa en el presente documento, incluye cualquier tratamiento de diagnóstico, terapéutico, preventivo o reparador administrado a un individuo. En algunas realizaciones, el tratamiento incluye realizar pruebas

de diagnóstico adicionales en el individuo. En otras realizaciones, el tratamiento incluye tratamiento terapéutico, tal como administrar un agente terapéutico al individuo. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en antibióticos, agentes antiinflamatorios e inhibidores de complemento. En otras realizaciones, el tratamiento incluye modificar un tratamiento que el individuo ha recibido ya o está recibiendo. Por ejemplo, en una realización, el tratamiento de un individuo en un respirador incluye optimizar el respirador.

El sistema de complemento comprende más de 30 proteínas celulares y de suero y juega papeles importantes en la inmunidad innata y adaptativa. Hay tres rutas principales de activación de complemento. La ruta clásica se activa principalmente por complejos inmunes, específicamente anticuerpos IgG/IgM unidos a antígeno. Otros activadores incluyen lipopolisacárido, mielina, compuestos polianiónicos, proteína C reactiva (CRP) y ADN y ARN microbiano. La ruta de lectina se activa por polisacáridos con grupo sin manosa y otros azúcares comunes en hongos y bacterias. La ruta alternativa se media por activación directa de C3 por sustancias "extrañas" que incluyen frecuentemente componentes de la pared celular microbiana. Estas tres rutas principales de activación de complemento convergen en el componente central de complemento de proteína 3 (C3). C3 es un mediador central de la inflamación y se activa por muchos factores que provocan inflamación. Véase las figuras 1 y 2 para una vista general esquemática del sistema de complemento.

La ruta clásica se desencadena típicamente por complejos inmunes, que son complejos de antígeno unidos con anticuerpos, en general que pertenecen a los isotipos IgM o IgG. Los inmunocomplejos, a su vez, se unen al componente de complemento C1, que está comprendido por C1q, C1r y C1s. La unión de C1q a un complejo de anticuerpo-antígeno desencadena la activación de C1r y C1s. Después, C1 activado escinde el componente C4 para producir C4a y C4b. C4b es capaz de la unión covalente a las superficies celulares, aunque únicamente aproximadamente un cinco por ciento lo hace. El 95 por ciento restante reacciona con agua para formar un C4b activado soluble. El componente 2 puede asociarse entonces con C4b, después de lo cual se activa por C1s en C2a y C2b. C4b y C2a se combinan para formar C4bC2a, C3 convertasa de la ruta clásica (CP).

La CP convertasa escinde C3 para formar C3a y C3b. Al igual que C4b activado, C3b puede unirse covalentemente a la superficie celular o reaccionar con H₂O y permanecer en solución. C3b activado tiene múltiples funciones. Por sí mismo, puede servir como una opsonina para hacer que la célula o partícula decorada se ingiera más fácilmente por los fagocitos. Adicionalmente, C3b puede asociarse con C4bC2a (la CP C3 convertasa) para una C5 convertasa. El complejo, denominado C4bC2aC3b se denomina CP C5 convertasa. Como alternativa, C3b puede formar el núcleo de otra C3 convertasa denominada C3 convertasa de la ruta alternativa (AP).

La ruta alternativa (AP) es otro mecanismo por el que C3 puede llegar a activarse. Típicamente, se activa por dianas tales como superficies microbianas y diversos polisacáridos complejos y otros materiales. Esta ruta alternativa también se puede iniciar de manera espontánea por la escisión del enlace tioéster en C3 por una molécula soluble para formar C3(H₂O). C3(H₂O) se une el factor B, que permite que el factor D escinda el factor B en Ba y Bb. Bb permanece asociado a C3(H₂O) para formar el complejo C3(H₂O)Bb, que actúa como una C3 convertasa y escinde C3, dando como resultado C3a y C3b.

C3b formado ya sea a través de este proceso o a través de las rutas clásicas o de lectina se une a las dianas (por ejemplo, en las superficies celulares) y forma un complejo con el factor B, que posteriormente se escinde por el factor D y forma Bb, dando como resultado C3bBb, que se denomina C3 convertasa de la ruta alternativa (AP). La unión de otra molécula de C3b a la AP C3 convertasa produce C3bBbC3b, que es la AP C5 convertasa.

La ruta de complemento de lectina se inicia por la unión de lectina de unión a manosa (MBL) y la serina-proteasa asociada a MBL (MASP) a carbohidratos. El gen MB1-1 (conocido como LMAN-1 en humanos) codifica para una proteína de membrana integral tipo 1 localizada en la región intermedia entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El gen MBL-2 codifica para la proteína soluble de unión a manosa en suero. En la ruta de lectina humana, MASP-1 y MASP-2 están implicados en la proteólisis de C4 y C2, lo que conduce a C3 convertasa, que conduce a la producción de una C5 convertasa como se ha descrito anteriormente para la CP.

La C5 convertasa generada a través de cualquiera de las tres rutas escinde C5 para producir C5a y C5b. Después, C5b se une a C6, C7 y C8, que cataliza la polimerización de C9 para formar el complejo de unión a membrana (MAC) C5b-9. El MAC de montaje se inserta por sí mismo en la membrana celular diana, que forma un poro delineado por un anillo de moléculas de C9. La formación de MAC provoca lisis celular de los microbios invasores, la formación de MAC en células huésped también puede provocar lisis, pero no necesariamente. Las cantidades sublíxicas de MAC en la membrana de células pueden afectar a la función celular de muchas maneras. Los pequeños productos de escisión C3a, C4a y C5a son anafilatoxinas y median múltiples reacciones en la respuesta

inflamatoria aguda. C3a y C5a también son potentes factores quimiotácticos que atraen las células del sistema inmune, tales como neutrófilos y macrófagos al área de crisis.

El componente de complemento C3 es útil como un biomarcador de alerta general al que el cuerpo está respondiendo para alguna forma de crisis fisiológica, tal como lesión, infección u otro proceso de enfermedad. El complemento se ha asociado con una amplia variedad de enfermedades, incluyendo lupus, artritis, hemorragia intracraneal, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad cardíaca y degeneración macular relacionada con la edad. En muchos casos, la gravedad de la enfermedad se correlaciona con el nivel de activación de complemento. En algunos casos, el complemento puede tener una función en la patología de la enfermedad. En estos casos, el cuerpo no es capaz de controlar de manera exitosa la causa de la inflamación, que va de local a sistémica. La activación de complemento puede dañar directamente el tejido o hacerlo de forma indirecta sobreactivando células y reclutando células inmunes que a su vez provocan la destrucción de tejido. Los ejemplos de sobreactivación incluyen choque anafiláctico, fallo multiorgánico (MOF), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

La activación de complemento en el período inmediato y temprano después del trauma se ha documentado bien y se presenta por varios mecanismos diferentes, implicando probablemente a las tres rutas principales. La liberación y activación de las enzimas proteolíticas puede activar directamente los componentes de complemento. El daño al tejido y la alteración del forro endotelial exponen las superficies que carecen de las moléculas endógenas inhibitoras de complemento que protegen normalmente a los tejidos huésped. Estas superficies son susceptibles de depósito de C3b y activación de rutas alternativas. Además, la activación de complemento se activa por reperfusión de tejidos después de isquemia post-traumática.

Múltiples líneas de evidencia sugieren que la activación de complemento es un factor importante en muchas de las complicaciones de trauma severo, contribuyendo significativamente a la lesión de I/R, ARDS, MODS, lesión secundaria al SNC y sepsis. En primer lugar, es evidente que la activación de complemento es un caso común en el período inmediato post-trauma en víctimas humanas de trauma, y varios estudios han proporcionado evidencia que sugiere que el grado de activación de complemento se correlaciona positivamente con resultados deficientes. En segundo lugar, hay una evidencia considerable de que la activación de complemento es una causa principal de lesión I/R en modelos animales de trauma, así como en víctimas de trauma. En tercer lugar, numerosos estudios han demostrado que la deficiencia de complemento o la administración de inhibidores de complemento reduce el daño a tejido y mejora los resultados en una diversidad de modelos experimentales, incluyendo hemorragia, lesión I/R y lesión del SNC.

Varios estudios midieron la activación de complemento en pacientes con trauma en puntos temporales secuenciales después de un trauma grave e investigaron la existencia de una correlación entre la activación de complemento y la gravedad de la lesión. También se controlaron los resultados adversos, tales como ARDS, fallo multiorgánico, sepsis y muerte, en relación a la activación de complemento. En un estudio, los parámetros de complemento se determinaron durante 14 días en pacientes de trauma en riesgo de ARDS. Todos los pacientes mostraron una disminución en los niveles en suero de C3, C4, C5 y de los inhibidores C1-INH, factor H de complemento (CFH), y factor I de complemento (CFI) en las primeras 24 horas, indicando el consumo por altos niveles de activación de complemento. Véase Catania y col., Immunological consequence of trauma and shock, Ann. Acad. Med. Singapore 28: 120-32 (1999); Hecke, y col., Circulating complement proteins in multiply trauma patients--correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome, Crit. Care Med. 25(12): 2015-24 (1997); Huber-Lang y col., Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis, J. Immunol. 169: 3223-31 (2002); Kang y col., Change of complement system predicts the outcome of patients with severe thermal injury, J. Burn Care Rehabil. 24: 148-53 (2003); y Younger y col., Detrimental effects of complement activation in hemorrhagic shock, J. Appl. Physiol. 90: 441-46 (2001).

Los ensayos y métodos actualmente divulgados proporcionan varias ventajas con respecto a los ensayos y métodos de complemento anteriores conocidos en la técnica: En primer lugar, los presentes ensayos y métodos son adecuados para un uso en el sitio de atención, produciendo resultados en cuestión de minutos, en lugar de horas. El rápido retorno de los resultados permite que un médico actúe sobre los cambios en la activación de C3 casi en tiempo real para dirigir la atención del paciente durante los primeros momentos críticos después de lesión traumática o en el inicio de la crisis fisiológica. Los ensayos y métodos son relativamente fáciles de usar y no requieren la disponibilidad de un laboratorio externo o un técnico de laboratorio experto. En segundo lugar, los presentes ensayos y métodos requieren menos etapas de manipulación, y así se minimiza la activación de C3 intacto debido a la manipulación y el procesamiento, lo que conduce a resultados de ensayos con falsos positivos. En tercer lugar, los ensayos y métodos descritos en el presente documento emplean pares de anticuerpos cuidadosamente

seleccionados para permitir la medición de las proteínas de complemento C3 intacto y/o iC3b, el biomarcador de activación principal de C3. Esta medición más precisa de la activación de complemento, en comparación con los ensayos tradicionales de C3 total, permite el análisis de la renovación y cantidad real de C3 restante y disponible para la activación.

5

En una realización, se proporciona un método para tratar un individuo en riesgo de un trastorno asociado a complemento, comprendiendo el método: (a) obtener una muestra de un fluido corporal del individuo; (b) medir un nivel de activación de complemento en la muestra a través de un inmunoensayo de flujo lateral en el sitio de atención; (c) correlacionar el nivel de activación de complemento en la muestra con un riesgo de un trastorno asociado a complemento comparando el nivel de activación de complemento en la muestra con un nivel de referencia en un control, donde una desviación en el nivel de activación de complemento en la muestra en comparación con el nivel de referencia en el control indica que el individuo está en riesgo de un trastorno asociado a complemento; (d) seleccionar un tratamiento para el individuo, basándose en la correlación de la etapa (c); y (e) tratar al individuo con el tratamiento seleccionado de acuerdo con la etapa (d).

10

15

En otra realización del método, el trastorno asociado a complemento se selecciona entre el grupo que consiste en trauma, distrés inflamatorio, trastornos autoinmunes, hemorragia intracraneal, infección, rechazo a trasplante, enfermedad ocular, enfermedad cardíaca, isquemia/lesión por reperfusión, degeneración macular relacionada con la edad, hemoglobinuria nocturna paroxismal (PNH), angioedema hereditario, enfermedad renal, trastornos asociados al embarazo, y trastornos neurológicos. En una realización específica, el trastorno asociado a complemento es distrés inflamatorio. El distrés inflamatorio, también conocida, como disfunción inflamatoria, incluye una diversidad de enfermedades y afecciones asociadas con hiperinflamación.

20

Los ejemplos de enfermedades y afecciones asociadas a distrés inflamatorio incluyen, pero sin limitación, fallo orgánico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de dificultad respiratoria en adulto (ARDS), sepsis y neumonía.

25

En una realización del método, el fluido corporal obtenido del individuo se selecciona entre el grupo que consiste en sangre total, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de herida, fluido de lavado bronqueoalveolar y líquido cefalorraquídeo. Véase la figura 19 para una lista no limitante de fluidos corporales adecuados. En una realización específica, el fluido corporal se obtiene del individuo en un plazo de una hora de un evento fisiológico que activa la activación de complemento. En otra realización específica, el fluido corporal es sangre total.

30

En una realización del método, el inmunoensayo de flujo lateral detecta la presencia o ausencia de uno o más de C3 intacto e iC3b en la muestra. En otra realización del método, el ensayo de flujo lateral detecta la presencia de C3 total. En otra realización, el inmunoensayo de flujo lateral se lee por un lector. En una realización más específica, el lector cuantifica una concentración de uno o más de C3 intacto e iC3b en la muestra. En otra realización específica, el lector cuantifica una concentración de C3 total en la muestra.

35

Los niveles de activación de complemento se evalúan para desviación de un valor de referencia de un control que indica que se activa el complemento en el individuo. En ciertas realizaciones, el nivel o concentración de iC3b en la muestra de ensayo se eleva en comparación con un control, indicando que se activa C3 y se ha degradado adicionalmente en su producto de activación, iC3b. En otras realizaciones, el nivel o concentración de C3 intacto se disminuye en comparación con un control, indicando que C3 intacto se ha convertido en sus productos de descomposición o activación y, por lo tanto, está agotado en el individuo.

40

45

El nivel de activación de complemento se correlaciona con una gravedad de distrés inflamatorio: cuanto mayor sea el nivel de activación de complemento, mayor es el riesgo de desarrollar distrés inflamatorio y/o mayor la gravedad del distrés inflamatorio experimentada por el individuo. Por lo tanto, en otra realización del método, el trastorno asociado a complemento es distrés inflamatorio y la concentración de uno o más de C3 intacto e iC3b se correlaciona con una gravedad del distrés inflamatorio.

