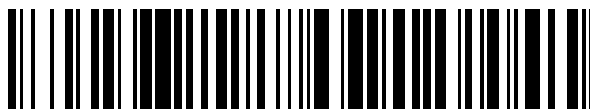


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 921**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2013** **PCT/US2013/038897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013** **WO13166030**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2013** **E 13784944 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018** **EP 2845007**

54 Título: **Detección de la activación del complemento**

30 Prioridad:

01.05.2012 US 201213461709

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

08.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

OLSON, PAUL;
MOSS, DONALD W. y
STATEN, NICK

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 711 921 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

Detección de la activación del complemento

5 ANTECEDENTES

La inflamación es la respuesta fisiológica del tejido vascularizado al daño, infección y ciertas enfermedades. El proceso inflamatorio es un requisito biológico para la cicatrización de heridas después de una lesión traumática y para la eliminación de la infección. Sin embargo, la inflamación también puede dañar al propio tejido. Por esta razón, la inflamación con frecuencia se considera una espada de doble filo.

El complemento es el brazo más antiguo del sistema inmunitario y está enraizado profundamente en el proceso inflamatorio. La cascada de proteínas del complemento es una primera línea de defensa contra los microbios invasores y un jugador crítico en el proceso de cicatrización de heridas. La cascada de complemento implica más de 30 proteínas séricas y celulares y desempeña papeles importantes en la inmunidad innata y adaptativa. La activación del complemento puede producirse por medio de tres vías principales: la clásica, la alternativa y la vía de lectina. Las tres vías principales de activación del complemento convergen en el componente 3 del complemento de proteína central (C3). C3 es un mediador central de inflamación y se activa por la mayor parte de factores que provocan inflamación. Las Figuras 1 y 2 proporcionan visiones generales esquemáticas de C3 y sus productos de activación.

El complemento, y en particular C3, se asocia con varias indicaciones de enfermedad tanto agudas como crónicas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, traumatismo, insuficiencia respiratoria, septicemia, 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 de intestino inflamatorio, hemorragia intracraneal, infarto de miocardio, y paro cardíaco.

Varios informes han demostrado que la activación del complemento se produce inmediatamente después de la lesión y se correlaciona con la gravedad de la lesión. En un estudio, se encontró que los niveles circulantes de proteína del complemento en pacientes con traumatismo se correlacionaban con el resultado del paciente. Véase Hecke, et al., *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 plasmáticas de C3a y C3 total directamente después de la lesión y en la UCI en los días posteriores a la lesión. Detectaron evidencia de activación del complemento C3 en los primeros momentos después de la lesión. Sin embargo, la activación del complemento fue más pronunciada en lo que no sobrevivieron que en los supervivientes en las primeras ocho horas. En los primeros momentos, el grado de activación de C3 se correlacionó con el resultado del paciente. Hecke et al. también se encontraron que la relación del producto dividido de C3, C3a, cuando se toma como una relación con respecto al complemento total, fue un mejor predictor del resultado que el de C3a solo.

Un estudio similar de Zilow, et al., *Complement activation and the prognostic value of C3a in patients at risk of adult respiratory distress syndrome*, Clin. Exp. Immunol. 79: 151-57 (1990), encontraron retrospectivamente que la supervisión de C3a y C3 total a intervalos frecuentes (6 h) podría ser útil para identificar pacientes con alto riesgo de o en las etapas tempranas de la dificultad respiratoria. Estos investigadores extrajeron la primera muestra de plasma dentro de las 2 horas de la lesión y repitieron muestreos de 6 horas durante las primeras 48 horas y después a intervalos diarios a partir de entonces. Zilow et al. encontraron una correlación significativa entre los niveles de C3a y la relación de C3a:C3 total a las 6 y 12 horas, así como a partir de los 5 días.

En el campo de la atención de traumatismos, la primera hora después de la lesión a veces se denomina la "Hora Dorada". Sin desear quedar ligado a la teoría, en general se cree que la intervención dentro de la primera hora después de una lesión traumática aumenta considerablemente el resultado del paciente. Una mejor información de diagnóstico proporcionada antes ayudaría a mejorar la intuición del especialista en cuidados intensivos al tomar decisiones de tratamiento.

KABUT JACEK ET AL, "Levels of complement components iC3b, C3c, C4, and SC5b-9 in peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis", FERTILITY AND STERILITY, ELSEVIER SCIENCE INC, NUEVA YORK, NY, Estados Unidos, (20070504), vol. 88, n.º 5, doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2006.12.061, ISSN 0015-0282, páginas 1298 - 1303 divulgan la medida de iC3b en individuos para evaluar si padecen endometriosis.

El documento titulado "An enzyme immunoassay for the quantitation of the iC3b fragment of C3 protein in human plasma or serum SPECIALTY PRODUCTS", (20091101), URL: https://www.quidel.com/sites/default/files/product/documents/mvb_ic3b_pi.pdf divulga un kit de EIA para detectar el nivel de iC3b en muestras de individuos que padecen una enfermedad. El documento WO 2010/135717, de Zhang et al., publicado el 25 de noviembre de 2010, está dirigido a métodos para evaluar la activación del complemento a través de los biomarcadores C3 intacto, iC3b y C3 total. Sin embargo, Zhang et al. se limita a los inmunoensayos tradicionales tipo sándwich, tal como ELISA, que requieren procesamiento en el laboratorio y la experiencia de técnicos cualificados. Además, los ensayos y métodos de Zhang et al. requieren etapas de preparación, almacenamiento y manipulación de muestras que se sabe que activan el C3 intacto lábil y producen resultados de prueba de falsos positivos, lo que impide la capacidad de medir con precisión el C3 intacto. Además, los ensayos y métodos de Zhang et al. requieren horas para el procesamiento y, por lo tanto, son incapaces de proporcionar los datos casi en tiempo real, lo que puede afectar a la atención del paciente en los primeros momentos después de la crisis fisiológica.

15 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un método que comprende las etapas de

detectar en una muestra de un sujeto un nivel de iC3b, en el que la detección implica una interacción específica entre el iC3b y un anticuerpo sin reactividad cruzada con respecto al mismo; y
comparar el nivel detectado con un nivel de referencia, cuyo nivel de referencia está dentro de un intervalo de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 5.000 ng/ml; en el que la determinación de que el nivel detectado está por encima del nivel de referencia, indica que el sujeto padece o es susceptible a una activación del complemento patológica y/o no deseable, en el que las etapas de detección y comparación se realizan en 30 minutos o menos utilizando un ensayo de flujo lateral. El anticuerpo sin reactividad cruzada puede estar caracterizado por que una solución de 1 ug/ul de C3 produce una señal equivalente a menos de aproximadamente 1 ng/ml de iC3b.

El anticuerpo sin reactividad cruzada puede ser o puede comprender un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en A209, MCA2607 y HM2199.

En otro aspecto, la invención proporciona un método que comprende las etapas de

detectar en una muestra de un sujeto un nivel de C3 intacto, en el que la detección implica una interacción específica entre el C3 intacto y un anticuerpo sin reactividad cruzada con respecto al mismo; y
comparar el nivel detectado con un nivel de referencia, cuyo nivel de referencia está dentro de un intervalo de aproximadamente 350 ug/ml a aproximadamente 1.700 ug/ml; en el que la determinación de que el nivel detectado está por debajo del nivel de referencia, indica que el sujeto padece o es susceptible a una activación del complemento patológica y/o no deseable, en el que las etapas de detección y comparación se realizan en 30 minutos o menos utilizando un ensayo de flujo lateral.

En el aspecto anterior de la invención, el anticuerpo sin reactividad cruzada se puede caracterizar porque una solución de 1 ug/ul de iC3b produce una señal equivalente a menos de aproximadamente 1 ng/ml de C3. En el aspecto anterior de la invención, el anticuerpo sin reactividad cruzada puede ser o puede comprender HM2075.

La activación del complemento no deseable y/o patológica puede ser causada por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, traumatismo, estrés inflamatorio, trastornos autoinmunes, hemorragia intracraneal, infección, rechazo a trasplante, enfermedad ocular, enfermedad cardíaca, lesión por isquemia/reperfusión, degeneración macular relacionada con la edad, hemoglobinuria paroxística nocturna, angiodema hereditario, enfermedad renal, trastornos asociados con el embarazo, y trastornos neurológicos.

La muestra puede seleccionarse del grupo que consiste en sangre entera, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de heridas, líquido de lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo.

La etapa de detección se puede realizar en condiciones controladas, de tal forma que la ejecución de la etapa no activa sustancialmente el complemento dentro de la muestra.

La invención encuentra aplicación, por ejemplo, en medicina, incluyendo en entornos de diagnóstico y terapéuticos, y particularmente en entornos clínicos. Los métodos pueden usarse para dirigir la atención al paciente en los primeros momentos inmediatamente después de una lesión traumática u otras crisis fisiológicas. Como alternativa, o adicionalmente, los métodos y ensayos son adecuados para su uso, por ejemplo, para seleccionar, controlar y/o ajustar tratamientos para pacientes que padecen o son susceptibles a uno o más estados de enfermedad afectados por la presencia o el nivel de activación del complemento. Dichos estados de enfermedad incluyen, por ejemplo, enfermedades autoinmunes tal como lupus eritematoso sistémico.

Como se describe en el presente documento, la selección, captura y detección cuidadosa de pares de anticuerpos que evitan interferencias cruzadas, hace posible detectar y cuantificar biomarcadores de activación del complemento, incluyendo C3 intacto y/o iC3b nativos, mientras se evitan los falsos resultados de falso positivo que han plagado los métodos de prueba más convencionales para estos analitos. Los métodos de la invención pueden aplicarse en una diversidad de formatos; los inventores han encontrado además que un formato de tipo de ensayo de flujo lateral, y particularmente un formato de inmunoensayo de flujo lateral, proporciona ventajas particulares y características sorprendentes.

- 10 Si bien la respuesta del complemento es un importante sistema de defensa contra la enfermedad, varias características dificultan la medición precisa de la activación del complemento, particularmente en un periodo de tiempo clínicamente relevante. Las tecnologías conocidas requieren una hora y, a menudo, dos horas o más para determinar los niveles de complemento. Durante este tiempo, puede tener lugar un deterioro significativo de la afección de un paciente que no se manifiesta visiblemente hasta que se produce un daño significativo, o incluso irreversible. Adicionalmente, se sabe que las proteínas del complemento se activan fácilmente mediante la manipulación y otras condiciones experimentales. Los Solicitantes han descubierto, entre otras cosas, que los niveles o tipos de manipulación que no se apreciaron previamente para activar el complemento pueden afectar significativamente a los resultados del ensayo. Quizás de forma más sorprendente, los Solicitantes demuestran en el presente documento que el paso del tiempo es un factor importante en la activación espontánea del complemento, incluso sin manipulación.

- 20 Los métodos de la invención pueden completarse dentro de un periodo de tiempo, medido desde el inicio de la recogida de muestras de un sujeto, que es inferior a aproximadamente 60 minutos o menos, aproximadamente 50 minutos o menos, aproximadamente 40 minutos o menos, aproximadamente 30 minutos o menos, aproximadamente 20 minutos o menos, aproximadamente 10 minutos o menos, o aproximadamente 5 minutos o menos. Por el contrario, muchos ensayos de la técnica anterior no proporcionan datos durante horas. Tal diferencia en el tiempo puede marcar la diferencia entre la vida o la muerte para un paciente.

- La presente divulgación identifica una fuente no apreciada previamente de un problema con los ensayos de la técnica anterior que detectan cambios (por ejemplo, disminuciones) en los niveles de proteína del complemento total. La razón detrás de tales ensayos de la técnica anterior es que la lesión o enfermedad puede desencadenar una activación masiva del complemento, dando como resultado una disminución en los niveles de proteína del complemento total. Sin embargo, en el presente documento se describe el descubrimiento de que se pueden desencadenar niveles más altos de activación del complemento que los que se apreciaron previamente en un individuo por eventos no patógenos, tal como el ejercicio, y también en una muestra por manipulación, o incluso por el paso del tiempo. Por lo tanto, los ensayos de la técnica anterior carecen de especificidad ya que no pueden distinguir la razón por la que se reducen las proteínas del complemento, o el destino de las proteínas del complemento relevantes. Como se describe en el presente documento, es posible proporcionar ensayos que permitan la discriminación entre la activación del complemento indeseable y/o patológica y no indeseable y/o patológica. Por ejemplo, algunos de estos ensayos proporcionados miden los niveles de C3 intacto y/o de uno o más productos de activación, tal como iC3b. La evaluación de los niveles de proteína del complemento, en lugar de la proteína del complemento total, distingue la activación del complemento no deseable y/o patológica de una disminución general en la proteína del complemento circulante, por ejemplo, como puede ocurrir en respuesta a cambios en el estilo de vida o similares.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

- La Figura 1 proporciona una descripción esquemática del sistema del complemento. El complemento se activa por tres rutas principales, todas las cuales convergen en la activación de C3 intacto. La activación proteolítica de C3 produce los productos divididos de C3 C3a y C3b. C3b también se modifica proteolíticamente para formar iC3b, un biomarcador para la activación de C3. C3 intacto e iC3b están encerrados en un círculo en el esquema.

- La Figura 2 proporciona una representación esquemática de la activación y desactivación de C3. El C3 intacto se activa proteolíticamente en C3a y C3b. Algunas moléculas de C3b se unen covalentemente a las superficies; otras reaccionan con agua y se mantienen en circulación. C3b se desactiva por el factor 1 de proteasa. 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, degradándose este último finalmente en C3d.

La Figura 3 es una representación esquemática del reconocimiento específico de C3 intacto e iC3b por pares de anticuerpos. (A) El C3 intacto es reconocido 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 proteínas, pero no C3 intacto de iC3b. Un par alternativo de anticuerpos para C3 intacto incluye anticuerpos que reconocieron C3a y C3f. (B) La proteína iC3b es reconocida por otro par de anticuerpos. El primer anticuerpo entra en contacto con la proteína en un neoepítipo que se cree que se encuentra cerca de la región C3g. Este epítipo se revela una vez que el Factor I elimina el fragmento C3f. El neoepítipo se ocluye una vez que el Factor I degrada iC3b en C3c y C3dg. El segundo anticuerpo reconoce el epítipo C3d. Un par alternativo para iC3b incluye el anticuerpo iC3b mencionado anteriormente y un segundo que reconoce C3d activado (Quidel® A250).

La Figura 4 es un esquema de una forma de realización de un inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención.

La Figura 5 es una representación esquemática de dos formas de realización de un inmunoensayo de flujo lateral de acuerdo con la presente invención. (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 tiras de membrana paralelas.

La Figura 6 es una representación de tres formas de realización de inmunoensayos de flujo lateral de analito individual. (A) muestra un casete de prueba para un inmunoensayo de flujo lateral de C3 total. (B) muestra un casete de prueba para un inmunoensayo de flujo lateral de C3 intacto. (C) muestra un casete de prueba para un inmunoensayo de flujo lateral de iC3b.

La Figura 7 es una representación de dos formas de realización de un casete de prueba de inmunoensayo de flujo lateral de analito doble, para la evaluación de C3 intacto e iC3b. (A) muestra un casete de prueba que comprende dos puertos separados para la carga de muestras y dos tiras de membrana en paralelo, una para cada analito. (B) muestra un casete de prueba con un solo puerto para la carga de muestras y dos tiras de membrana en paralelo, una para cada analito.

La Figura 8 es una representación de dos formas de realización de un casete de prueba de inmunoensayo de flujo lateral de triple analito, para la evaluación del C3 total, C3 intacto e iC3b. (A) muestra un casete de prueba que comprende tres puertos separados para la carga de muestras y tres tiras de membrana en paralelo, una para cada analito. (B) muestra un casete de prueba con un solo puerto para la carga de muestras y tres tiras de membrana en paralelo, una para cada analito.

La Figura 9 es una representación esquemática de dos formas de realización 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.

La Figura 10 es una representación de dos formas de realización 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.

La Figura 11 muestra una comparación de sensibilidades, rango dinámico, variabilidad entre pruebas, y tiempo de prueba para tres formas de realización de los inmunoensayos de flujo lateral instantáneos. (A) muestra un gráfico de curva estándar para una tira reactiva que detecta iC3b sin una carcasa de casete. (B) muestra un gráfico de curva estándar de una forma de realización de inmunoensayo de flujo lateral en el que las tiras reactivas están encerradas en un casete, lo que permite una administración más controlada del volumen de la muestra de ensayo. La concentración de una solución de anticuerpo utilizada para la conjugación de oro es de 0,5 mg/ml y se incluye BSA en la mezcla de reacción. (C) muestra un gráfico de curva estándar de otra forma de realización de una tira reactiva integrada en un casete, en donde la concentración de la solución de anticuerpo utilizada para la conjugación de oro es 1 mg/ml y se elimina BSA de la mezcla de reacción. La sensibilidad del ensayo alcanza 10 ng/ml con un rango dinámico que se extiende hasta 10 ug/ml.

La Figura 12 muestra la sensibilidad de una forma de realización de un inmunoensayo de flujo lateral para iC3b. La sensibilidad varía de 10 ng/ml a 10 ug/ml. El error estándar es inferior al 3% a los 20 minutos. R cuadrado = 0,9892.

La Figura 13 muestra la sensibilidad de una forma de realización de un inmunoensayo de flujo lateral para C3 intacto. La sensibilidad varía de 20 ng/ml a 10 ug/ml. El error estándar es inferior al 3% a los 20 minutos. R cuadrado = 0,9964. Se muestran las barras de error, pero son más pequeñas que los puntos trazados.