50

El nivel de activación de complemento determinado por el presente método proporciona información de diagnóstico en el sitio de atención que puede dirigir el cuidado del paciente. En base al riesgo de trastorno asociado a complemento correlacionado en la etapa (c), el médico puede seleccionar el tratamiento apropiado para el individuo. En una realización, el tratamiento comprende realizar la prueba adicional en el individuo para determinar la causa del distrés inflamatorio. Por ejemplo, los pacientes con trauma severo que requieren asistencia con respirador para respirar están en riesgo de dificultad respiratoria aguda provocada ya sea por neumonía asociada a respirador (VAP) o disfunción inflamatoria no infecciosa. Un nivel de activación de complemento puede indicar disfunción inflamatoria

55

activa o inminente antes de que se presenten los signos clínicos de crisis respiratoria. Los presentes ensayos y métodos pueden indicar si el individuo está experimentando VAP o dificultad respiratoria no infecciosa. Como alternativa, los presentes ensayos y métodos pueden indicar pruebas adicionales (tal como lavado bronqueoalveolar (BAL)) en un punto temporal anterior de lo que ahora es práctica normal. Si el individuo padece VAP, el tratamiento puede comprender administrar un agente terapéutico tal como un antibiótico o conjunto de antibióticos. Si la disfunción inflamatoria está causada por un medio no infeccioso, se puede seleccionar una terapia entre el grupo que consiste en ajuste del respirador, agentes antiinflamatorios e inhibidores de complemento.

Si el individuo padece una lesión traumática cerebral o hemorragia intracraneal, las pruebas adicionales pueden comprender obtener una muestra de líquido cefalorraquídeo para el análisis adicional. Si el individuo padece una herida, incluyendo una herida no curable, las pruebas adicionales pueden comprender obtener una muestra de exudado de herida para análisis adicional.

Se conocen en la técnica muchos inhibidores de complemento y son adecuados para su uso en los presentes métodos. En una realización, el inhibidor de complemento se selecciona entre el grupo que consiste en inhibidores naturales de complemento y derivados de los mismos, compstatina y análogos de la misma, anticuerpos de anti-complejo de ataque a la membrana (MAC), anticuerpos anti-C3, anticuerpos anti-C5, antagonistas del receptor de C3a y antagonistas del receptor de C5a. Los ejemplos de inhibidores de complemento adicionales se pueden encontrar, por ejemplo, en Emlen y col., Therapeutic complement inhibition: new developments, Semin. Thromb. Hemost. 36(6): 660-68 (2101); Wagner y col., Therapeutic potential of complement modulation, Nat. Rev. Drug Discov. 9(1): 43-56 (21010); y Ricklin y col., Complement-targeted therapeutic, Nat. Biotechnol. 25(11): 1265-75 (2007), cuyo contenido se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

Uno de los beneficios del presente método es el rápido retorno de los resultados, lo que permite que un médico dirija el cuidado del paciente en respuesta a cambios en la activación de complemento casi en tiempo real. Mientras que los ensayos anteriores para la activación de complemento conocidos en la técnica requieren laboratorios completos, técnicos especializados y horas para su finalización, los presentes métodos y ensayos proporcionan resultados en un marco temporal mucho más corto. En una realización, el presente método proporciona una medición del nivel de activación de complemento en la muestra en aproximadamente 30 minutos o menos. En una realización más específica, el método proporciona un nivel de activación de complemento en la muestra en aproximadamente 30, aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 5 o aproximadamente 3 minutos o menos. La rapidez del método permite que el médico determine un nivel de activación de complemento y seleccione una terapia apropiada en respuesta, durante un período de tiempo clínicamente significativo. De hecho, los presentes métodos se pueden realizar en la cama del paciente o incluso en el sitio de la lesión traumática - por ejemplo, en una ambulancia o en la clasificación de un paciente en el campo de batalla - y el nivel de activación de complemento determinado por el ensayo y método puede dirigir el cuidado del paciente dentro de la primera hora crítica después del trauma.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para controlar a un individuo que ha recibido o está recibiendo tratamiento para una afección fisiológica y que sabe que padece un trastorno asociado a complemento, comprendiendo el método: (a) obtener muestras seriadas de un fluido corporal del individuo; (b) determinar un nivel de activación de complemento en cada una de dichas muestras mediante un inmunoensayo de flujo lateral en el sitio de atención; (c) comparar los niveles de activación de complemento en la muestras seriadas para detectar un cambio en el nivel de activación de complemento con el paso del tiempo; y (d) modificar el tratamiento del individuo, basándose en la correlación de la etapa (c). Las muestras sanguíneas seriadas se recogen y se ensayan para controlar los niveles de activación de complemento en respuesta al tratamiento.

En una realización, el trastorno asociado a complemento se selecciona entre el grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, distrés inflamatorio, trastornos autoinmunes, hemorragia intracraneal, bacteriemia, rechazo de trasplante, enfermedad ocular, enfermedad cardíaca, isquemia/lesión por reperfusión, degeneración macular relacionada con la edad, hemoglobinuria nocturna paroxismal (PNH), angioedema hereditario, enfermedad renal, trastornos asociados al embarazo y trastornos neurológicos y pacientes con trauma con riesgo de disfunción inflamatoria, tal como neumonía asociada a respirador (VAP), dificultad respiratoria y fallo multiorgánico.

Como con otros métodos divulgados en el presente documento, en ciertas realizaciones, el fluido corporal se selecciona entre el grupo que consiste en sangre total, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de herida, fluido de lavado bronco alveolar y líquido cefalorraquídeo. En una realización, el inmunoensayo de flujo lateral detecta la presencia o ausencia de uno o más de C3 intacto e iC3b en la muestra. En otra realización, el inmunoensayo de flujo lateral se lee por un lector que es capaz de cuantificar la concentración de C3 intacto, iC3b o

C3 total.

En ciertas realizaciones, el médico detectará una disminución en la activación de complemento en respuesta al tratamiento que está recibiendo el paciente. Por consiguiente, el médico modificará el tratamiento del individuo ajustando la dosificación de la medicación administrada, tales como agentes antiinflamatorios o inhibidores de complemento, o interrumpiendo el tratamiento una vez que los niveles de complemento han regresado a la normalidad (es decir, un nivel en un individuo que no está experimentando un trastorno asociado a complemento). En otras realizaciones, el médico detectará un aumento en los niveles de activación de complemento en respuesta al tratamiento que está recibiendo el paciente. Por consiguiente, el médico modificará el tratamiento del individuo aumentando la dosis de medicamentos, tales como agentes antiinflamatorios o inhibidores de complemento, hasta que se logre una estabilización deseada o disminución en los niveles de activación de complemento. Si no se detecta ningún cambio en el nivel de activación de complemento, el médico puede modificar el tratamiento del individuo, o puede elegir mantener el régimen de tratamiento del individuo hasta que se observa un cambio en los niveles de activación de complemento.

15

Con referencia a la figura 4, el inmunoensayo de flujo lateral descrito en el presente documento está comprendido por una tira de membrana de celulosa **3**, en la que se dispone una almohadilla de muestra **1** para absorber el fluido de muestra y para permitir la migración gradual de los inmunocomplejos de muestra y conjugado de partículas, una mecha **6** en el extremo distante de la tira que absorbe la muestra líquida y el material conjugado para facilitar la migración capilar a través de la tira de membrana de celulosa **3**, y una almohadilla de conjugado de partículas **2** que comprende un anticuerpo de detección unido a una etiqueta, o un conjugado de detección. La tira de membrana de celulosa **3** es la región de la zona de ensayo, en la que se dispone una línea de ensayo **4**, que comprende anticuerpos monoclonales o policlonales separados para capturar el conjugado de detección y una línea de control **5**, que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control, tal como IgG, e indica al usuario que el ensayo se realizó con éxito. El inmunoensayo de flujo lateral comprende adicionalmente un respaldo de película de poliéster **7** unido a la tira de membrana de celulosa **3**, y un respaldo de película laminada sensible a presión **8**. Cada inmunoensayo de flujo lateral se envasa en una bolsa barrera de vapor nulo Mylar®.

Cuando se aplica una muestra de ensayo a la almohadilla de muestra **1**, la muestra migra desde la almohadilla de muestra **1** a través de la almohadilla de conjugado de partículas **2**, donde un analito diana presente se unirá al conjugado de anticuerpo de detección. Después, la muestra continúa migrando a través de la membrana **3** hasta que alcanza la línea de ensayo **4**, donde el complejo diana/conjugado se unirá a los anticuerpos inmovilizados produciendo una línea visible en la membrana. Después, la muestra migra adicionalmente a lo largo de la tira de membrana **3** hasta que alcanza la línea de control **5**, donde el exceso de conjugado de anticuerpo que no se unió a la línea de ensayo se unirá a la línea de control y producirá una segunda línea visible en la membrana. El ligando de la línea de control frecuentemente es un anticuerpo contra la región Fc del anticuerpo conjugado. Esta línea de control indica que la muestra ha migrado a través de la membrana como se desea.

En ciertas realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral comprende una tira de membrana individual para la detección de un analito individual. En otras realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral detecta dos o más analitos. Cuando el inmunoensayo de flujo lateral detecta dos o más analitos, el ensayo se puede configurar con múltiples tiras de membrana dispuestas en paralelo (véase, por ejemplo, la representación esquemática de la figura 5(B)), o con múltiples líneas de ensayo dispuestas en serie en una tira de membrana individual (véase, por ejemplo, la representación esquemática de la figura 9(B)).

45

Con referencia a la figura 6, en algunas realizaciones, la tira de membrana del inmunoensayo de flujo lateral se encierra en un casete de ensayo **9** que tiene un puerto **10** para instilar la muestra de ensayo y una ventana **11** para ver los resultados de la prueba. Los inmunoensayos de flujo lateral de la figura 6 se configuran para evaluar un analito individual y cada uno comprende una línea de ensayo **4** y una línea de control **5**.

50

Con referencia a la figura 7, en algunas realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral se configura para ensayar dos analitos en un único casete de ensayo en paralelo. En algunas realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral comprende dos puertos **10** para instilar las muestras de ensayo y una tira de membrana separada **3** para cada analito (véase la figura 7(A)). En otras realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral comprende un puerto **10** para instilar la muestra y una tira de membrana separada **3** para cada analito (véase la figura 7(B)).

55

Con referencia a la figura 8, en algunas realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral se configura para ensayar tres analitos en un único casete de ensayo en paralelo. En algunas realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral comprende tres puertos **10** para instilar las muestras de ensayo y una tira de membrana separada **3** para cada

analito (véase la figura 8(A)). En otras realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral comprende un puerto **10** para instilar la muestra y una tira de membrana separada **3** para cada analito (véase la figura 8(B)).

Con referencia a la figura 10, en ciertas realizaciones, el inmunoensayo de flujo lateral se configura para ensayar **5** múltiples analitos en un único casete de ensayo en serie. La figura 10(A) representa un casete de ensayo que comprende una tira de membrana **3**, con dos líneas de ensayo **4** y una línea de control **5** dispuesta en serie. La figura 10(B) representa un casete de ensayo que comprende una tira de membrana **3** con tres líneas de ensayo **4** y una línea de control **5** dispuesta en serie.

10 El inmunoensayo de flujo lateral actualmente divulgado proporciona una detección cualitativa y/o cuantitativa de los marcadores diana. De manera cualitativa, dos líneas claras en la membrana es un resultado positivo, mientras que una línea individual en la zona de control es un resultado negativo.

En una realización, se proporciona un inmunoensayo de flujo lateral para la detección en el sitio de atención de un **15** marcador de la activación de complemento en una muestra de fluido corporal que comprende proteínas de complemento, comprendiendo el inmunoensayo de flujo lateral: una tira de membrana; un anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo del marcador; una línea de ensayo que comprende un anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo del marcador; y una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control, donde el marcador se selecciona entre el grupo que consiste en C3 intacto e iC3b.

20 En una realización, el anticuerpo de detección comprende una etiqueta que proporciona una señal que se puede leer visualmente por un médico o de forma electrónica a través de un lector comercial. Varias etiquetas son adecuadas para su uso en los ensayos actualmente divulgados. En una realización específica, la etiqueta es oro coloidal.

25 Los pares de anticuerpos de detección y de captura se deben seleccionar de manera cuidadosa para evitar interferir con el cruce aparente entre C3 e iC3b. La cuestión primaria es C3 intacto que produce una señal en un ensayo para la detección de iC3b. Puesto que ambas moléculas se obtienen a partir de la misma molécula de proteína, el cruce aparente puede presentar un problema. Puesto que C3 está presente en niveles de aproximadamente 200 veces mayores que iC3b en individuos normales, incluso un ligero grado de cruce aparente puede tener un impacto **30** principal en la medición exacta de la activación de iC3b y C3. Esto se complica adicionalmente por el hecho de que la manipulación inapropiada, el almacenamiento inapropiado, e incluso los propios reactivos pueden provocar una activación *in vitro* de C3. De manera sorprendente, los Solicitantes descubrieron que no todos los anticuerpos adecuados para su uso en los ensayos de ELISA tradicionales son igualmente adecuados para su uso en los ensayos de la presente invención. Las tablas 1 y 2 que se indican a continuación muestran las dificultades en la **35** identificación de los pares de anticuerpos adecuados para su uso en los ensayos de la presente invención. Los inventores analizaron 19 pares de anticuerpos en el inmunoensayo de C3 intacto y 18 pares de anticuerpos en el inmunoensayo de flujo lateral de iC3b. De estos pares, Hycult[®] HM2075 y MP Biomedicals[®] 55237 produjeron los mejores resultados, sin reactividad cruzada, en el inmunoensayo de flujo lateral de C3 intacto. Quidel[®] A209, con MP Biomedicals[®] 55237 o Quidel[®] A250 produjo los mejores resultados en el inmunoensayo de flujo lateral iC3b. De **40** forma interesante, los inventores apreciaron que los pares de anticuerpo adecuados para su uso en los ensayos tradicionales de ELISA necesariamente no son igualmente adecuados para su uso en los inmunoensayos de flujo lateral descritos en el presente documento. Por ejemplo, Hycult[®] HM2198 produjo un ensayo con aproximadamente un 1 % de reactividad cruzada, con variabilidad considerable de prueba a prueba. Esta reactividad cruzada produjo una señal de iC3b de falso positivo a un nivel de dos veces el de iC3b normal en circulación. Puesto que la **45** duplicación o triplicación real de los niveles de iC3b serán signos de activación masiva de complemento, un inmunoensayo de flujo lateral con el 1 % de reactividad cruzada no tiene utilidad clínica. MP Biomedicals[®] (55237) trabajó mucho mejor, produciendo una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 0,5 % (aproximadamente 0,05 %), compatible con la utilidad clínica. Sin embargo, cabe señalar que ambos anticuerpos tuvieron rindieron igualmente bien en ensayos de ELISA tradicionales.