La Figura 14 muestra la interferencia entre los anticuerpos C3 intacto e iC3b en inmunoensayos de flujo lateral ejemplares.

La Figura 15 muestra niveles de C3 intacto e iC3b en lágrimas basales de un solo individuo a intervalos de 12 horas, que se ensaya mediante inmunoensayos de flujo lateral ejemplares descritos en el presente documento.

La Figura 16 muestra los niveles de C3 intacto e iC3b en sangre entera de un individuo sano normal. Los resultados muestran aproximadamente 2500 veces más de C3 intacto que iC3b en sangre entera de un donante sano.

La Figura 17 muestra los niveles de C3 intacto e iC3b en sangre entera de un individuo sano. Los resultados muestran aproximadamente 333 veces más de C3 intacto que iC3b en sangre entera de un donante sano.

La Figura 18 muestra los niveles de C3 intacto e iC3b en un individuo normal 2 horas después de un esfuerzo intenso (100 millas en bicicleta). Los resultados muestran 1000 veces más de C3 intacto que iC3b en la sangre entera de un individuo sano después de un esfuerzo.

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

La Figura 20 muestra dos representaciones esquemáticas de formas de realización de flujo lateral de la presente invención que pueden usarse para medir un analito individual a partir de una muestra. **(A)** muestra un esquema de una forma de realización ejemplar de la presente invención, y **(B)** muestra un esquema de un proceso ejemplar de acuerdo con aspectos de la presente invención.

La Figura 21 representa un método ejemplar para realizar uno o más aspectos de la presente invención. También se muestran ilustraciones ejemplares de cómo puede verse el método cuando se realiza, así como imágenes de tiras reactivas de ensayo y un lector de tiras reactivas de acuerdo con aspectos de la presente invención.

La Figura 22 muestra fotografías de tiras reactivas de ensayo que se usaron de acuerdo con ciertas formas de realización de la invención, como se describe en los Ejemplos, para generar las curvas estándar en la Figura 23. Cada punto de datos en la Figura 23 se generó a partir de mediciones por triplicado que se muestran en esta Figura 22.

La Figura 23 muestra varias curvas estándar generadas de acuerdo con los métodos de la presente invención que muestran niveles de proteína C3 nativa 10 minutos, 20 minutos y 30 minutos después de la preparación de la muestra.

La Figura 24 muestra la varianza en los valores medidos para C3 nativo para las muestras mostradas en la Figura 22 y los datos mostrados en la Figura 23.

La Figura 25 muestra fotografías de las tiras reactivas de ensayo que se usaron para generar las curvas estándar en la Figura 26. Cada punto de datos en la Figura 26 se generó a partir de mediciones por triplicado que se muestran en esta figura.

La Figura 26 muestra varias curvas estándar generadas de acuerdo con los métodos de la presente invención que muestran niveles de proteína iC3b 10 minutos, 20 minutos y 30 minutos después de la preparación de la muestra.

La Figura 27 muestra medidas por triplicado de **(A)** C3 nativo y **(B)** iC3b a partir de una única muestra de sangre de acuerdo como se ensayó de acuerdo con los métodos de la presente invención.

La Figura 28 muestra mediciones de niveles de C3 nativo de tres donantes medidos en sangre entera, suero y plasma de acuerdo con los métodos de la presente invención.

La Figura 29 muestra las mediciones de los niveles de iC3b en plasma o suero medidos por los métodos de la presente invención y comparados con los métodos ELISA conocidos. Los paneles **(A)**, **(B)** y **(C)** muestran los datos por donante en forma de gráfico de barras, mientras que **(D)** muestra los datos de los tres donantes en forma de tabla.

La Figura 30 muestra los niveles de iC3b a partir de muestras de proteína iC3b purificada medidos por los métodos de la presente invención y en comparación con los métodos ELISA conocidos, y muestra una comparación con los datos generados a partir de una muestra de plasma utilizando un ensayo de la presente invención o un ELISA tradicional.

La Figura 31 muestra los niveles de proteína iC3b medidos a partir de muestras de sangre entera, plasma o suero de dos donantes. Los ensayos se realizaron cuando las muestras estaban frescas o cuando las muestras habían estado expuestas a temperatura ambiente durante cuatro horas.

La Figura 32 muestra el efecto del tiempo en los niveles de iC3b medidos en muestras de sangre entera (etiquetada "Sangre") en comparación con una curva estándar de iC3b (etiquetada "iC3b"). Las muestras se expusieron a temperatura ambiente durante **(A)** 5 minutos, **(B)** 10 minutos, **(C)** 15 minutos o **(D)** 20 minutos.

La Figura 33 muestra los niveles de iC3b medidos en muestras de plasma o suero de tres donantes. Las muestras de cada donante se expusieron a una de dos condiciones, la exposición a temperatura ambiente durante cinco (5) minutos o la exposición a temperatura ambiente durante sesenta (60) minutos. Los niveles de iC3b se midieron en seis intervalos durante el tiempo de exposición y los niveles se normalizaron a una curva estándar de iC3b para fines de comparación directa.

La Figura 34 muestra el efecto del tiempo en la generación de iC3b en muestras de plasma humano. **(A)** muestra una foto de las tiras reactivas de flujo lateral de acuerdo con los aspectos de la invención, y **(B)**

muestra una gráfica de la generación de iC3b a lo largo del tiempo de acuerdo como se lee en las tiras mostradas en (A).

La Figura 35 muestra la activación de iC3b en muestras de plasma y suero humanos después de (A) 2 minutos de incubación y (B) 5 minutos de incubación usando un ensayo de formato ELISA.

La Figura 36 muestra un gráfico de barras de la activación de iC3b en muestras de suero humano después de 2 minutos, 5 minutos, 15 minutos o 60 minutos de incubación en un ensayo de formato ELISA.

La Figura 37 muestra la deposición de C3 derivada de suero humano y la activación a lo largo del tiempo, en ausencia de un complejo de antígeno:anticuerpo.

La Figura 38 muestra la deposición de C3 derivada de suero humano y la activación a lo largo del tiempo, en ausencia de pocillos recubiertos de anticuerpos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Hasta ahora, no se ha conocido en la técnica un ensayo en el punto de atención para medir la activación del complemento dentro de la ventana de tratamiento accionable. Aunque las asociaciones entre el complemento y la enfermedad o el traumatismo han sido reconocidas durante mucho tiempo, el C3 se supervisa en solo un pequeño número de enfermedades o afecciones. Incluso en esos casos, los métodos de ensayo actuales tienen limitaciones. Primero, en la mayoría de los casos, los ensayos del complemento tradicionales se dirigen a C3 total como el analito objetivo (por ejemplo, mediante ensayos de turbidez y ELISA). El C3 total es una combinación de productos de activación y desactivación de C3 intacto (o nativo) y C3. Estas pruebas generalmente detectan disminuciones en los niveles de C3 total circulante. Los niveles disminuidos de C3 total, por lo tanto, solo miden el agotamiento de C3 debido a la activación masiva. Sin embargo, otros factores tales como la dieta o el ejercicio, pueden causar niveles más bajos de C3 en el estado de equilibrio. Como los ensayos de C3 totales no miden la renovación, no se pueden distinguir las causas de la activación. Además, una prueba que mide el C3 total no puede supervisar los cambios en tiempo real en la firma de activación de C3 que serían útiles para dirigir la atención al paciente. Por ejemplo, los pacientes que padecen traumatismos o lupus sistémico (marcado por la disminución de los niveles de C3) se beneficiarán de un mejor control de la activación de C3. Actualmente, la eficacia del tratamiento para el lupus sistémico se mide por un retorno de los niveles de C3 deprimidos a los niveles normales. Sin embargo, el médico tiene dificultades para discernir si el proceso de la enfermedad subyacente se ha detenido o se ha retrasado lo suficiente como para que los mecanismos homeostáticos devuelvan a C3 a los niveles fisiológicamente normales.

Una segunda limitación en la prueba de C3 actual es el tiempo requerido para realizar la mayoría de los ensayos. Un ensayo ELISA típico para la detección de la activación del complemento requiere horas para realizarse y la disponibilidad de un laboratorio y un técnico calificado. Por lo tanto, esta plataforma de ensayo no es útil para las indicaciones de disfunción inflamatoria, en la cual los biomarcadores cambian en el orden de minutos y se requiere la intervención clínica en una escala de tiempo similar.