50

Tabla 1: Resultados de cribado de anticuerpos en ensayo de C3 intacto

Anticuerpo de Captura			Anticuerpo de detección			Notas
Especie	Antígeno	Proveedor	Especie	Antígeno	Proveedor	
Ratón	C3a	Hycult (HM2075)	Cabra	C3	MP Biomedicals	Sin reactividad cruzada en condiciones de ensayo

ES 2 564 290 T3

					(55237)	
Ratón	C3a	Quidel (A203)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Varianza de ensayo a ensayo demasiado alta
Pollo	C3a	GenTex (GTX78198)	Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Sin lecturas positivas (no funciona)
Ratón	C3a	Quidel (A203)	Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Reacciona de forma cruzada con C3b/iC3b+++
Cabra	C3a	SantaCruz (sd 7237)	Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Ab únicamente puede reaccionar con C3as, no C3 intacto
Ratón	C3a	Hycult (HM2073)	Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Reacciona de forma cruzada con C3b/iC3b+
Ratón	C3a	Hycult (HM2074)	Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Sin lecturas positivas
Pollo	C3a	Abeam (ab48580)	Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Sin lecturas positivas
Ratón	C3a	Hycult (HM2073)	Pollo	C3a	Abeam (ab48580)	Sin lecturas positivas
Ratón	C3a	Quidel (A203)	Pollo	C3a	Abeam (ab48580)	Sin lecturas positivas
Pollo	C3a	Abeam (ab48580)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Reacciona de forma cruzada con C3b/iC3b+++
Ratón	C3a	Hycult (HM2073)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Reacciona de forma cruzada con C3b/iC3b+++
Cabra	C3a	SantaCruz (sd 7237)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Similar a HM2073, mejor en suero diluido
Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Ratón	C3a	Quidel (A203)	Cuando anti-C3d es Ab de captura, se une a C3b y iC3b también, lo que impide una unión eficiente de C3 intacto al analizar las muestras
Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Pollo	C3a	GenTex (GTX78198)	

Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Cabra	C3a	SantaCruz (SC17237)	mixtas.
Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Pollo	C3a	Abeam (ab48580)	
Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Ratón	C3a	Hycult (HM2073)	
Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Ratón	C3a	Hycult (HM2074)	

Tabla 2: Resultados de Cribado de Anticuerpos en ensayo de iC3b

Anticuerpo de Captura			Anticuerpo de Detección			Notas
Especie	Antígeno	Proveedor	Especie	Antígeno	Proveedor	
Ratón	iC3b	Quidel (A209)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Sin reactividad cruzada en condiciones de ensayo, buena señal
Ratón	iC3b	Abd serotec (MCA2607)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Reacciona de forma cruzada con C3b/C3c a alta concentración
Ratón	iC3b	Abd serotec (MCA2607)	Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Intensidad de señal inferior que usando anti-C3
Ratón	iC3b	Quidel (A209)	Conejo	C3d	Abeam (ab15981)	Intensidad de señal inferior que usando anti-C3
Ratón	iC3b	Quidel (A209)	Rata	C3d	Hycult (HM2198)	Buena señal, inferior que usando anti-C3
Ratón	iC3b	Quidel (A209)	Rata	C3g	Hycult (HM2199)	Sin señal
Ratón	iC3b	Quidel (A209)	Ratón	Neo G3d	Quidel (A250)	Intensidad de señal inferior que usando HRP-anti C3, especificidad mejor que usando anti-C3d
Rata	iC3b	Hycult (HM2199)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Buena señal
Rata	iC3b	Hycult (HM2199)	Ratón	Active C3	Hycult (HM2168)	Señal débil
Rata	iC3b	Hycult (HM2199)	Ratón	Active C3	Hycult (HM2257)	Sin señal
Rata	iC3b	Hycult (HM2199)	Ratón	iC3b	Quidel (A209)	Sin señal
Rata	iC3b	Hycult (HM2199)	Ratón	Neo C3d	Quidel (A250)	Sin señal
Ratón	Active C3	Hycult (HM2168)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Demasiado cruce aparente con C3
Ratón	Active C3	Hycult (HM2168)	Rata	C3g	Hycult (HM2199)	Señal débil
Ratón	Active C3	Hycult (HM2257)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Sin señal
Ratón	Active C3	Hycult	Rata	C3g	Hycult	Sin señal

		(HM2257)			(HM2199)	
Ratón	C3 alpha	Meridian (H54189M)	Cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Sin señal
Ratón	Neo C3d	Quidel (A250)	Rata	C3g	Hycult (HM2199)	Señal muy baja

En una realización, el marcador es C3 intacto y el anticuerpo de detección se une a un primer epítoto de C3 intacto, donde el primer epítoto es un dominio de C3a que está presente en C3 intacto y que pierde tras la activación de C3.

En una realización adicional, el marcador es C3 intacto y el anticuerpo captura se une a un segundo epítoto en C3, donde el segundo epítoto es una región en el dominio C3d que está presente en C3 intacto, C3b, iC3b y C3d. Véase la figura 3(A).

En otra realización, el marcador es iC3b y el anticuerpo de detección se une a un primer epítoto de iC3b, donde el primer epítoto es un neoepítoto en iC3b que se revela cuando C3b se desactiva en iC3b y que se obstruye cuando iC3b se degrada adicionalmente en C3c y C3d. En una realización adicional, el marcador es iC3b y el anticuerpo de captura se une a un segundo epítoto en iC3b, donde el segundo epítoto es un neoepítoto presente únicamente en C3b, iC3b y C3dg. Véase la figura 3(B).

En un ejemplo muy específico, el marcador es C3 intacto, el anticuerpo de captura es Hycult[®] HM2075 y el anticuerpo de detección es MP Biomedicals[®] 55237. En otro ejemplo muy específico, el marcador es iC3b, el anticuerpo de captura es Quidel[®] A209 y el anticuerpo de detección es MP Biomedicals[®] 55237. En otro ejemplo muy específico, el marcador es iC3b, el anticuerpo de captura es Quidel[®] A209 y el anticuerpo de detección es Quidel[®] A250.

Varios fluidos corporales son adecuados para su uso en los inmunoensayos de flujo lateral y métodos de la presente invención. Véase, por ejemplo, la figura 19, para una lista no limitante de fluidos corporales adecuados para su uso en los ensayos y métodos descritos en el presente documento. En una realización, el fluido corporal se selecciona entre el grupo que consiste en sangre total, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de herida, líquido de lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo. En una realización específica, el fluido corporal es sangre total.

Un experto en la técnica apreciará que son adecuados diversos analitos de control para su uso en los inmunoensayos de flujo lateral de la presente invención para proporcionar verificación de la terminación con éxito del ensayo. En una realización, el analito de control es IgG.

Otra ventaja del presente inmunoensayo de flujo lateral es evitar la activación de complemento sustancial en la muestra, en virtud del propio ensayo, lo que puede conducir a resultados con falsos positivos. Se sabe bien que C3 es una proteína exigente capaz de autoactivarse debido a manipulación, almacenamiento y contacto de la muestra con materiales o sustancias extrañas. Por lo tanto, la naturaleza de C3 puede conducir a positivos falsos en los ELISA y de turbidez tradicionales para activación de complemento que implican una extensa manipulación de la muestra y múltiples etapas. El presente inmunoensayo de flujo lateral evita dichos falsos positivos reduciendo y/o eliminando las etapas de preparación y manipulación de la muestra. Por consiguiente, en una realización del presente ensayo de flujo lateral, el complemento en la muestra de fluido corporal no se activa de manera sustancial experimentalmente por el inmunoensayo de flujo lateral.

En una realización alternativa, es deseable tener de un inmunoensayo de flujo lateral que pueda detectar más de un marcador de activación de complemento en un ensayo individual. Por ejemplo, es altamente deseable un inmunoensayo de flujo lateral dual que pueda detectar de manera cualitativa y cuantitativa tanto C3 intacto como iC3b en la misma alícuota de un fluido corporal. Por lo tanto, en otra realización, se proporciona un inmunoensayo de flujo lateral para la detección en el sitio de atención de marcadores de activación de complemento en una muestra de fluido corporal que comprende proteínas de complemento, comprendiendo el inmunoensayo de flujo lateral: una tira de membrana; un primer anticuerpo de detección que se une a un primer epítoto de C3 intacto; una primera línea de ensayo que comprende un primer anticuerpo de captura que se une a un segundo epítoto del C3 intacto; un segundo anticuerpo de detección que se une a un primer epítoto de iC3b; una segunda línea de ensayo que comprende un segundo anticuerpo de captura que se une a un segundo epítoto de iC3b; y al menos una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control.

En una realización, el primer y segundo anticuerpos de detección comprenden una etiqueta que proporciona una señal. Son adecuadas diversas etiquetas para su uso en los ensayos actualmente divulgados. En una realización, la

etiqueta es oro coloidal.

5 Son adecuados diversos fluidos corporales para su uso en los inmunoensayos de flujo lateral de la presente invención. Véase, por ejemplo, la figura 19 para una lista no limitante de fluidos corporales adecuados. En una realización, el fluido corporal se selecciona entre el grupo que consiste en sangre total, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de herida, líquido de lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo. En una realización específica, el fluido corporal es sangre total.

10 Un experto en la técnica apreciará que son adecuados diversos analitos de control para su uso en los inmunoensayos de flujo lateral de la presente invención para proporcionar verificación de la terminación con éxito del ensayo. En una realización, el analito de control es IgG.

15 En otra realización, el complemento en la muestra de fluido corporal no se activa de manera sustancial experimentalmente por el mismo inmunoensayo de flujo lateral.

En una realización, el primer anticuerpo de detección se une a un primer epítotope de C3 intacto, donde el primer epítotope de C3 intacto es un dominio de C3a que está presente en C3 intacto y que se pierde en la activación de C3.

20 En otra realización, el primer anticuerpo de captura se une a un segundo epítotope de C3 intacto, donde el segundo epítotope es una región en el dominio de C3d que está presente en C3 intacto, C3b, iC3b y C3d.

25 En otra realización, el segundo anticuerpo de detección se une a un primer epítotope de iC3b, donde el primer epítotope de iC3b es un neopítotope en iC3b que se revela cuando C3b se desactiva en iC3b y que se obstruye cuando iC3b se degrada adicionalmente en C3c y C3d.

En aun otra realización, el segundo anticuerpo de captura se une a un segundo epítotope de iC3b, donde el segundo epítotope de iC3b es un neopítotope presente únicamente en C3b, iC3b y C3dg.

30 En otra realización, los anticuerpos que se unen a C3 intacto y los anticuerpos que se unen iC3b no son sustancialmente reactivos de forma cruzada.

Los siguientes ejemplos se dan a modo de ilustración y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Clasificación del paciente

5 Antes de ensayar la primera muestra de ensayo, se realiza una curva estándar usando 10 ng/ml 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml y 1,000 ng/ml de estándares de C3 intacto y de iC3b. Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral se leen con un lector electrónico después de 20 minutos.

El ensayo se usa para evaluar la gravedad de lesión en 15, 30 o 60 minutos de lesión. Es más útil para pacientes
 10 que pueden haber sufrido lesiones no obvias por inspección visual. Se recoge una gota de sangre de una línea arterial (línea A) o por punción en dedo. Se extrae una muestra de 10 ul usando una pipeta de volumen fijo. Después, la mezcla se mezcla con 990 ul de tampón de muestra. La sangre y el tampón de muestra se mezclan. Usando una pera de succión de volumen fijo, se extraen 100 ul y se pipetea sobre el casete de inmunoensayo de flujo lateral que contiene tiras integradas de ensayo de C3 intacto y de iC3b. Como alternativa, se pueden aplicar
 15 100 ul a casetes separados de ensayo de flujo lateral de C3 intacto y de iC3b. Después de 10 minutos, pero antes de 40 minutos, el casete se lee y resultados se registran, preferiblemente de forma electrónica por un lector. Si la primera lectura tiene un nivel de iC3b (o relación equivalente de iC3b:C3 intacto) mayor de 50 µ/ml en sangre, existe evidencia de activación de complemento y alta inflamación. El personal asume una lesión grave y alerta al personal de urgencias. De otro modo, se toma una segunda lectura 5 minutos más tarde. Si el nivel de iC3b (o relación
 20 equivalente de iC3b:C3 intacto) es mayor de 50 µg/ml en sangre o el nivel de iC3b ha aumentado en más del 25 %, se asume que el paciente tiene una lesión grave y se alerta al personal de urgencias. Un aumento menor o ningún aumento sugiere, pero no es concluyente, una lesión menos grave.

Ejemplo 2

25

Control de trayectoria de un paciente con trauma

Al comienzo del cambio, el personal de la UCI realiza una curva estándar usando 10 ng/ml 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml y 1,000 ng/ml de estándares de C3 intacto y de iC3b. Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral se
 30 leen con un lector electrónico después de 20 minutos.

El objetivo del control de trayectoria es detectar cambios en el estado inflamatorio e inmune de los pacientes que se han estabilizado después de trauma severo. En este ejemplo, se va a detectar la dificultad respiratoria provocada por pulmonía o una disfunción inflamatoria. El perfil de paciente esperado es uno que tiene una puntuación de
 35 gravedad de lesión (ISS) igual o mayor de 16 y que requiere asistencia con respirador para respirar.

El paciente recibe una prueba de complemento a intervalos frecuentes, lo que se alinea con los puntos temporales para ensayar los niveles de glucosa en sangre. Este intervalo entre ensayos normalmente es de aproximadamente dos horas. Se recoge sangre usando el mismo método que para el ensayo de glucosa, por la línea A o por punción
 40 en dedo. Se extrae una muestra de 10 ul usando una pipeta de volumen fijo. Después, la mezcla se muestra con 990 ul de tampón de muestra. La sangre y el tampón de muestra se mezclan. Usando una pera de succión de volumen fijo, se extraen 100 ul y se pipetea sobre el casete de LFA que contiene casetes integrados de inmunoensayo de flujo lateral de C3 intacto y de iC3b. Como alternativa, se pueden aplicar 100 ul a casetes separados de C3 intacto y de iC3b. El casete o casetes se colocarán en el lector a lado de la capa del paciente. El
 45 lector se ajusta para tomar una lectura después de 20 minutos. Los datos se recogen y se registran los valores de iC3b, C3 intacto y iC3b:(C3 intacto) en cada punto temporal.

Los cambios en los niveles de C3 intacto o iC3b con el paso del tiempo o los cambios en la velocidad de cambio pueden indicar un cambio en el estado inflamatorio. Un aumento abrupto en iC3b, acompañado por una disminución
 50 de C3 intacto, indica dificultad respiratoria inminente. Como siguiente paso, un médico realiza un lavado broncoalveolar (BAL) en el paciente para determinar si el paciente está experimentando VAP. Si hay presentes bacterias a niveles de 10⁴ por ml o más, es indicativo de VAP y el paciente se pone en terapia con antibióticos. De otro modo, se asume disfunción inflamatoria no infecciosa y el paciente se puede tratar con agentes antiinflamatorios y/o inhibidores de complemento. El paciente también puede tener su configuración del respirador ajustada.

55

Ejemplo 3

Determinación de la gravedad de la enfermedad y eficacia del tratamiento en un paciente con lupus eritematoso sistémico (SLE)

5

Antes de ensayar la primera muestra de ensayo, se realiza una curva estándar usando 10 ng/ml 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml y 1000 ng/ml de estándares de C3 intacto e iC3b. Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral se leen con un lector electrónico después de 20 minutos.

- 10 El ensayo se usa para evaluar la gravedad inicial de la enfermedad, así como la eficacia de la terapia. Uno de los diagnósticos estándares realizados en pacientes con SLE es la medición de los niveles de C3 total. Los niveles de C3 están normalmente bajos en pacientes con SLE y regresan a la normalidad (>1 mg/ml) después de un tratamiento exitoso. Sin embargo, no se sabe si generalmente la activación de C3 se ha anulado o únicamente se ha ralentizado lo suficiente para permitir que los mecanismos de reabastecimiento normales restauren los niveles de C3
- 15 a la normalidad.

- En cada visita del doctor, se recoge una muestra de sangre del paciente para realizar pruebas de C3 total, C3 intacto e iC3b. Únicamente se requiere una gota para las 3 pruebas combinadas. La sangre se recoge por punción capilar a menos que se extraiga sangre para otras pruebas, en cuyo caso, la sangre procederá de esa fuente. Se recoge una muestra de 10 ul usando una pipeta de volumen fijo. Después, la muestra se mezcla con 990 ul de tampón de muestra. La sangre y el tampón de muestra se mezclan. Usando una pera de pipeta de volumen fijo, se recogen 100 ul y se pipetean sobre el casete de LFA que contiene el casete de flujo lateral integrado que mide el C3 total, C3 intacto e iC3b. Como alternativa, pueden aplicarse 100 ul en casetes separados para cada ensayo. El casete o casetes se ponen en un lector en la oficina del médico. El lector se ajusta para tomar una lectura después
- 20 de 20 minutos.

- Se recogen datos en cada visita del médico. En la visita inicial, la adición de las pruebas de iC3b y C3 intacto proporciona al especialista más información sobre la gravedad de la afección del paciente de la que es posible actualmente. Estará disponible nueva información en el momento en que el especialista considere el estado estable
- 30 del paciente. En este punto, los niveles de iC3b y C3 intacto indican la extensión del proceso de enfermedad restante. Si los niveles de iC3b, en particular, están por encima de lo normal (generalmente >1 %), el proceso de enfermedad subyacente aún es muy activo y el especialista podrá optar por ajustar adicionalmente la terapia aumentando las dosis de fármacos antiinflamatorios o añadiendo medicación adicional.

35 Ejemplo 4

Determinación de niveles basales de C3 intacto e iC3b en el fluido de lágrima basal de individuos sanos durante un periodo de 24 horas.

- 40 Antes de ensayar la primera muestra de ensayo, se realiza una curva estándar usando 10 ng/ml 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml y 3000 ng/ml de estándares de C3 intacto e iC3b. Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral se leen con un lector electrónico después de 20 minutos.

- Para determinar los niveles de C3 intacto e iC3b en el ojo de un individuo sano, se recogen tres lecturas en total. Las
- 45 muestras se recogen y se evalúan en Tiempo = 0 horas, 12 horas y 24 horas.

- Para la recogida de lágrimas, se tira del párpado inferior y se limpia brevemente con Kimwipes® la parte inferior del ojo. Después, Kimwipes® se corta rápidamente cuando se ha recogido la lágrima dejando unos pocos milímetros de borde seco rodeando el punto de la lágrima. Después, la muestra de lágrima de Kimwipes® se pone en 220 ul de
- 50 tampón de diluyente de BioAssay Works y se agita vorticialmente vigorosamente durante 10 segundos. Después de un periodo de espera de un minuto, la muestra se agita vorticialmente de nuevo brevemente. A continuación, se transfieren 100 ul de la muestra a cada inmunoensayo de flujo lateral (C3 intacto e iC3b) y se ensayan.

- Para el análisis, cada casete se inserta en el lector y se lee después de 20 minutos. Los resultados varían entre 50-60 µ/ml de C3 intacto y entre 5-8 µ/ml de iC3b (véase la figura 15).

Ejemplo 5

Determinación de niveles basales de C3 intacto e iC3b en dos individuos sanos en un único punto temporal

5 Antes de ensayar la primera muestra de ensayo, se realiza una curva estándar usando 10 ng/ml 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml y 3000 ng/ml de estándares de C3 intacto e iC3b. Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral se leen con un lector electrónico después de 20 minutos.

Los niveles en reposo de C3 intacto e iC3b se recogen de dos donantes sanos. El lector de inmunoensayo de flujo lateral se enciende. El dedo se limpia usando un hisopo de algodón. El dedo se punza con lanceta y se aprieta suavemente para recoger 10 ul de sangre usando el tubo MICROSAFE® por acción capilar. La muestra de sangre se expulsa directamente en un tubo cargado con 990 ul de tampón de ensayo de muestra, después se tapa y se mezcla por inversión 6-8 veces. Se transfieren 100 ul de mezcla de muestra de sangre a una prueba de C3 CompAct usando 100 ul de pipeta de volumen exacto. Después, una segunda mezcla de muestra de sangre de 100 ul se transfiere a la prueba de iC3b CompAct usando una pipeta de volumen exacto de 100 ul fresca. El cronómetro se ajusta para la lectura después de 20 minutos para ambas pruebas.

Los resultados del primer paciente se determinaron como aproximadamente 500 µg/ml para C3 intacto y 200 ng/ml para iC3b. Esto indica que hay una relación 2500 de C3 intacto con respecto a iC3b en este individuo (véase la figura 16). Los resultados del segundo individuo fueron aproximadamente 1000 µg/ml para C3 intacto y 300 ng/ml para iC3b (véase la figura 17). Ambos de estos valores están dentro de los intervalos normales esperados. Los valores de iC3b se encuentran en el intervalo inferior del que se considera normal.

Ejemplo 6

25 ***Determinación de niveles basales de C3 intacto e iC3b en un individuo sano en un único punto temporal después de ejercicio extenuante***

Usando el protocolo anterior del Ejemplo 5, se ensayó de nuevo uno de los individuos sanos después de ejercicio extenuante (véase la figura 18). El ejercicio no alteró significativamente los niveles de iC3b o C3.

Ejemplo 7

Cruce aparente entre anticuerpos de C3 intacto e iC3b, en inmunoensayos de flujo lateral

35 En un volumen de 1 mililitro, se mezclaron 50 ng/ml de iC3b con cantidades variables de C3 intacto (que variaban de 0 ng/ml a 100.000 ng/ml). Las muestras se mezclaron por inversión 6-8 veces y después se pipetearon 0,1 ml sobre el casete. Las lecturas se tomaron en 20 minutos. El resultado del lector se convirtió en concentración de iC3b usando una curva estándar generada de 10 ng/ml a 100.000 ng/ml. Se restó el fondo de un casete realizado únicamente con tampón. Las contribuciones fraccionales se calcularon restando la concentración iC3b real (de la prueba de iC3b sin C3 añadido) de la concentración aparente de iC3b en cada punto y después normalización frente a concentraciones de iC3b reales. Véase la figura 14. Para los casetes H08K-01, a la mayor concentración de C3 ensayado, aproximadamente la mitad de la señal de iC3b procedía de C3 intacto y la mitad del iC3b real. Para la versión de J24K-03, aproximadamente cuatro veces de tanta señal de iC3b procedía del cruce aparente de C3 intacto que del iC3b actual. Aunque estos pares de anticuerpos trabajan bien en ensayos ELISA, muestran un cruce aparente significativo al usarse en inmunoensayos de flujo lateral para los mismos analitos. A las relaciones fisiológicamente relevantes de 250:1 y 500:1, el C3 intacto contribuye más a la salida de señal de iC3b que el propio iC3b en J24K-03.

50 J24K-03 es un ensayo con anti-C3a monoclonal de ratón en el conjugado de oro y anti-C3d monoclonal de ratón en la línea de ensayo. H08K-01 tiene anti-iC3b monoclonal de ratón en el conjugado de oro y Anti-C3 policlonal en la línea de ensayo.

Ejemplo 8

55 ***Generación de curva estándar de iC3b para inmunoensayos de flujo lateral***

Una realización de la invención comprende una tira de ensayo de flujo lateral sin las fundas de casete. Estas tiras tienen anti-iC3b monoclonal (Quidel® A209) conjugado con oro y el anticuerpo anti-C3 (MP Biomedical® 55237)

conjugado con la tira. Se muestran curvas estándares en la figura 11(A). Las curvas estándares indicaron un intervalo lineal de aproximadamente 10 veces y una sensibilidad de aproximadamente 100 ng/ml. Otra realización de la invención configura las tiras para su uso en un casete que permite una aplicación controlada de la muestra a la tira de ensayo. Esto mejoró la reproducibilidad ensayo a ensayo, aunque aún hay una dependencia del tiempo considerable en el ensayo. Los resultados de curva estándar se muestran en la figura 11(B). Una tercera realización aumenta la concentración de anticuerpo de 0,5 mg/ml a 1 mg/ml aplicado sobre el conjugado de oro y elimina el BSA del tampón de absorción. Los resultados de curva estándar se muestran en la figura 11(C).

Las curvas estándares se generan como se describe en el ejemplo 9 que se indica a continuación.

10

Ejemplo 9

Generación de curva estándar de iC3b para inmunoensayos de flujo lateral

15 Se diluyeron diez (10) μ l de una reserva de iC3b (concentración 1 mg/ml) en 990 μ l de tampón de dilución de muestra para crear 10 μ g/ml reserva de trabajo usando un tubo tapado de 2 ml. El tubo se mezcló por inversión lentamente 10-12 veces. El investigador diluyó 500 μ l de 10 μ g/ml de reserva en 500 μ l de tampón BAW para crear una reserva de 5 μ g/ml en otro tubo tapado de 2 ml. La mezcla se realizó invirtiendo lentamente el tubo 10-12 veces. La dilución 1:1 (500 μ l:500 μ l) se repitió, como se ha descrito anteriormente, nueve veces más para crear las
20 siguientes reservas de trabajo:

10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 2.5 μ g/ml, 1.25 μ g/ml, 625 ng/ml, 313 ng/ml, 156 ng/ml, 78 ng/ml, 39 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml y 0 ng/ml (tampón en solitario).

25 Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral (LFA) se prepararon por marcado y colocación en grupos de tres. Para cada dilución, el investigador pipeteó 100 μ l de la primera reserva de trabajo (10 μ g/ml para C3 intacto y 5 μ g/ml para iC3b) en una entrada de muestra del primer LFA. Para cada concentración, el investigador esperó 20 segundos antes de cargar 100 μ l de la misma reserva de trabajo en el 2º LFA. Los casetes se leyeron después de 10, 20 y 30 minutos usando lector LFDR 101 BioAssay Works (Forsite Diagnostics) usando el ajuste de la línea de ensayo
30 seguido del ajuste de la línea de control, y los datos se registraron.

Después de la finalización del experimento, los datos se representaron usando el software GraphPad Prism 5. La curva estándar se ajusta a la ecuación logística de tres parámetros: $Y = \text{Fondo} + (\text{Parte Superior-Fondo})/(1+EC50/X)$. Véase la figura 12.

35

Ejemplo 10

Generación de curva estándar de C3 intacto para inmunoensayos de flujo lateral

40 Se diluyeron diez (10) μ l de una reserva de C3 intacto (concentración 1 mg/ml) en 990 μ l de tampón de dilución de muestra para crear 10 μ g/ml reserva de trabajo usando un tubo tapado de 2 ml. El tubo se mezcló por inversión lentamente 10-12 veces. El investigador diluyó 500 μ l de 10 μ g/ml de reserva en 500 μ l de tampón BAW para crear una reserva de 5 μ g/ml en otro tubo tapado de 2 ml. La mezcla se realizó invirtiendo lentamente el tubo 10-12 veces. La dilución 1:1 (500 μ l:500 μ l) se repitió, como se ha descrito anteriormente, nueve veces más para crear las
45 siguientes reservas de trabajo:

10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 2.5 μ g/ml, 1.25 μ g/ml, 625 ng/ml, 313 ng/ml, 156 ng/ml, 78 ng/ml, 39 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml y 0 ng/ml (tampón en solitario).

50 Los casetes de LFA se prepararon por marcado y colocación en grupos de tres. Para cada dilución, el investigador pipeteó 100 μ l de la primera reserva de trabajo (10 μ g/ml para C3 intacto y 5 μ g/ml para iC3b) en la entrada de muestra del primer LFA. Para cada concentración, el investigador esperó 20 segundos antes de cargar 100 μ l de la misma reserva de trabajo en el 2º LFA. Los casetes se leyeron después de 10, 20 y 30 minutos usando lector LFDR 101 BioAssay Works (Forsite Diagnostics) usando el ajuste de la línea de ensayo seguido del ajuste de la línea de
55 control, y los datos se registraron.

Después de la finalización del experimento, los datos se representaron usando el software GraphPad Prism 5. La curva estándar se ajusta a la ecuación logística de tres parámetros: $Y = \text{Fondo} + (\text{Parte Superior-Fondo})/(1+EC50/X)$. Véase la figura 13.

Todos los documentos citados se incorporan en el presente documento por referencia; la mención de cualquier documento no pretende considerarse como una admisión de que es técnica anterior con respecto a la presente invención.