Una tercera limitación en la prueba de C3 actual reside en la naturaleza de la propia cascada de proteínas. El complemento es notoriamente exigente y puede activarse en virtud de los procedimientos de análisis estándar (manipulación, almacenamiento y exposición a materiales extraños que entran en contacto con C3 durante el análisis). El complemento es muy efectivo en la lisis de microbios invasores y el inicio de la respuesta de cicatrización de heridas en sitios de lesión. Esta eficacia se debe en parte a la capacidad de C3 para activarse por materiales foráneos, tal como los componentes de la pared celular bacteriana. Si bien esta propiedad es útil para dirigir una respuesta inmune a nuevos patógenos foráneos, esta misma propiedad presenta desafíos formidables para el estudio experimental y de diagnóstico. Los materiales tales como los plásticos utilizados en el manejo de muestras, la manipulación de la propia muestra, y las condiciones de almacenamiento inadecuadas también pueden desencadenar la activación del complemento. Cuantas más etapas de procesamiento y manejo se requieran para realizar un ensayo dado, más falsos positivos se pueden esperar, debido a la activación del complemento en virtud del propio ensayo. Estos falsos positivos complican las pruebas tradicionales y hacen que los métodos de prueba actuales no sean adecuados para su uso en la dirección de la atención al paciente casi en tiempo real.

Una consideración adicional en las pruebas de activación del complemento es la selección del mejor biomarcador para detectar cambios en tiempo real en la respuesta inflamatoria. C3 tiene varias cualidades atractivas como biomarcador en la inflamación. Primero, como la proteína central del sistema del complemento, C3 se activa por la mayoría de los estímulos que causarán la activación del complemento. Segundo, C3 se activa en proporción al grado de lesión o infección. En tercer lugar, C3 responde casi en tiempo real a un insulto fisiológico. La activación del complemento se produce en respuesta directa a un agente que causa una crisis, en contraste con otros marcadores inflamatorios de fase aguda que tardan horas o días en responder. Esta propiedad de respuesta rápida no está presente en otros biomarcadores utilizados con frecuencia en la clínica.

Específicamente, el C3 intacto (o nativo) es un marcador valioso del estado inflamatorio. El C3 intacto representa la cantidad de C3 disponible para activación. El C3 total representa el C3 intacto, así como todos los productos de activación de C3. En la actualidad, los ensayos de complemento estándar generalmente miden el C3 total mediante ensayos de turbidez o ELISA. Aunque técnicamente son más fáciles de realizar, los ensayos de C3 total no pueden detectar el agotamiento de C3 con la misma precisión que los ensayos de C3 intacto. El control de C3 intacto, especialmente a lo largo del tiempo, es útil para seguir eventos de activación masiva del complemento, como los que ocurren en un traumatismo y otras indicaciones sistémicas de activación del complemento. El control de C3 intacto a lo largo del tiempo permite que un médico detecte el inicio de un estado inmunosupresor causado por el agotamiento de C3. Además, el C3 intacto puede ser más útil que el C3 total al calcular los índices de activación del complemento. Los ensayos de C3 intacto han demostrado históricamente ser difíciles de administrar o de los que depender, en parte porque el C3 intacto es muy lábil y puede desnaturalizarse o autoactivarse si no se maneja adecuadamente.

El producto dividido 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 (en comparación con C3a) pero que aún responde rápidamente. Sin embargo, iC3b está presente en niveles mucho más bajos que el C3 intacto en muestras de pacientes. Incluso un pequeño grado de interferencia (por ejemplo, 1%) entre la proteína C3 intacta y el ensayo específico de iC3b produce una señal de iC3b de falso positivo a un nivel dos veces mayor que en iC3b circulante normal. Por lo tanto, como un marcador deseable de inflamación, hasta ahora iC3b ha planteado desafíos significativos en las pruebas de diagnóstico.

Si bien se cree que los siguientes términos son bien entendidos por un experto en la técnica, las definiciones se exponen para facilitar la explicación de la materia objeto descrita actualmente.

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

A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades, tales como las condiciones de reacción, etc., que se utilizan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique otra cosa, los parámetros numéricos expuestos en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la materia objeto descrita actualmente.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje, pretende incluir variaciones de, en algunas formas de realización, $\pm 20\%$, en algunas formas de realización $\pm 10\%$, en algunas formas de realización $\pm 5\%$, en algunas formas de realización $\pm 1\%$, en algunas formas de realización $\pm 0,5\%$, y en algunas formas de realización $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar el método divulgado.

"Analito" significa cualquier entidad, particularmente una entidad química, bioquímica o biológica a evaluar, por ejemplo, cuya cantidad (por ejemplo, concentración o masa), actividad, composición u otras propiedades se detectarán, medirán, cuantificarán, evaluarán, analizarán, etc. Un "analito" puede ser una sola especie molecular o puede estar compuesto por múltiples especies moleculares distintas.

"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 simples de inmunoglobulinas completas (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, scFv (variable de monocatenaria), y fragmentos dAb), y otras proteínas que incluyen al menos una 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 la secuencia de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) y, por lo tanto, típicamente reconocen diferentes epítomos de un antígeno. A menudo, un anticuerpo policlonal se deriva de múltiples líneas de linfocitos B diferentes, cada una de las cuales produce un anticuerpo con una especificidad diferente. Un anticuerpo policlonal puede estar compuesto en gran parte por varias subpoblaciones de anticuerpos, cada uno de los cuales se deriva de

una línea de linfocitos B individuales. Un anticuerpo monoclonal está compuesto por moléculas de inmunoglobulina individuales que comprenden CDR con la misma secuencia y, por lo tanto, reconocen el mismo epítipo (es decir, el anticuerpo es monoespecífico). A menudo, un anticuerpo monoclonal se deriva de una única línea de linfocitos B o hibridoma. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo "humanizado" en el que, por ejemplo, un dominio variable de

- 5 origen de roedor se fusiona con un dominio constante de origen humano, o en el que algunos o todos los aminoácidos de la región determinante de la complementariedad a menudo junto con uno o más aminoácidos marco se "injertan" de un roedor, por ejemplo, un anticuerpo murino a un anticuerpo humano, conservan de este modo la especificidad del anticuerpo de roedor.
- Los inventores descubrieron que muchos anticuerpos publicados y disponibles en el mercado presentaban
- 10 interferencia 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 e iC3b. Se reconoció que la reactividad cruzada podría ser una fuente importante de inexactitud en ciertas situaciones. De particular preocupación en el desarrollo de un ensayo para iC3b fue la interferencia entre C3 intacto e iC3b observada con muchos de los anticuerpos iC3b ensayados. Pruebas adicionales demostraron que
- 15 la interferencia entre C3b e iC3b fue aún más significativa con al menos algunos de estos anticuerpos. Esto fue motivo de preocupación porque se espera que los niveles de iC3b estén presentes en niveles mucho más bajos que el C3 intacto en las muestras de pacientes. Como se describe en el presente documento, la selección de anticuerpos con especificidad para C3 intacto o iC3b con el fin de minimizar dicha interferencia es posible, y los anticuerpos con especificidad para C3 intacto o iC3b pueden no tener sustancialmente reactividad cruzada. En este contexto,
- 20 "sustancialmente sin reactividad cruzada" significa menos de aproximadamente el 0,1% de reactividad cruzada, lo que significa que una solución de C3 de 1 ug/ml debe registrarse como inferior a aproximadamente 1 ng/ml de iC3b. El umbral de aproximadamente el 0,1% se basa en los niveles fisiológicos de C3 intacto e iC3b en un individuo normal. Los niveles normales de iC3b son este problema previamente desconocido en la detección de la activación del complemento. Aproximadamente el 25% de la señal de iC3b en un ensayo de activación del complemento, el
- 25 ensayo puede producir resultados de falso positivo que anulan la utilidad del ensayo.

- "Fluido corporal" significa cualquier fluido en el cuerpo que pueda analizarse para determinar la activación del complemento. Los fluidos corporales incluyen, pero sin limitación, sangre entera, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de heridas, líquido de lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo. Véase la Figura 19 para una
- 30 lista no limitante de fluidos corporales adecuados.

- "Nivel de activación del complemento" significa la cantidad de complemento (generalmente C3) que se activa en un momento dado. Las cantidades (es decir, los niveles) de C3 intacto, iC3b y/o C3 total se expresan típicamente en términos de concentración, pero pueden expresarse en términos de masa o peso. La concentración puede
- 35 expresarse de varias maneras, por ejemplo, en términos de molaridad, molalidad, fracción molar, fracción de masa (masa de una sustancia en una mezcla como fracción de la masa de la mezcla completa), masa por unidad de volumen, etc. Para los fines de la descripción en el presente documento, generalmente se utilizará la concentración (por ejemplo, masa por unidad de volumen). El nivel de activación del complemento también se puede describir como una relación de iC3b con respecto a C3 intacto o total, o como una relación de C3a a C3 total.