5

Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones particulares de la presente invención, será obvio para un experto en la técnica que se pueden hacer diversos cambios y modificaciones diferentes sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, se pretende cubrir en las reivindicaciones adjuntas todos estos cambios y modificaciones que están dentro del alcance de esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo de flujo lateral para la detección del sitio de atención de un marcador de activación de complemento en una muestra de fluido corporal que comprende proteínas de complemento, comprendiendo el
5 inmunoensayo de flujo lateral:
- una tira de membrana;
 - un anticuerpo de detección que se une a un primer epítoto del marcador;
 - una línea de ensayo que comprende un anticuerpo de captura que se une a un segundo epítoto del
10 marcador; y
 - una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control, en el que el marcador se selecciona entre el grupo que consiste en C3 intacto e iC3b.
2. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 1, en el que: (a) el anticuerpo de detección
15 comprende una etiqueta que proporciona una señal; o (b) el fluido corporal se selecciona entre el grupo que consiste en sangre total, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de herida, líquido de lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo.
3. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 1, en el que el marcador es: (a) C3 intacto y el
20 primer epítoto es un dominio C3a que está presente en el C3 intacto y que se pierde tras la activación de C3; o (b) iC3b y el primer epítoto es un neopítoto en iC3b que se revela cuando C3b se desactiva en iC3b y que se ocluye cuando iC3b se degrada adicionalmente en C3c y C3d, opcionalmente en el que el segundo epítoto es un neopítoto presente únicamente en C3b, iC3b y C3dg.
- 25 4. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 1, en el que el segundo epítoto es una región en el dominio C3d que está presente en C3 intacto, C3b, iC3b y C3d.
5. Un inmunoensayo de flujo lateral para la detección del sitio de atención de marcadores de activación de complemento en una muestra de fluido corporal que comprende proteínas de complemento, comprendiendo el
30 inmunoensayo de flujo lateral:
- una tira de membrana;
 - una primer anticuerpo de detección que se une a un primer epítoto de C3 intacto;
 - una primer línea de ensayo que comprende un primer anticuerpo de captura que se une a un segundo
35 epítoto de C3 intacto;
 - un segundo anticuerpo de detección que se une a un primer epítoto de iC3b;
 - una segunda línea de ensayo que comprende un segundo anticuerpo de captura que se une a un segundo epítoto de iC3b; y
 - al menos una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control.
- 40 6. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 5, en el que: (a) el primer y segundo anticuerpos de detección comprenden cada uno una etiqueta que proporciona una señal; o (b) el fluido corporal se selecciona entre el grupo que consiste en sangre total, suero, plasma, orina, lágrimas y líquido cefalorraquídeo.
- 45 7. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 1 o la reivindicación 5, en el que: (a) el analito de control es IgG; o (b) el complemento en la muestra de fluido corporal no se activa sustancialmente de forma experimental por el inmunoensayo de flujo lateral.
8. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 5, en el que el primer epítoto de C3 intacto es un
50 dominio C3a que está presente en C3 intacto y que se pierde tras la activación de C3.
9. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 5, en el que el segundo epítoto de C3 intacto es una región en el dominio C3d que está presente en C3 intacto, C3b, iC3b y C3d.
- 55 10. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 5, en el que el primer epítoto de iC3b es un neopítoto en iC3b que se revela cuando C3b se desactiva en iC3b y que se ocluye cuando iC3b se degrada adicionalmente en C3c y C3d.
11. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 5, en el que el segundo epítoto de iC3b es un

neopéptope presente únicamente en C3b, iC3b y C3dg.

12. El inmunoensayo de flujo lateral de la reivindicación 5, en el que los anticuerpos que se unen a C3 intacto y los anticuerpos que se unen a iC3b no son sustancialmente reactivos de forma cruzada.

5

13. Un método *ex vivo* para la detección del sitio de atención de un marcador de activación de complemento en una muestra de fluido corporal obtenida de un individual que comprende detectar dicho marcador con el inmunoensayo de flujo lateral como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Figura 1
La cascada de complemento

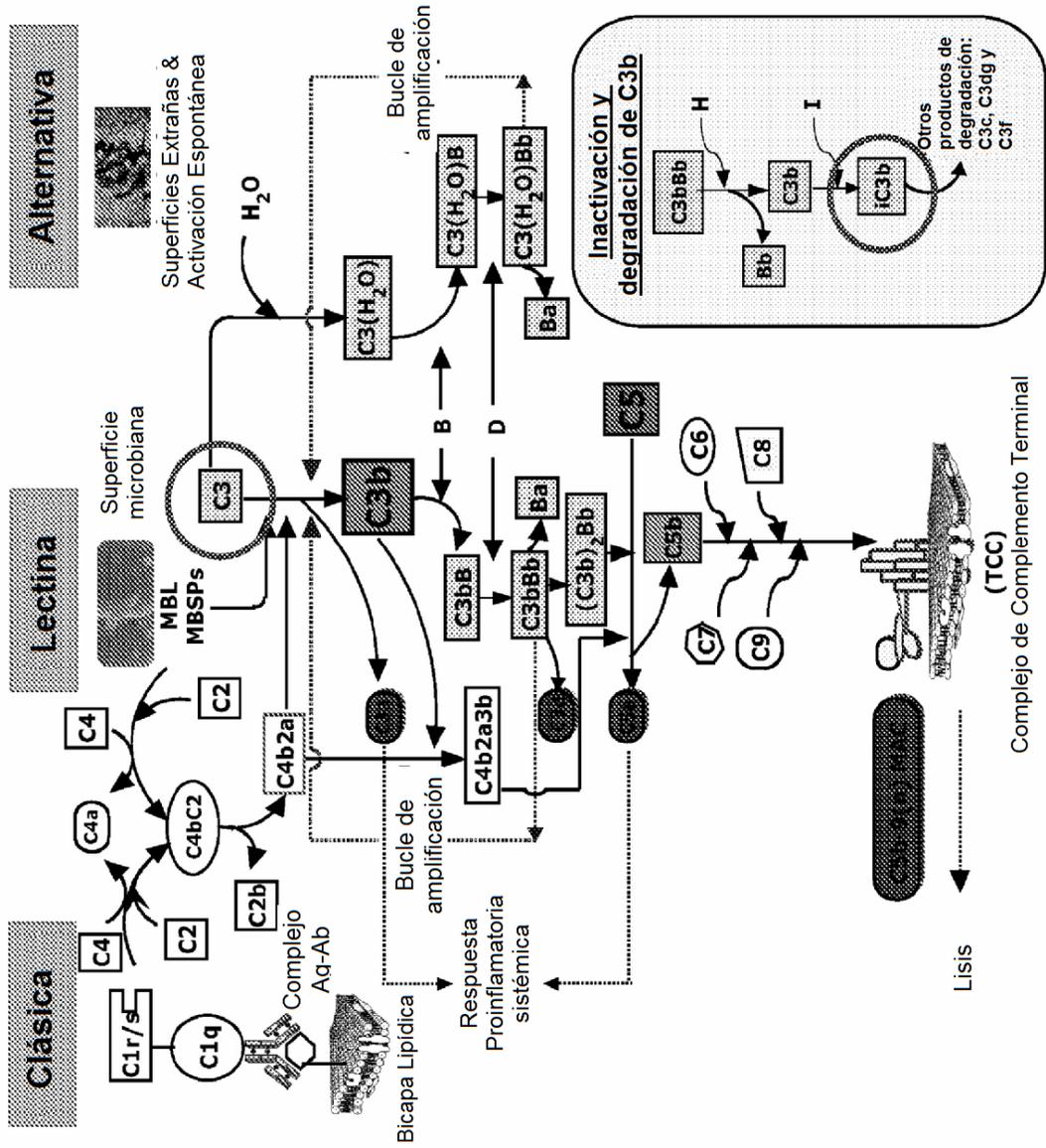


Figura 2
C3 se activa y se desactiva por la actividad proteasa

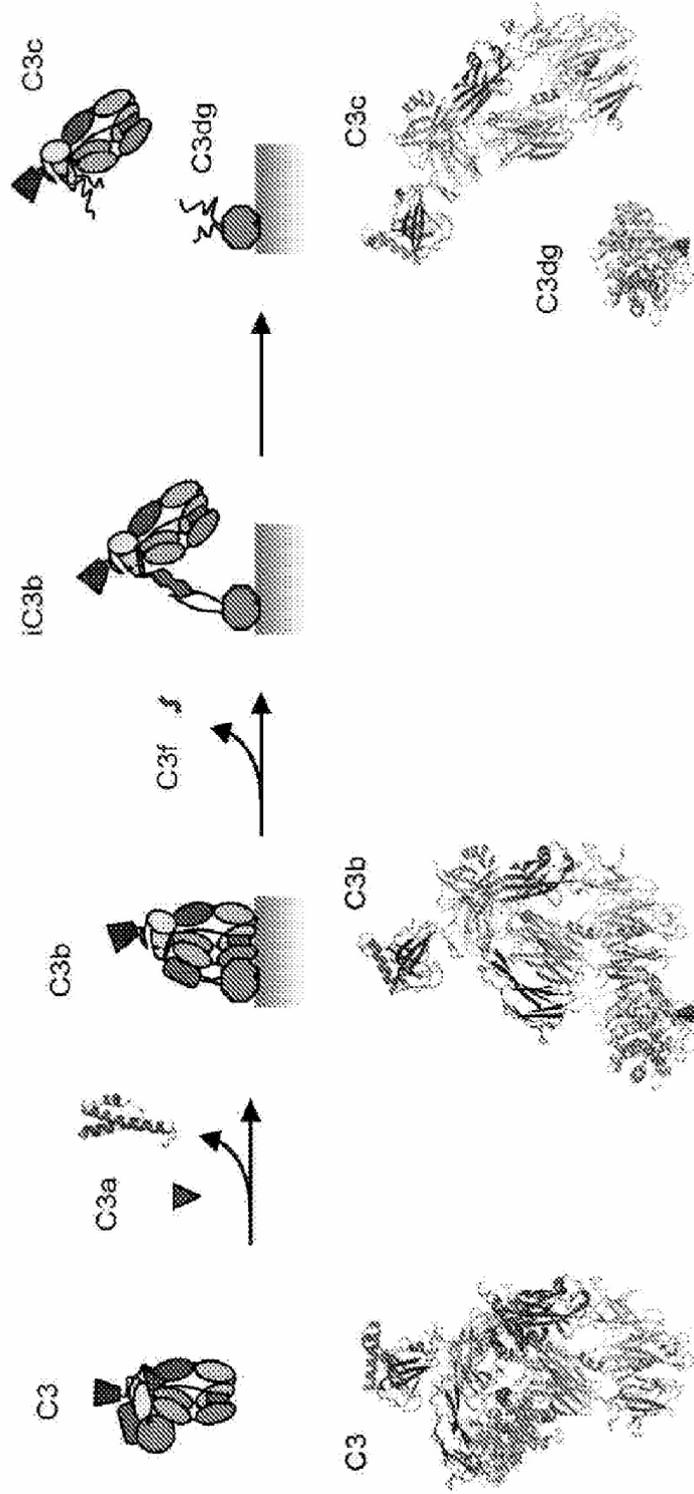


Figura 3
Pares de anticuerpos que reconocen C3 intacto o iC3b

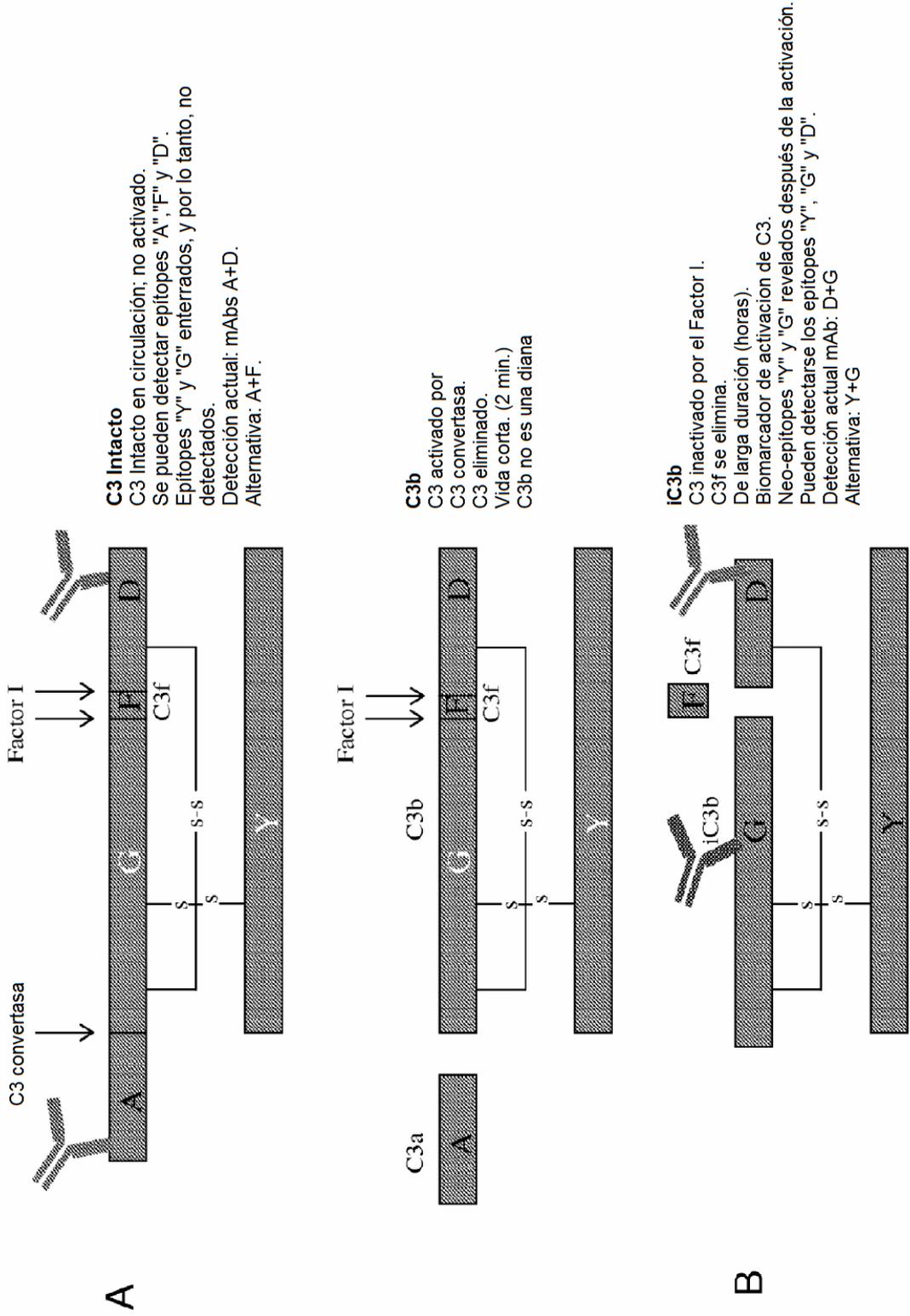


Figura 4

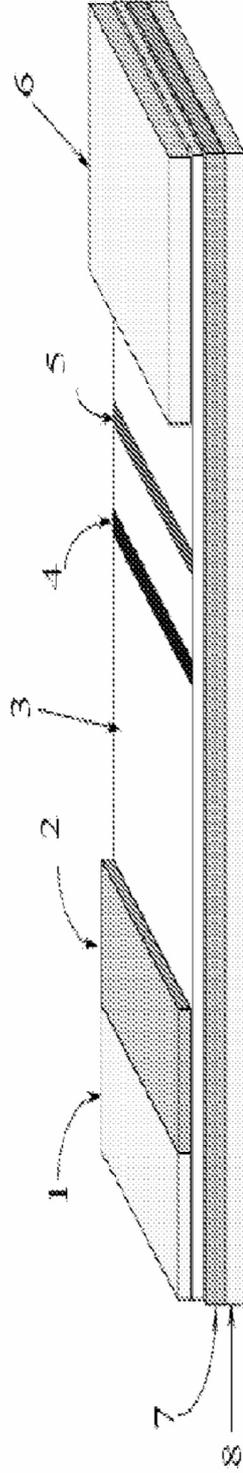


Figura 5
Tiras de membrana de inmunoensayo de flujo lateral individual y doble en paralelo

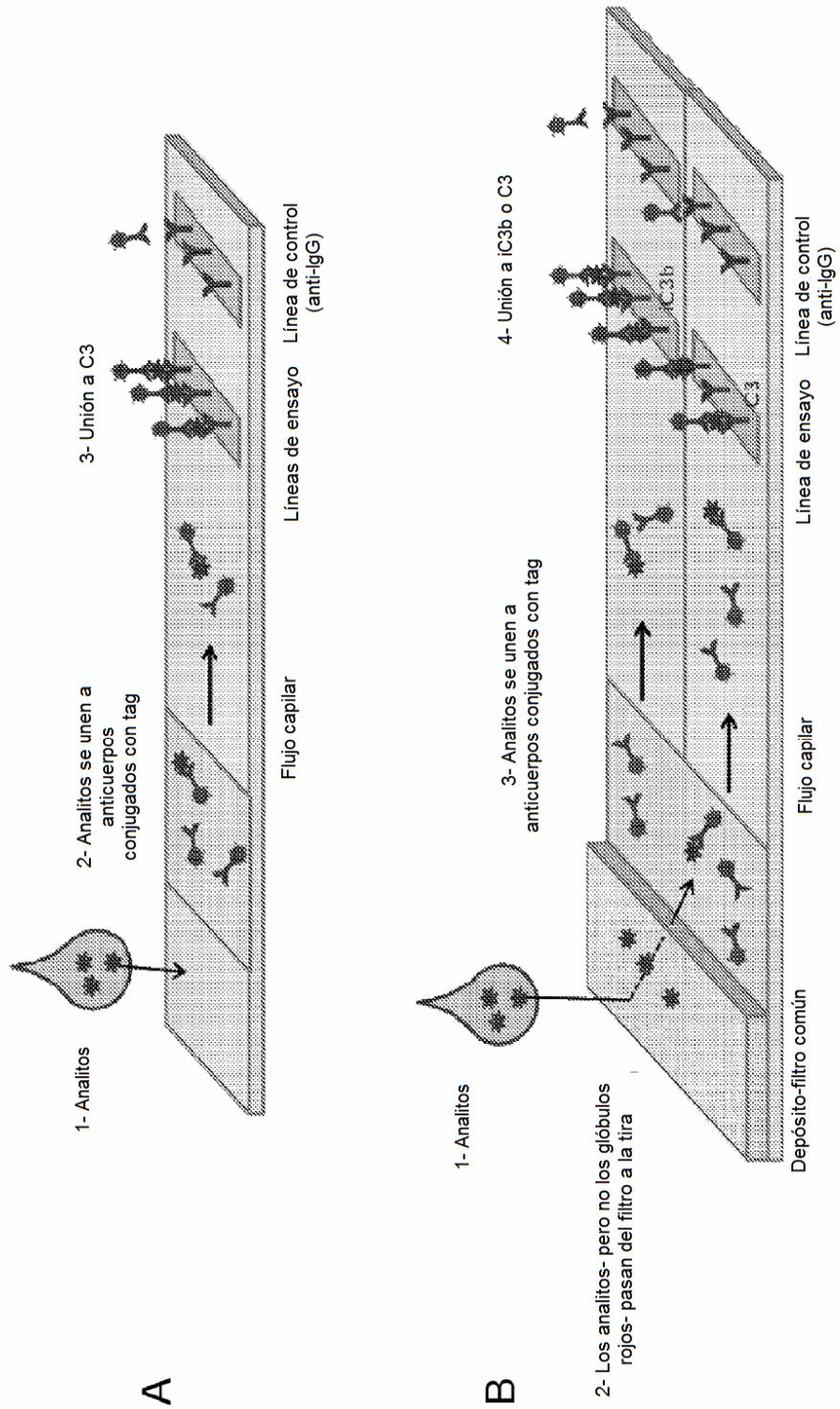


Figura 6
Casetes de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de analito individual

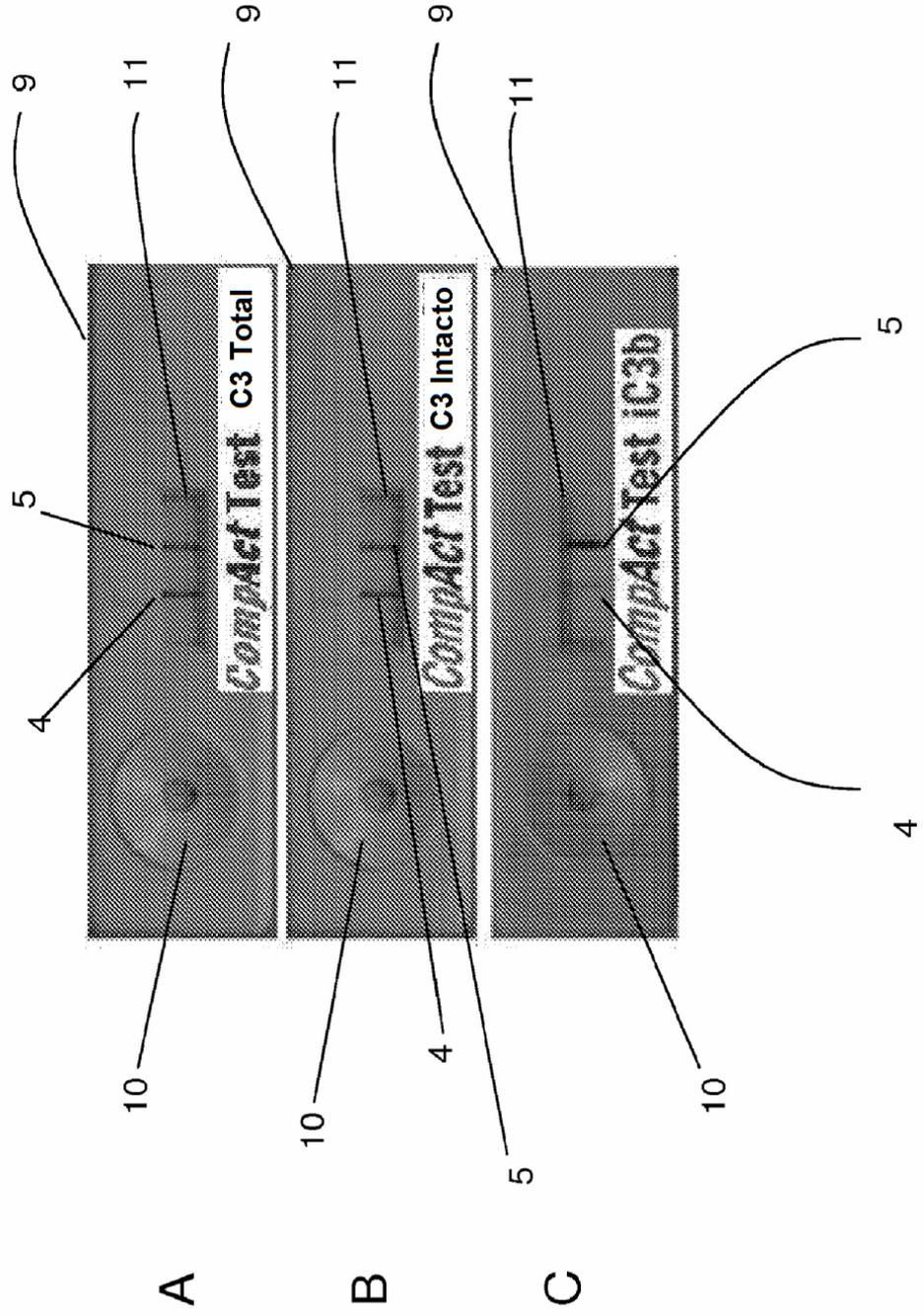


Figura 7
Casetes de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de analito doble en paralelo

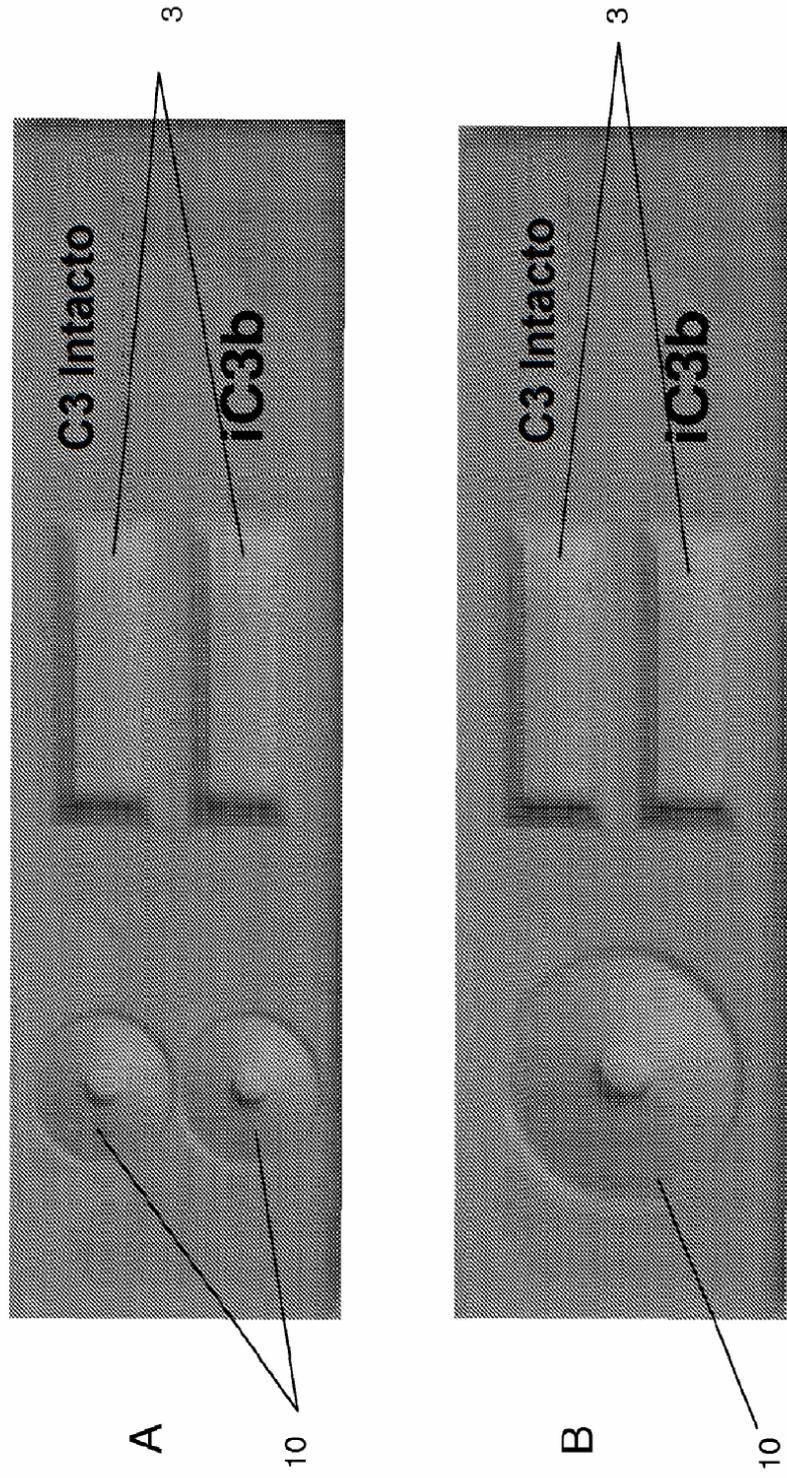


Figura 8
Casetes de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de triple analito en paralelo

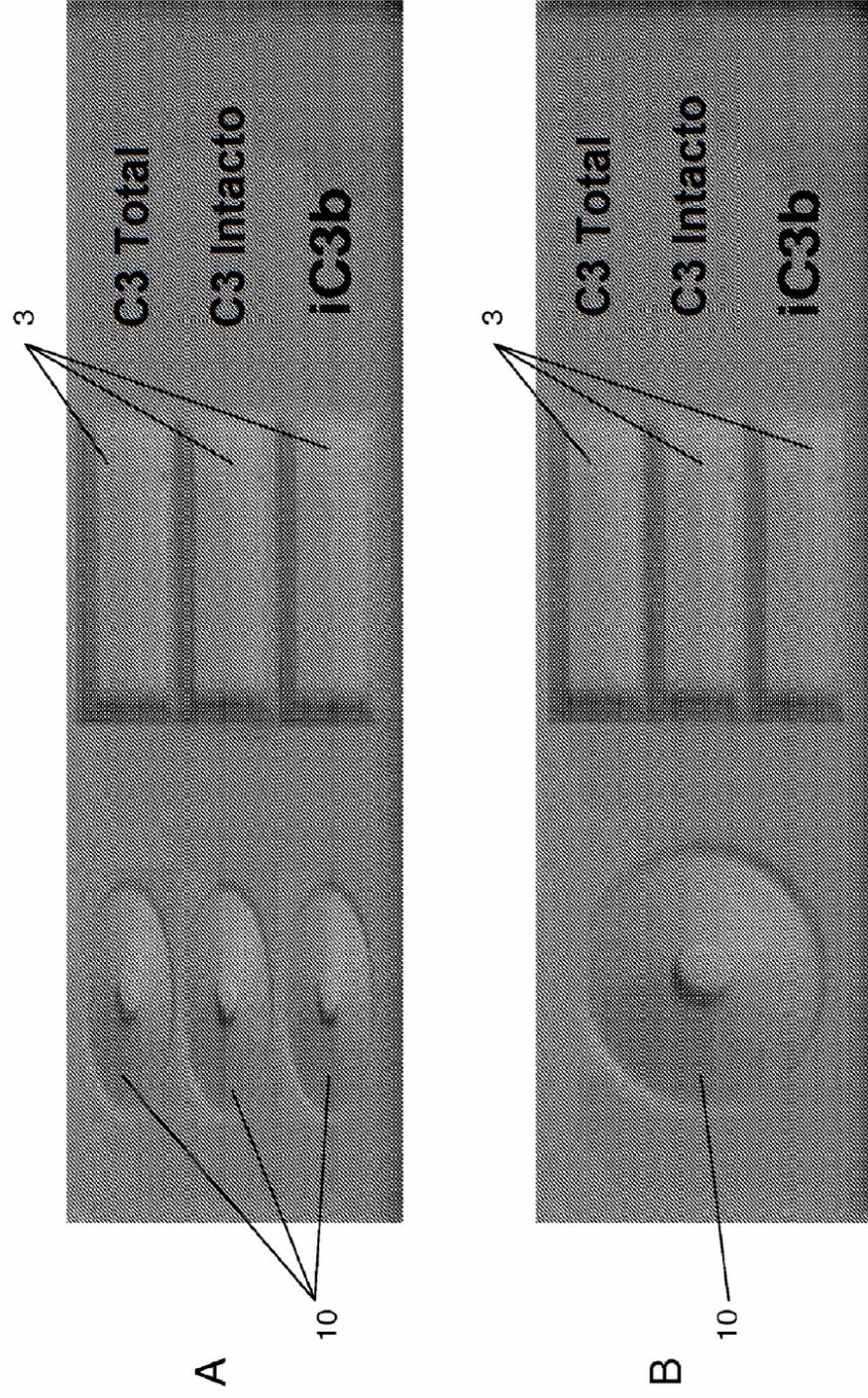


Figura 9
Tiras de membrana de inmunoensayo de flujo lateral individual y doble en serie