- 40 "Trastorno asociado con el complemento", como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno o afección caracterizada por una modificación en la activación del complemento. Los ejemplos de trastornos asociados al complemento incluyen, pero sin limitación, traumatismo, tal como lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, cirugía, y presión intracraneal; distrés inflamatorio, tal como alergias graves, síndrome de respuesta
- 45 inflamatoria sistémica (SIRS), fallo multiorgánico (MOF), síndrome de insuficiencia respiratoria aguda o del adulto (ARDS), choque séptico, y choque; hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH); angiodema hereditario; enfermedad renal, tal como nefritis glomerular, infección, nefritis lúpica, y enfermedad renal que requiere trasplante de órganos; enfermedad autoinmune, tal como diabetes mellitus I, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, miastenia gravis, artritis reumatoide, y lupus eritematoso sistémico; lesión por
- 50 isquemia/reperfusión; enfermedad del corazón, tal como infarto de miocardio y paro cardíaco; embarazo, incluyendo preeclampsia y síndrome de hipoxia fetal; enfermedad ocular, tal como degeneración macular relacionada con la edad, síndrome del ojo seco, e infección ocular; trasplante de órganos, incluido rechazo al trasplante, detección del rechazo inminente, detección de infecciones, y ajustes de seguimiento en los regímenes de fármacos inmunosupresores; infección, incluyendo sepsis, neumonía, infección de vejiga, infección del tracto urinario, e
- 55 infección renal; y trastornos neurológicos, incluyendo esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, y trastorno por estrés posttraumático.

"Control" se refiere a una muestra que tiene un nivel de referencia conocido de activación del complemento. En algunas formas de realización, el control tiene un nivel de activación del complemento comparable al de un individuo

que no está experimentando un trastorno asociado con el complemento, de manera que una muestra de ensayo que tenga un nivel de activación del complemento que se desvíe en comparación con el control es indicativa de un trastorno asociado con el complemento. En ciertas formas de realización, un trastorno asociado con el complemento está indicado cuando el nivel de activación del complemento de la muestra de ensayo se desvía estadísticamente de manera significativa en comparación con el control.

La "firma de activación de C3", como se usa en el presente documento, significa cambios en los niveles de activación C3 a lo largo del tiempo.

- 10 "Desviado" y "una desviación" como se usan en el presente documento, se refieren a desviaciones estadísticamente significativas en comparación con un nivel de referencia en un control. Dependiendo del analito que se esté analizando, un nivel de muestra de ensayo desviado puede elevarse o disminuirse en relación con el nivel de control.
- 15 "Disminuido", en comparación con un nivel de referencia en un control, significa una disminución estadísticamente significativa. En una respuesta inflamatoria aguda, los niveles de C3 intacto se agotan a medida que C3 se descompone en sus productos de activación. En ciertas formas de realización, los niveles de C3 intacto se consideran disminuidos en comparación con un nivel de referencia en un control en aproximadamente el 10%.
- 20 "Elevado", en comparación con un nivel de referencia en un control, significa una elevación estadísticamente significativa. En una respuesta inflamatoria aguda, los niveles de iC3b aumentan a medida que C3 se descompone en sus productos de activación. En ciertas formas de realización, una relación de iC3b con respecto a C3 intacto que se eleva en comparación con la relación normal de 0,005 es indicativa de la activación de C3.
- 25 "Epítipo" se refiere a la porción mínima de una molécula que es reconocida por, y por lo tanto determina la inmunoespecificidad de, un anticuerpo que se une a dicho epítipo. El término también se usa en el presente documento para referirse a la porción mínima de una molécula que es reconocida por un agente de unión no específico de anticuerpo. A menos que se indique otra cosa, en el presente documento se supone que un agente de unión específico que se une a una proteína del complemento se une a un epítipo presente y accesible para la unión
- 30 en la proteína nativa, es decir, el epítipo no es un neoepítipo.

"Distrés inflamatorio" o "disfunción inflamatoria" se produce cuando la respuesta inflamatoria no logra resolver o eliminar los estímulos hacia los que se dirige la respuesta inflamatoria. En tales casos agudos, la respuesta inflamatoria aumenta hasta que se erosiona el control homeostático sobre el proceso. En una forma de realización, un nivel de activación del complemento determinado por los ensayos y métodos divulgados en el presente documento se correlaciona directamente con la gravedad del distrés inflamatorio que experimenta un individuo. Por ejemplo, cuando la concentración de iC3b es de aproximadamente el 12,5% de C3 intacto, se puede decir que el distrés inflamatorio del paciente es levemente grave. Cuando la concentración de iC3b es de aproximadamente el - 5% de C3 intacto, se puede decir que el distrés inflamatorio del paciente es moderadamente grave. Cuando la concentración de iC3b es superior al 5% de C3 intacto, se dice que el distrés inflamatorio del paciente es muy grave. Comprender la gravedad del distrés inflamatorio de un paciente puede dar información sobre el tratamiento del médico para la persona. Por ejemplo, si el individuo presenta un nivel de distrés inflamatorio altamente grave, como se indica por los ensayos y métodos divulgados en el presente documento, el médico puede proporcionar tratamiento médico de emergencia en los primeros momentos del distrés inflamatorio, para minimizar el daño de la respuesta inflamatoria.

"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 está unida. Una etiqueta detectable a menudo produce una señal tal como fluorescencia, quimioluminiscencia, radioactividad, color, propiedades magnéticas o paramagnéticas, etc., que la hace detectable, por ejemplo, mediante 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, una sustancia fluorescente; pigmento; sustancia quimioluminiscente o luminiscente; sustancia coloreada; sustancia magnética; o una partícula de metal no magnética tal como coloide de oro. En una forma de realización específica, los anticuerpos de detección adecuados para su uso en los métodos y ensayos instantáneos se conjugan con una etiqueta de oro coloidal, que proporciona una señal de color.

"Neoepítipo" se refiere a un epítipo que se genera o se vuelve detectable como resultado de la escisión proteolítica de un componente del complemento o producto de escisión.

En ciertas formas de realización de los ensayos y métodos divulgados en el presente documento, el complemento presente en la muestra de fluido corporal analizada no se activa sustancialmente por el ensayo o el propio método. "No sustancialmente activado", como se usa en este contexto, significa que los métodos y ensayos de la presente invención están sustancialmente libres de activación *in vitro* causada por los métodos y/o materiales de ensayo. De esta manera, se evitan los resultados de falso positivo de las pruebas para la activación del complemento, ya que el inmunoensayo de flujo lateral es rápido y requiere menos manipulación de la muestra, evitando de este modo muchos de los estímulos que contribuyen a la activación *in vitro* del complemento.

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

"Lector" se refiere a un instrumento adecuado para la detección de la señal producida por la etiqueta. Se conocen diversos instrumentos en la técnica para la detección de señales de etiquetas en pruebas de diagnóstico. En una forma de 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 comercialmente a partir de una diversidad de proveedores, incluyendo BioAssay Works (Ijamsville, MD), ESE-Quant de Qiagen (Hilden, Alemania), Easterline LRE (Nordlingen, Alemania) y Detekt Biomedical (Austin, TX). En algunas formas de realización específicas, el lector es un lector de mano que cuantifica la cantidad o concentración de C3 intacto, iC3b o C3 total.

El "tratamiento", como se usa en el presente documento, incluye cualquier tratamiento de diagnóstico, terapéutico, preventivo o correctivo administrado a un individuo. En algunas formas de realización, el tratamiento incluye la forma de realización de pruebas de diagnóstico adicionales en el individuo. En otras formas de realización, el tratamiento incluye el tratamiento terapéutico, tal como administrar un agente terapéutico al individuo. En ciertas formas de realización, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, agentes antiinflamatorios e inhibidores del complemento. En otras formas de realización, el tratamiento incluye la modificación de un tratamiento que el individuo ya ha recibido o está recibiendo. Por ejemplo, en una forma de realización, tratar a un individuo en un ventilador abarca la optimización del ventilador.

35 Descripción general del sistema del complemento

El sistema del complemento comprende más de 30 proteínas séricas y celulares y desempeña papeles importantes en la inmunidad innata y adaptativa. Hay tres vías principales de activación del 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 (PCR) y ADN y ARN microbianos. La ruta de lectina se activa por polisacáridos con un grupo libre de manosa y otros azúcares comunes a los hongos y bacterias. La ruta alternativa está mediada por la activación directa de C3 por sustancias "foráneas" que a menudo incluyen componentes de la pared celular microbiana. Las tres vías principales de activación del complemento convergen en el componente 3 del complemento de proteína central (C3). C3 es un mediador central de inflamación y se activa por la mayor parte de factores que provocan inflamación. Véanse las Figuras 1 y 2 para una descripción esquemática del sistema del complemento.

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

La convertasa de CP escinde C3 para formar C3a y C3b. Al igual que el C4b activado, el C3b puede unirse covalentemente a las superficies celulares o reaccionar con H₂O y permanecer en solución. C3b activado tiene múltiples roles. Por sí mismo, puede servir como una opsonina para hacer que las células o partículas decoradas

sean más fáciles de ingerir por los fagocitos. Además, C3b puede asociarse con C4bC2a (la C3 convertasa de CP) para formar una C5 convertasa. El complejo, denominado C4bC2aC3b, se denomina C5 convertasa de CP. Como alternativa, C3b puede formar el núcleo de otra C3 convertasa llamada C3 convertasa de ruta alternativa (AP).