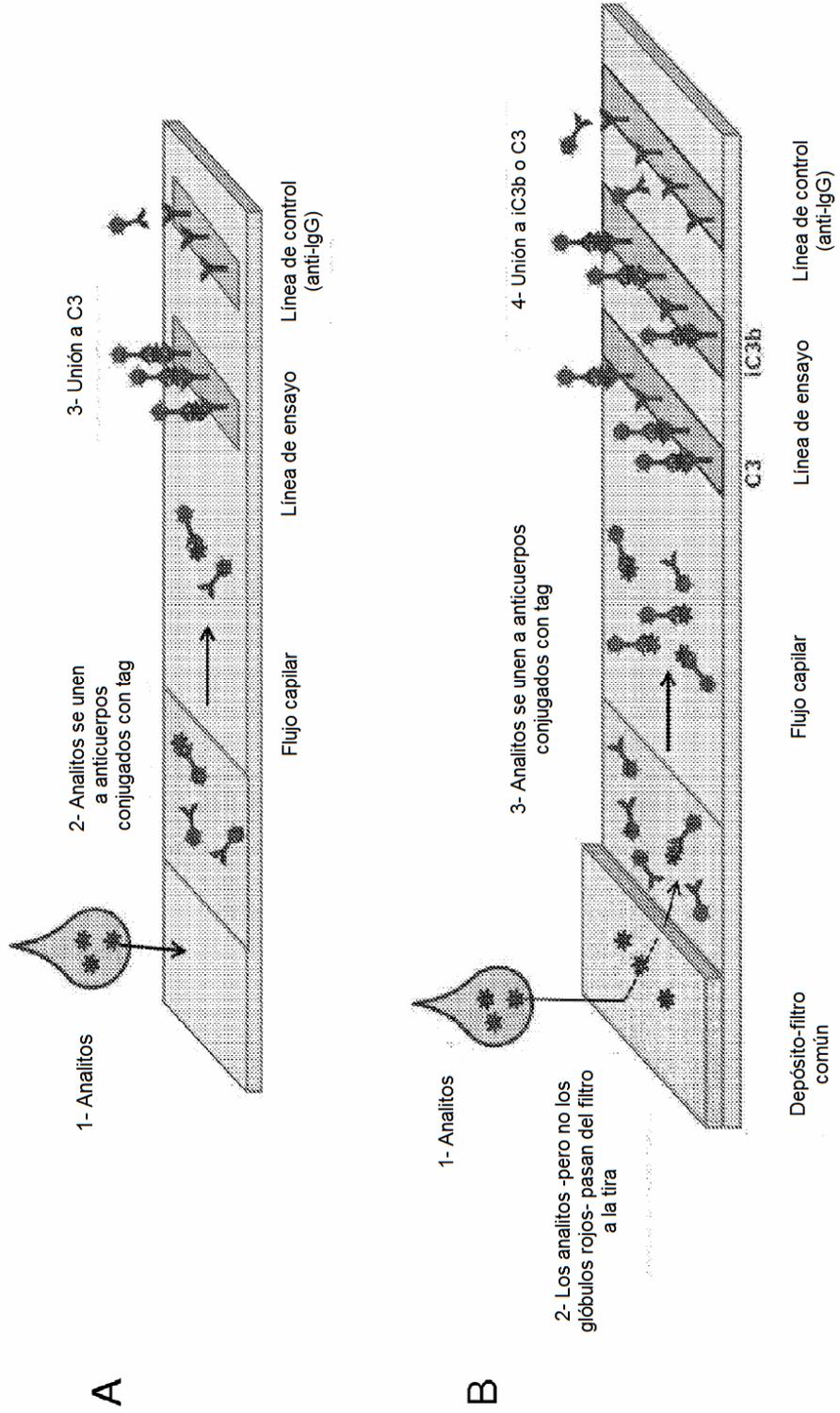


Figura 10
Casetes de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de múltiples analitos en serie

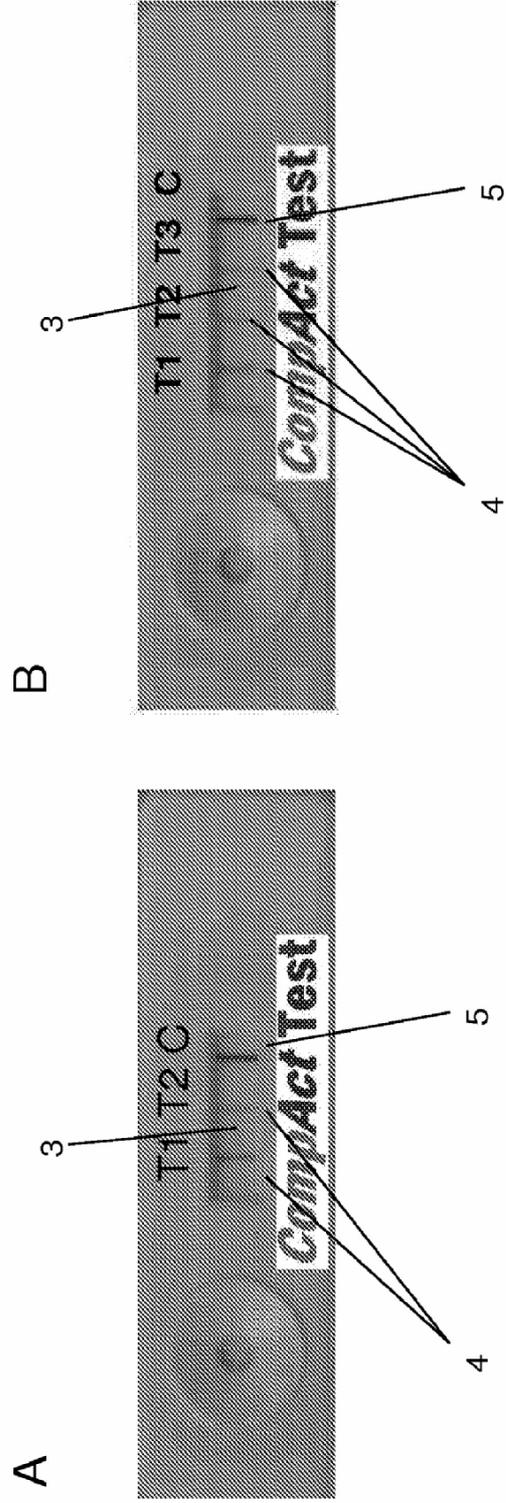


Figura 11

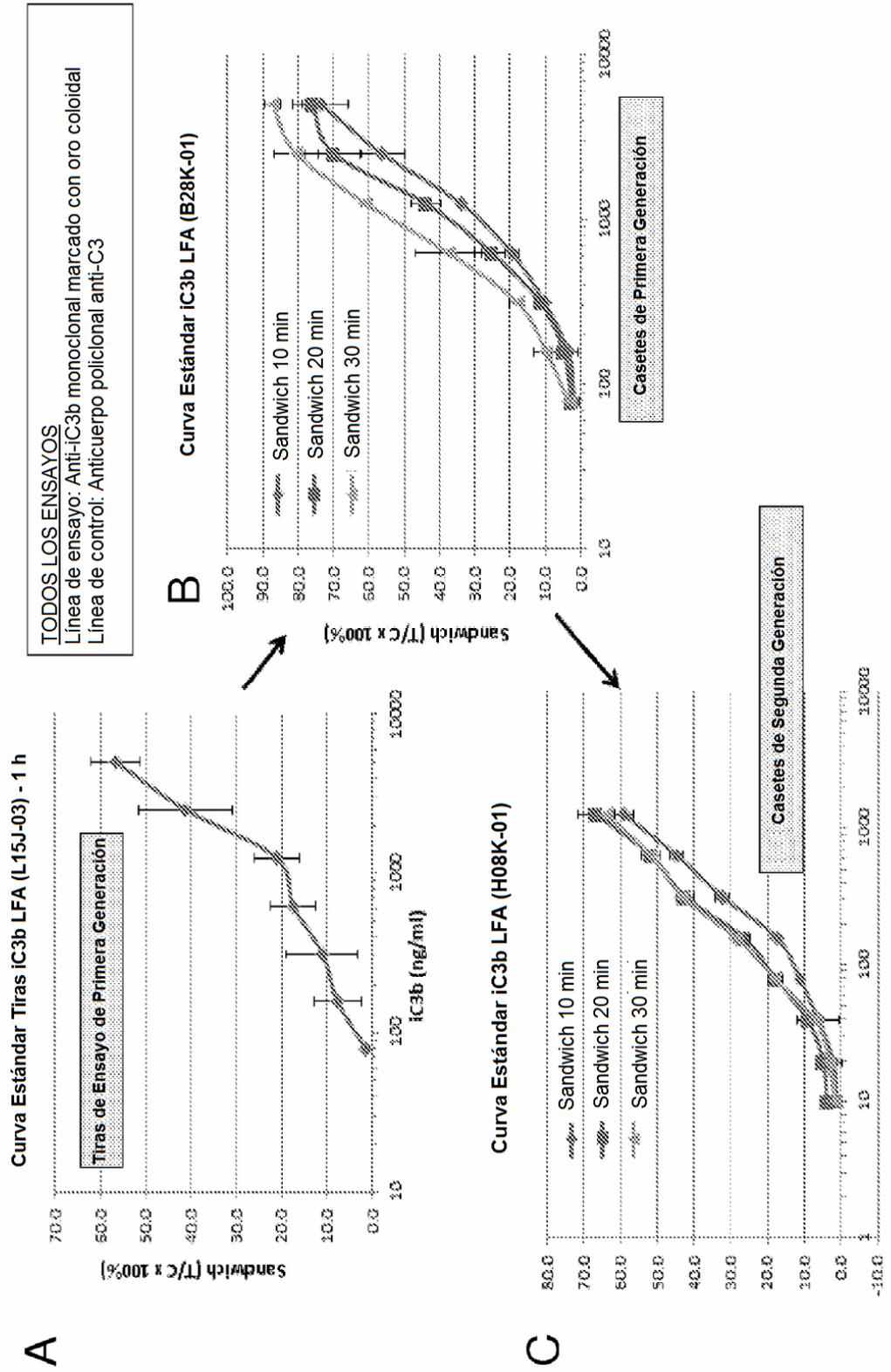


Figura 12
Sensibilidad del casete de inmunoensayo de flujo lateral de iC3b

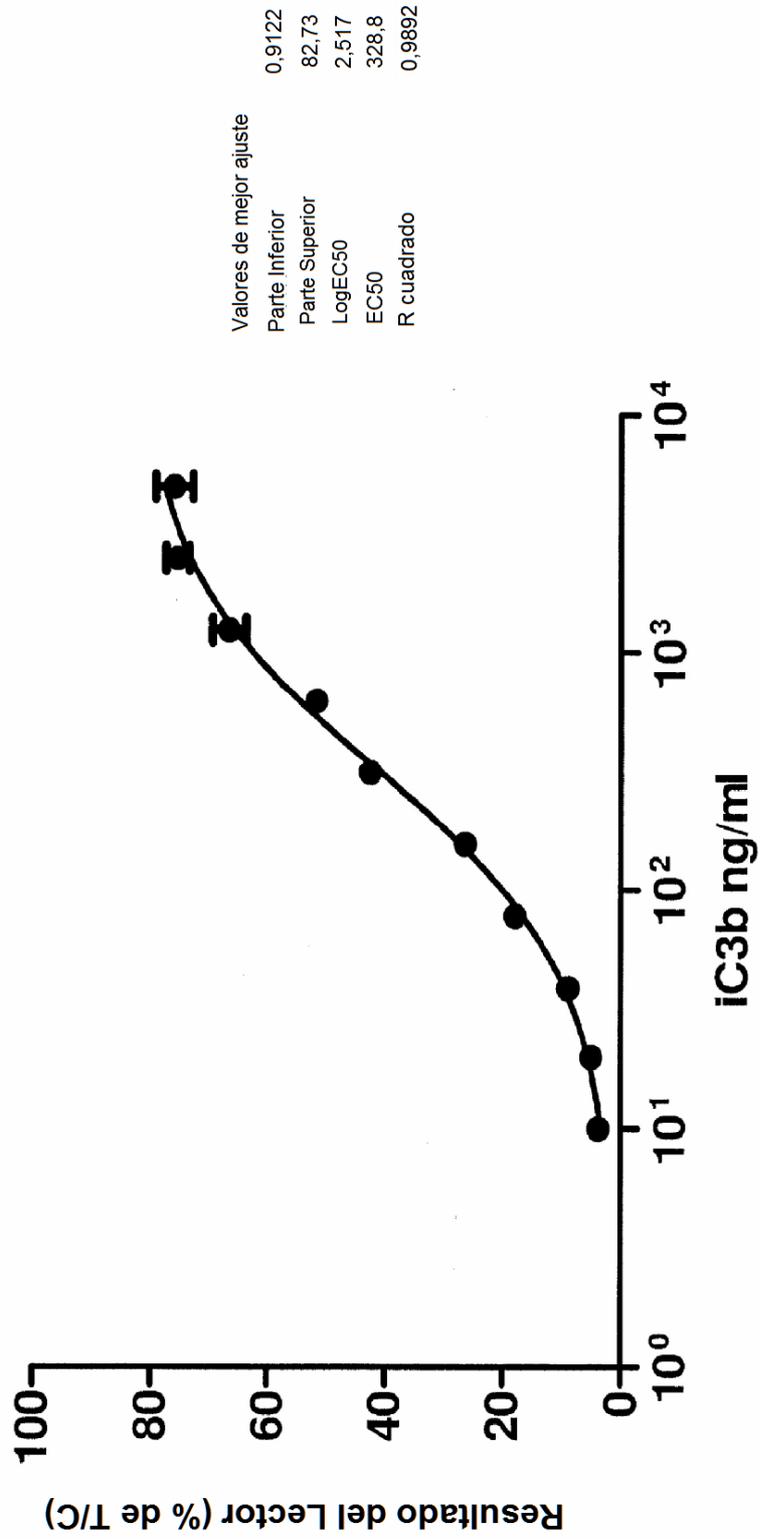


Figura 13
Sensibilidad del casete de inmunoensayo de flujo lateral de iC3b intacto