- 5 La ruta alternativa (AP) es otro mecanismo por el cual C3 puede activarse. Por lo general, se activa por dianas tales como las superficies microbianas y varios polisacáridos complejos y otros materiales. Esta ruta alternativa también puede iniciarse espontáneamente mediante la escisión del enlace tioéster en C3 por una molécula de agua para formar C3(H₂O). C3(H₂O) se une al factor B, lo que permite que el factor D escinda el factor B en Ba y Bb. Bb permanece asociado con C3(H₂O) para formar el complejo B3 de C3(H₂O), que actúa como una C3 convertasa y
10 escinde C3, dando como resultado C3a y C3b.

El C3b formado a través de este proceso o a través de las rutas clásica 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 ruta alternativa (AP). La
15 unión de otra molécula de C3b a la C3 convertasa de AP produce C3bBbC3b, que es la C5 convertasa de AP.

La ruta del complemento de lectina se inicia mediante la unión de la lectina de unión a manosa (MBL) y la serina proteasa asociada a MBL (MASP) a los carbohidratos. El gen MB 11 (conocido como LMAN1 en los seres humanos) codifica una proteína de membrana integral de tipo 1 localizada en la región intermedia entre el retículo
20 endoplasmático y el aparato de Golgi. El gen MBL2 codifica la proteína soluble de unión a manosa que se encuentra en el suero. En la ruta de la lectina humana, MASp1 y MASp2 participan en la proteólisis de C4 y C2, lo que lleva a la C3 convertasa, lo que conduce a la producción de una C5 convertasa como se ha descrito anteriormente para la CP.

25 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 ataque de membrana C5b-9 (MAC). El MAC de ensamblaje se inserta en la membrana de la célula diana, formando un poro delineado por un anillo de moléculas C9. La formación de MAC causa la lisis celular de los microbios invasores, la formación de MAC en las células huésped también puede causar la lisis, pero no necesariamente. Las cantidades subclínicas de
30 MAC en la membrana de las células pueden afectar a la función celular de varias maneras. Los productos de escisión pequeños C3a, C4a y C5a son anafilatoxinas y median reacciones múltiples en la respuesta inflamatoria aguda. C3a y C5a también son potentes factores quimiotácticos que atraen a las células del sistema inmunológico, tales como neutrófilos y macrófagos, al área de crisis.

35 Complemento como biomarcador para crisis fisiológicas

El componente C3 del complemento es útil como un biomarcador de alerta general de que el cuerpo está respondiendo a alguna forma de crisis fisiológica, tal como una lesión, infección u otro proceso de enfermedad. El complemento se ha asociado con una amplia diversidad de enfermedades, incluyendo lupus, artritis, hemorragia
40 intracraneal, diabetes, esclerosis múltiple, cardiopatía y degeneración macular relacionada con la edad. En muchos casos, la gravedad de la enfermedad se correlaciona con el nivel de activación del complemento. En algunos casos, el complemento puede desempeñar un papel en la patología de la enfermedad. En estos casos, el cuerpo no puede controlar con éxito la causa de la inflamación, que va de local a sistémica. La activación del complemento puede dañar directamente el tejido o hacerlo indirectamente mediante la activación excesiva de las células y el
45 reclutamiento de células inmunitarias que a su vez causan la destrucción del tejido. Los ejemplos de activación excesiva incluyen choque anafiláctico, fallo multiorgánico (MOF), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

La activación del complemento en el periodo postraumático inmediato y temprano ha sido bien documentada y se
50 produce mediante varios mecanismos diferentes, que probablemente involucran a las tres rutas principales. La liberación y activación de enzimas proteolíticas pueden activar directamente los componentes del complemento. El daño tisular y la alteración del revestimiento endotelial exponen superficies que carecen de moléculas inhibitoras del complemento endógeno que normalmente protegen los tejidos del huésped. Estas superficies son susceptibles a la deposición de C3b y la activación de rutas alternativas. La activación del complemento también se desencadena por
55 la reperfusión de los tejidos después de la isquemia postraumática.

Las múltiples líneas de evidencia sugieren que la activación del complemento es un factor importante en muchas de las complicaciones de traumatismo grave, que contribuye significativamente a la lesión I/R, ARDS, MODS, lesión secundaria del SNC y sepsis. Primero, está claro que la activación del complemento es una aparición común en el

periodo inmediato postraumático en víctimas de traumatismo humanas, y varios estudios han proporcionado evidencias que sugieren que el grado de activación del complemento se correlaciona positivamente con malos resultados. En segundo lugar, existe evidencia considerable de que la activación del complemento es una causa importante de lesión I/R en modelos animales de traumatismo, así como en víctimas de traumatismo humanas. En tercer lugar, numerosos estudios han demostrado que la deficiencia del complemento o la administración de inhibidores del complemento reducen el daño tisular y mejoran los resultados en una diversidad de modelos experimentales que incluyen hemorragia, lesión I/R y lesión del SNC.

Varios estudios midieron la activación del complemento en pacientes con traumatismo en puntos de tiempo secuenciales después de un traumatismo grave e investigaron la existencia de una correlación entre la activación del complemento y la gravedad de la lesión. Los resultados adversos, tal como ARDS, fallo multiorgánico, sepsis y muerte, también se controlaron en relación con la activación del complemento. En un estudio, los parámetros del complemento se determinaron durante 14 días en pacientes con traumatismo con riesgo de ARDS. Todos los pacientes mostraron una disminución en los niveles séricos de C3, C4, C5 y de los inhibidores C1-INH, el factor de complemento H (CFH) y el factor de complemento I (CFI) en las primeras 24 horas, lo que indica el consumo por altos niveles de activación del complemento. Véase Catania et al., Immunological consequences of trauma and shock, Ann. Acad. Med. Singapore 28:120-32 (1999); Hecke, et al., Circulating complement proteins in multiple trauma patients--correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome, Crit. Care Med. 25(12): 201524 (1997); Huber-Lang et al., Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis, J. Immunol. 169:3223-31 (2002); Kang et al., Change of complement system predicts the outcome of patients with severe thermal injury, J. Burn Care Rehabil. 24:148-53 (2003); y Younger et al., Detrimental effects of complement activation in hemorrhagic shock, J. Appl. Physiol. 90:441-46 (2001).

Ensayos para la detección y cuantificación de la activación del complemento y sus métodos de uso

Los ensayos y métodos divulgados actualmente proporcionan varias ventajas sobre los ensayos y métodos del complemento anteriores conocidos en la técnica: por ejemplo, los ensayos y métodos instantáneos son adecuados para el uso en el punto de atención, produciendo resultados en cuestión de minutos, en lugar de horas. El rápido retorno de los resultados permite a un médico actuar sobre los cambios en la activación de C3 casi en tiempo real para dirigir la atención al paciente durante los primeros momentos críticos después de una lesión traumática o al inicio de una crisis fisiológica. Los ensayos y métodos proporcionados son relativamente fáciles de usar y no requieren la disponibilidad de un laboratorio externo o de un técnico de laboratorio cualificado. Como alternativa o adicionalmente, los ensayos y métodos proporcionados requieren menos etapas de manejo y, por lo tanto, minimizan la activación de C3 intacto debido al manejo y procesamiento, lo que conduce a resultados de pruebas de falso positivo. Como alternativa o adicional, los ensayos y métodos descritos en el presente emplean pares de anticuerpos seleccionados cuidadosamente para permitir la medición de las proteínas del complemento C3 intacto y/o iC3b, el biomarcador de activación principal de C3. Esta medida más precisa de la activación del complemento, en comparación con los ensayos tradicionales de C3 total, permite el análisis de la renovación y la cantidad real de C3 restante y disponible para la activación.

Las muestras utilizadas en los métodos de la presente invención pueden variar de acuerdo con la aplicación específica de la invención. Típicamente, se tomará una muestra de un individuo que padece un trastorno asociado al complemento. Los trastornos asociados al complemento ejemplares incluyen traumatismo, distrés inflamatorio, trastornos autoinmunes, hemorragia intracraneal, infección tal como bacteriemia, rechazo de trasplante, enfermedad ocular, enfermedad cardíaca, lesión por isquemia/reperfusión, degeneración macular relacionada con la edad, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), angiodema hereditario, enfermedad renal, trastornos asociados al embarazo, y trastornos neurológicos. En algunas formas de realización, el trastorno asociado con el complemento es un trastorno autoinmune. Los trastornos autoinmunes incluyen una diversidad de enfermedades y afecciones asociadas con una respuesta inmune inadecuada contra tejidos y sustancias que normalmente se encuentran en el cuerpo. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad de Graves, y artritis reumatoide, entre otras. En otras formas de realización, el trastorno asociado con el complemento es distrés inflamatorio. El distrés inflamatorio, también conocido como disfunción inflamatoria, incluye una diversidad de enfermedades y afecciones asociadas con la hiperinflamación. Los ejemplos de enfermedades y afecciones asociadas con el distrés inflamatorio incluyen, pero sin limitación, insuficiencia orgánica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio en adultos (ARDS), sepsis, neumonía asociada al ventilador (VAP), insuficiencia respiratoria y neumonía.

La muestra puede ser una muestra de fluido corporal o un derivado del mismo. Los fluidos corporales ejemplares

que pueden comprender o procesarse para producir una muestra incluyen sangre entera, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de heridas, líquido de lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo. Véase la Figura 19 para una lista no limitante de fluidos corporales adecuados. En algunas formas de realización, el fluido corporal puede obtenerse del individuo en una hora después de un evento fisiológico que activa la activación del
5 complemento. En otras formas de realización, el fluido corporal puede ser sangre entera.

Los niveles de activación del complemento pueden evaluarse para determinar la desviación de un valor de referencia de un control (es decir, un nivel "normal") que indica que el complemento está activado en el individuo. Como ejemplo, en ciertas formas de realización, el nivel o la concentración de iC3b en la muestra de ensayo puede
10 elevarse en comparación con un control, lo que indica que C3 está activado y se ha dividido adicionalmente en su producto de activación, iC3b. Como un ejemplo adicional en otras formas de realización, el nivel o la concentración de C3 intacto disminuye en comparación con un control, lo que indica que C3 intacto se ha convertido en sus productos de ruptura o activación y, por lo tanto, se agota en el individuo.

15 Un nivel de C3 intacto "normal" en una muestra de paciente (por ejemplo, fluido corporal) puede estar dentro de un intervalo con un límite inferior y un límite superior que es más alto que el límite inferior. En algunas formas de realización, el límite inferior se selecciona del grupo que consiste en 30 ug/ml, 35 ug/ml, 40 ug/ml, 45 ug/ml, 50 ug/ml, 55 ug/ml, 60 ug/ml, 65 ug/ml, 70 ug/ml, 75 ug/ml, 80 ug/ml, 85 ug/ml, 90 ug/ml, 95 ug/ml, 100 ug/ml, 110 ug/ml, 120 ug/ml, 130 ug/ml, 140 ug/ml, 150 ug/ml, 160 ug/ml, 170 ug/ml, 180 ug/ml, 190 ug/ml, 200 ug/ml, 210
20 ug/ml, 220 ug/ml, 230 ug/ml, 240 ug/ml, 250 ug/ml, 260 ug/ml, 270 ug/ml, 280 ug/ml, 290 ug/ml, 300 ug/ml, 350 ug/ml, 400 ug/ml, 450 ug/ml, 500 ug/ml, 550 ug/ml, 600 ug/ml 650 ug/ml, 700 ug/ml o más. En algunas formas de realización, el límite superior se selecciona del grupo que consiste en 2.000 ug/ml, 1.900 ug/ml, 1.800 ug/ml, 1.700 ug/ml, 1.600 ug/ml, 1.500 ug/ml, 1.400 ug/ml, 1.300 ug/ml, 1.200 ug/ml, 1.100 ug/ml, 1.000 ug/ml, 900 ug/ml, 800 ug/ml, 700 ug/ml, 600 ug/ml, 500 ug/ml, 400 ug/ml, 300 ug/ml o menos. Por lo tanto, un nivel "normal" de C3 intacto
25 puede estar dentro del intervalo de 30 ug/ml-2.000 ug/ml; dentro del intervalo de 100 ug/ml-1.500 ug/ml; dentro del intervalo de 200 ug/ml-1.200 ug/ml; dentro del intervalo de 200 ug/ml-1.000 ug/ml; dentro del intervalo de 200 ug/ml-800 ug/ml; dentro del intervalo de 200 ug/ml-500 ug/ml; dentro del intervalo de 600 ug/ml-1.800 ug/ml; o dentro del intervalo de 700 ug/ml-1700 ug/ml.

30 Cuando la muestra es sangre, plasma o suero, un nivel "normal" de C3 intacto puede estar dentro del intervalo 300 ug/ml-1.700 ug/ml; en otros casos, un nivel "normal" de C3 intacto puede estar dentro del intervalo 400 ug/ml-1.400 ug/ml; dentro del intervalo 500 ug/ml-1.300 ug/ml; dentro del intervalo 500 ug/ml-1.200 ug/ml; dentro del intervalo 500 ug/ml-1.100 ug/ml; dentro del intervalo 500 ug/ml-1.000 ug/ml; dentro del intervalo 500 ug/ml-900 ug/ml; dentro del intervalo 500 ug/ml-800 ug/ml; dentro del intervalo 500 ug/ml-700 ug/ml; o dentro del intervalo 500 ug/ml-600
35 ug/ml.

Cuando la muestra es sangre entera, un nivel "normal" de C3 intacto puede estar dentro del intervalo 500 ug/ml-1.000 ug/ml.

40 Cuando la muestra es plasma, un nivel "normal" de C3 intacto puede estar dentro del intervalo 700 ug/ml-1.700 ug/ml.

Cuando la muestra es suero, un nivel "normal" de C3 intacto puede estar dentro del intervalo 700 ug/ml-1.700 ug/ml.

45 Cuando la muestra son lágrimas, un nivel "normal" de C3 intacto puede estar dentro del intervalo 30 ug/ml-100 ug/ml, dentro del intervalo 40 ug/ml-90 ug/ml; dentro del intervalo 50 ug/ml-80 ug/ml; dentro del intervalo 50 ug/ml-70 ug/ml; o dentro del intervalo 50 ug/ml-60 ug/ml.

El C3 intacto puede detectarse utilizando un anticuerpo sin reactividad cruzada caracterizado por que una solución
50 de 1 ug/ul de iC3b produce una señal equivalente a menos de aproximadamente 1 ng/ml de C3. El anticuerpo sin reactividad cruzada puede ser HM2075.

El nivel de activación del complemento puede correlacionarse con una severidad del distrés inflamatorio: cuanto mayor sea el nivel de activación del complemento, mayor será el riesgo de desarrollar una angustia inflamatoria y/o
55 mayor será la gravedad del distrés inflamatorio experimentado por el individuo. Por lo tanto, el trastorno asociado con el complemento puede ser distrés inflamatorio y la concentración de uno o más de C3 intacto e iC3b se correlaciona con una gravedad del distrés inflamatorio.

El nivel de activación del complemento determinado por el método instantáneo puede proporcionar información de

diagnóstico en el punto de atención que puede dirigir la atención del paciente. Basándose en el riesgo del trastorno asociado al complemento o la gravedad de la enfermedad o trastorno, un médico puede seleccionar el tratamiento adecuado para el individuo. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende realizar pruebas adicionales en el individuo para determinar la causa del distrés inflamatorio. Por ejemplo, los pacientes con traumatismo grave que requieren asistencia respiratoria con ventilación para respirar corren el riesgo de sufrir dificultad respiratoria aguda causada por neumonía asociada a ventilación (VAP) o disfunción inflamatoria no infecciosa. Un nivel de activación del complemento puede indicar una disfunción inflamatoria activa o inminente antes de presentar signos clínicos de crisis respiratoria. Los ensayos y métodos instantáneos pueden indicar si el individuo está experimentando VAP o dificultad respiratoria no infecciosa. Como alternativa, los ensayos y métodos instantáneos pueden indicar pruebas adicionales (tal como el lavado broncoalveolar (BAL)) en un punto de tiempo anterior a la práctica habitual. Si el individuo padece VAP, el tratamiento puede consistir en administrar un agente terapéutico tal como un antibiótico o un conjunto de antibióticos. Si la disfunción inflamatoria es causada por medios no infecciosos, se puede seleccionar una terapia del grupo que consiste en ajuste del ventilador, agentes antiinflamatorios e inhibidores del complemento.

Si el individuo padece lupus eritematoso sistémico, las pruebas adicionales pueden ser pruebas genéticas. Si el individuo padece una lesión cerebral traumática o una hemorragia intracraneal, las pruebas adicionales pueden comprender obtener una muestra de líquido cefalorraquídeo para un análisis adicional. Si el individuo padece una herida, incluyendo una herida que no cicatriza, las pruebas adicionales pueden comprender obtener una muestra de exudado de la herida para un análisis adicional.

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

Uno de los beneficios de los métodos de la presente invención es el rápido retorno de los resultados, que permite a un médico dirigir la atención del paciente en respuesta a los cambios en la activación del complemento casi en tiempo real. Mientras que los ensayos anteriores para la activación del complemento conocidos en la técnica requieren laboratorios completos, técnicos especializados y horas para completarlos, los métodos y los ensayos instantáneos proporcionan resultados en un marco de tiempo mucho más corto. En algunas formas de realización, el método instantáneo puede proporcionar una medición del nivel de activación del complemento en la muestra en aproximadamente 30 minutos o menos. En otras formas de realización, el método puede proporcionar un nivel de activación del 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 al médico determinar un nivel de activación del complemento y seleccionar una terapia adecuada en respuesta, durante un periodo de tiempo clínicamente significativo. De hecho, los métodos instantáneos pueden realizarse junto a la cama o incluso en el lugar 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 del complemento determinado por el ensayo y el método puede dirigir la atención del paciente dentro de la primera hora crítica postraumática.