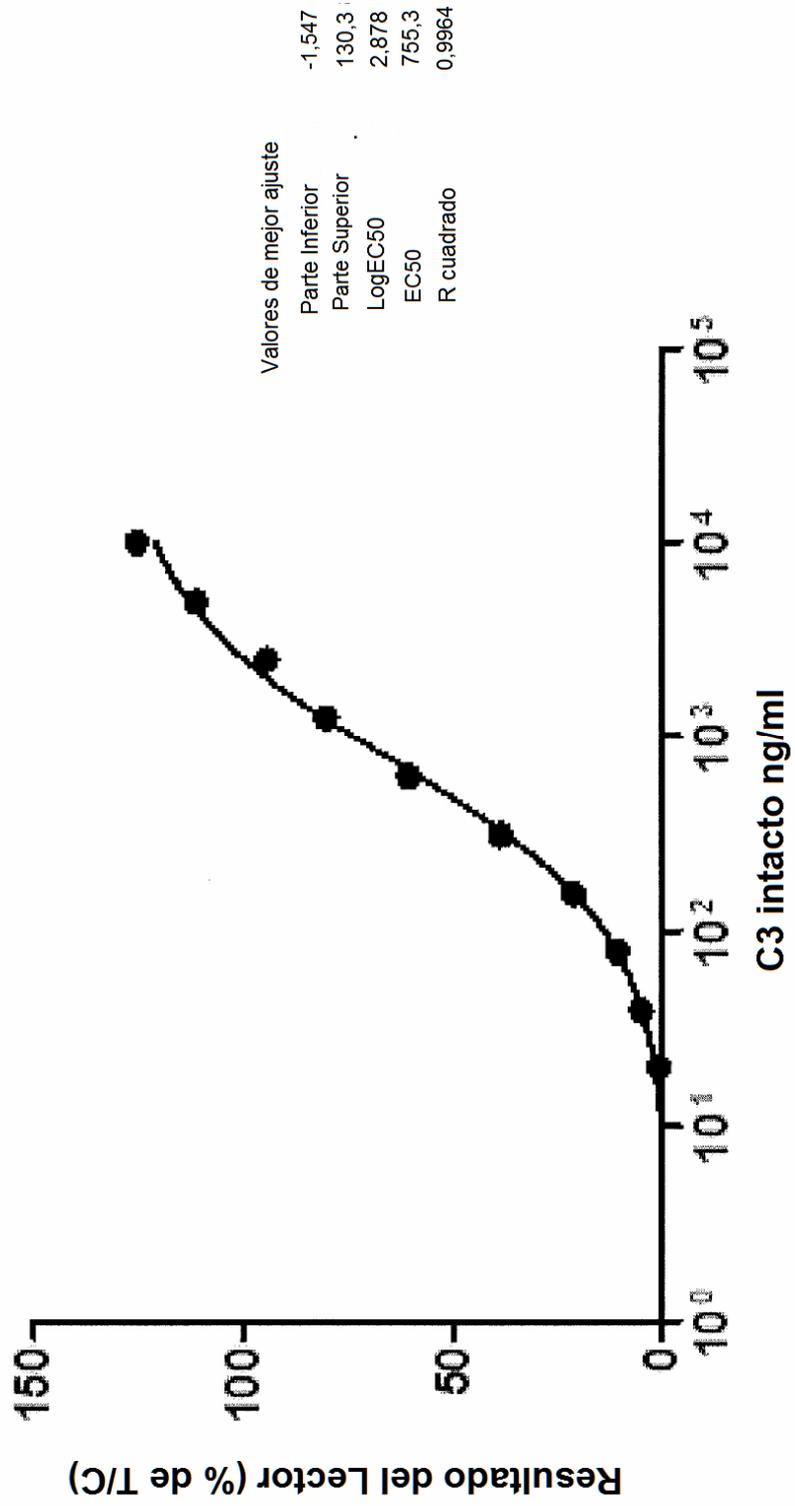


Figura 14
 Cruce aparente entre C3 intacto iC3b en inmunoensayos de flujo lateral

Relación de C3 intacto: iC3b	Señal de salida de iC3b total		Contribución fraccional de C3 intacto a señal de iC3b	
	(H08K-01)	(J24K-03)	(H08K-01)	(J24K-03)
2000 a 1	2,16	5,12	1,16	4,12
1000 a 1	1,79	4,98	0,79	3,98
500 a 1	1,67	4,69	0,67	3,69
250 a 1	1,31	3,55	0,31	2,55
125 a 1	1,24	N/A	0,24	N/A
0 a 1	1,00	1,00	0,00	0,00

Figura 15
Niveles de C3 e iC3b en lágrimas basales de un único individuo en intervalos de 12 horas

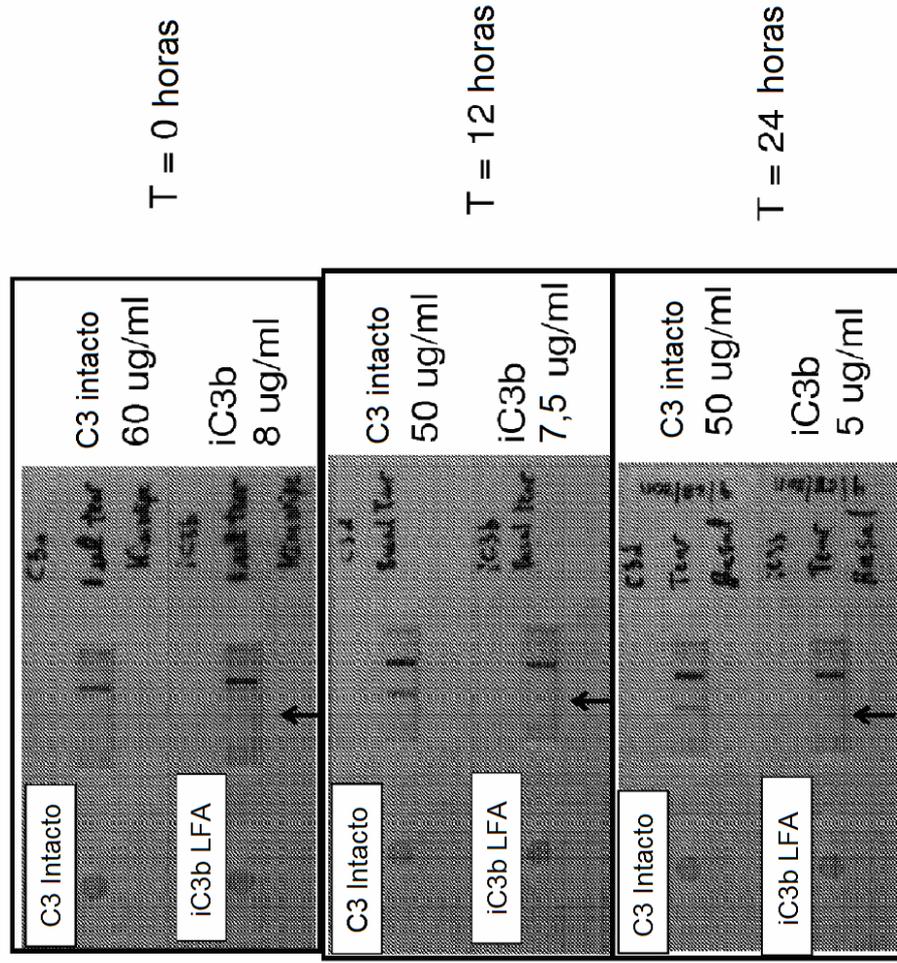


Figura 16
Niveles de C3 intacto e iC3b en sangre total de un individuo sano

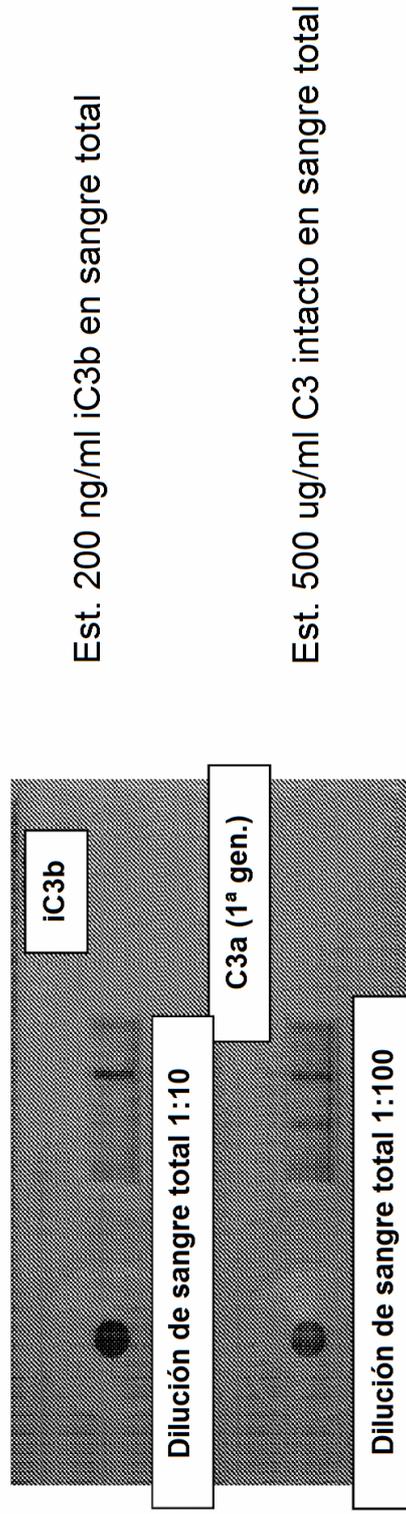
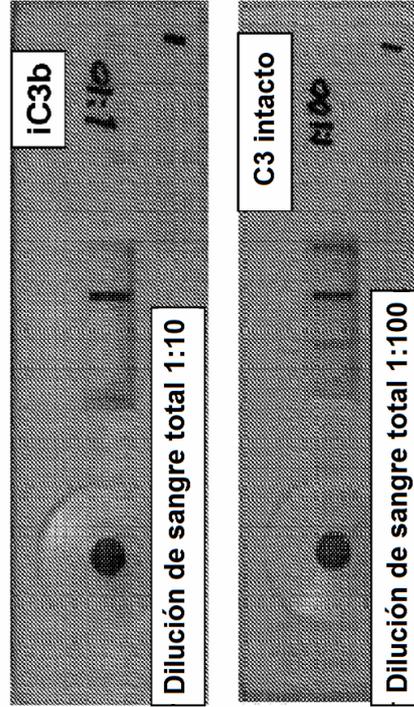


Figura 17
Niveles de C3 intacto e iC3b en sangre total de un individuo sano

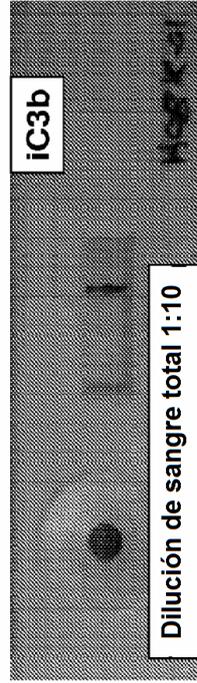


Est. 300 ng/ml iC3b en sangre total

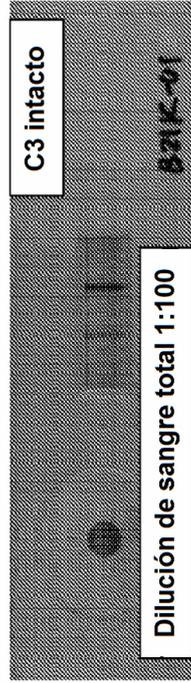
Est. >1000 ug/ml C3 intacto en sangre total

Figura 18

Resultados de ensayos en sangre total 2 horas despues de montar en bicicleta 100 millas (160,93 km)



Est. 100 ng/ml iC3b en sangre total



Est. 1000 ug/ml C3 intacto en sangre total

Figura 19

Fuente conocida de componente C3 de complemento	Validado por ELISA o LFA	Control/ Normal/ Sano	Comprometido (Enfermedad/Enfermo)	Enfermedades inflamatorias donde se han esperado o se esperan que estén presentes biomarcadores de C3
Fluido corporal				
Sangre total	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	Infecciones, enfermedades autoinmunes (RA, MS, psoriasis, Crohn, lupus, etc.), trauma, infarto de miocardio, ictus, enfermedad cardíaca, diabetes, fibrosis hepática, enfermedad renal, trasplante/rechazo de órgano, cáncer, alergias alimentarias.
Plasma	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	
Suero	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	
Líquido cefalorraquídeo	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	Trauma, Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), infecciones
Lágrima	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	Degeneración muscular relacionada con la edad (AMD), enfermedad de ojo seco (DED), infecciones
Exudado de herida	Sí	[Redacted]	C3 intacto, iC3b	
Secreción mucosa (nasal)	Sí	C3 intacto, iC3b (sano pero puede padecer alergias estacionales menores)	C3 intacto, iC3b	Infección
Cera de los oídos	iC3b únicamente	No detectado		Otitis media con efusión (OME)
Sebem (aceite de piel de glándulas sebáceas), lesiones o piel en general	iC3b únicamente	No detectado (fricción en antebrazo)		Acné, herpes labial
saliva	iC3b únicamente	No detectado		Enfermedad periodontal, aftas
Orina	Sí	No detectado		Glomerulonefritis, infección
Sudor				
Semen				
Fluido vaginal				Infección de tracto genital masculino, Infección
Leche de mama				Infección
Condensado de respiración				Asma, COPD, enfisema, fibrosis quística