Las muestras utilizadas en los métodos de la presente invención pueden provenir de cualquiera de una diversidad de fuentes. Típicamente, se tomará una muestra de un individuo que padece un trastorno asociado al complemento. Los trastornos asociados al complemento ejemplares incluyen traumatismo, distrés inflamatorio, trastornos autoinmunes, hemorragia intracraneal, infección tal como bacteriemia, rechazo de trasplante, enfermedad ocular, enfermedad cardíaca, lesión por isquemia/reperfusión, degeneración macular relacionada con la edad, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), angiodema hereditario, enfermedad renal, trastornos asociados al embarazo, y trastornos neurológicos. En algunas formas de realización, el trastorno asociado con el complemento es un trastorno autoinmune. Los trastornos autoinmunes incluyen una diversidad de enfermedades y afecciones asociadas con una respuesta inmune inadecuada contra tejidos y sustancias que normalmente se encuentran en el cuerpo. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad de Graves, y artritis reumatoide, entre otras. En otras formas de realización, el trastorno asociado con el complemento es distrés

inflamatorio. El distrés inflamatorio, también conocido como disfunción inflamatoria, incluye una diversidad de enfermedades y afecciones asociadas con la hiperinflamación. Los ejemplos de enfermedades y afecciones asociadas con el distrés inflamatorio incluyen, pero sin limitación, insuficiencia orgánica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio en adultos (ARDS), sepsis, neumonía asociada al ventilador (VAP), insuficiencia respiratoria y neumonía.

De acuerdo con varios aspectos de la invención, la muestra puede ser una muestra de fluido corporal o derivada del mismo. Los fluidos corporales ejemplares que pueden comprender o procesarse para producir una muestra incluyen sangre entera, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de heridas, líquido de lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo. Véase la Figura 19 para una lista no limitante de fluidos corporales adecuados. En algunas formas de realización, el fluido corporal puede obtenerse del individuo en una hora después de un evento fisiológico que activa la activación del complemento. En otras formas de realización, el fluido corporal puede ser sangre entera.

Un nivel de iC3b "normal" en una muestra de paciente (por ejemplo, fluido corporal) puede estar dentro de un intervalo con un límite inferior y un límite superior que es más alto que el límite inferior. El límite inferior puede seleccionarse del grupo que consiste en 75 ng/ml, 80 ng/ml, 85 ng/ml, 90 ng/ml, 95 ng/ml, 100 ng/ml, 110 ng/ml, 120 ng/ml, 130 ng/ml, 140 ng/ml, 150 ng/ml, 160 ng/ml, 170 ng/ml, 180 ng/ml, 190 ng/ml, 200 ng/ml, 210 ng/ml, 220 ng/ml, 230 ng/ml, 240 ng/ml, 250 ng/ml, 260 ng/ml, 270 ng/ml, 280 ng/ml, 290 ng/ml, 300 ng/ml o más. El límite superior puede seleccionarse del grupo que consiste en 5 ug/ml, 4,5 ug/ml, 4 ug/ml, 3,5 ug/ml, 3 ug/ml, 2,5 ug/ml, 2 ug/ml, 1,9 ug/ml, 1,8 ug/ml, 1,7 ug/ml, 1,6 ug/ml, 1,5 ug/ml, 1,4 ug/ml, 1,3 ug/ml, 1,2 ug/ml, 1,1 ug/ml, 1,0 ug/ml, 0,9 ug/ml, 0,8 ug/ml, 0,7 ug/ml, 0,6 ug/ml, 0,5 ug/ml, 0,4 ug/ml, 0,3 ug/ml o menos. Por lo tanto, un nivel "normal" de iC3b puede estar dentro del intervalo de 100 ng/ml-5 ug/ml; dentro del intervalo de 100 ng/ml-4 ug/ml; dentro del intervalo de 100 ng/ml-3 ug/ml; dentro del intervalo de 100 ng/ml-2 ug/ml; dentro del intervalo de 100 ng/ml-1,5 ug/ml; dentro del intervalo de 200 ng/ml-1 ug/ml; dentro del intervalo de 200 ng/ml-0,7 ug/ml; dentro del intervalo de 200 ng/ml-0,5 ug/ml; dentro del intervalo de 200 ng/ml-0,3 ug/ml.

Cuando la muestra es sangre, plasma o suero, un nivel "normal" de iC3b puede estar dentro del intervalo 150 ng/ml-5.000 ng/ml; en otros casos, un nivel "normal" de iC3b puede estar dentro del intervalo 150 ng/ml -4.000 ng/ml; dentro del intervalo 150 ng/ml-3.000 ng/ml; dentro del intervalo 150 ng/ml-2.000 ng/ml; dentro del intervalo 150 ng/ml-1.000 ng/ml; dentro del intervalo 175 ng/ml-900 ng/ml; dentro del intervalo 200 ng/ml-800 ng/ml; dentro del intervalo 200 ng/ml-700 ng/ml; dentro del intervalo 200 ng/ml-600 ng/ml; dentro del intervalo 200 ng/ml-500 ng/ml; dentro del intervalo 200 ng/ml-400 ng/ml; o dentro del intervalo 200 ng/ml-300 ng/ml.

Cuando la muestra es sangre entera, un nivel "normal" de iC3b puede estar dentro del intervalo 10 ng/ml-1.500 ng/ml.

Cuando la muestra es plasma, un nivel "normal" de iC3b puede estar dentro del intervalo 10 ng/ml-3.000 ng/ml.

Cuando la muestra es suero, un nivel "normal" de iC3b puede estar dentro del intervalo 10 ng/ml-5.000 ng/ml.

Cuando la muestra son lágrimas, un nivel "normal" de iC3b puede estar dentro del intervalo 1 ng/ml-50 ng/ml; dentro del intervalo 1 ng/ml-40 ng/ml; dentro del intervalo 1 ng/ml-30 ng/ml; dentro del intervalo 1 ng/ml-20 ng/ml; dentro del intervalo 2 ng/ml-10 ng/ml; o dentro del intervalo 4 ng/ml-10 ng/ml.

Es posible detectar iC3b utilizando un anticuerpo sin reactividad cruzada caracterizado por que una solución de 1 ug/ul de C3 intacto produce una señal equivalente a menos de aproximadamente 1 ng/ml de iC3b. El anticuerpo sin reactividad cruzada puede seleccionarse del grupo que consiste en A209, MCA2607 y HM2199.

Algunas formas de realización de la invención comprenderán una relación de referencia en el intervalo de 0,001 a 0,005. En ciertas formas de realización, la relación de referencia se selecciona del grupo que consiste en 0,001, 0,002 y 0,005.

La forma del ensayo es un inmunoensayo de flujo lateral que detecta la presencia o ausencia de uno o más de C3 intacto e iC3b en la muestra. El ensayo de flujo lateral detecta la presencia de C3 total. El inmunoensayo de flujo lateral puede leerse por un lector. El lector puede cuantificar una concentración de uno o más de C3 intacto e iC3b en la muestra o puede cuantificar una concentración de C3 total en la muestra.

En las formas de realización de ensayo de flujo lateral de la invención, la Patente de Estados Unidos 7.910.381 (Ford et al.) describe varios de dichos ensayos que se consideran útiles de acuerdo con la presente invención. Las

formas de realización de los ensayos de flujo lateral descritos actualmente se venden con el nombre CFLAT®. La Figura 20 muestra una forma de realización de un casete de ensayo de flujo lateral de acuerdo con las enseñanzas de la Patente de Estados Unidos 7.910.381.

- 5 Como se describe en el presente documento, el médico puede detectar una disminución en la activación del complemento en respuesta al tratamiento que está recibiendo el paciente. Por consiguiente, el médico puede modificar el tratamiento del individuo ajustando la dosis de los medicamentos administrados, tales como agentes antiinflamatorios o inhibidores del complemento, o interrumpir el tratamiento una vez que los niveles del complemento hayan vuelto a la normalidad (es decir, un nivel en un individuo que no está experimentando un
- 10 trastorno asociado al complemento). El médico puede detectar un aumento en los niveles de activación del complemento en respuesta al tratamiento que recibe el paciente. Por consiguiente, el médico puede modificar el tratamiento del individuo aumentando la dosis de medicamentos, tales como agentes antiinflamatorios o inhibidores del complemento, hasta que se logre una estabilización deseada o una disminución en los niveles de activación del complemento. Si no se detecta ningún cambio en el nivel de activación del complemento, el médico puede modificar
- 15 el tratamiento del individuo o puede optar por mantener el régimen de tratamiento del individuo hasta que se observe un cambio en los niveles de activación del complemento.

- Haciendo referencia a la Figura 4, una forma de realización de inmunoensayo de flujo lateral de la presente invención se describe en el presente documento y comprende una tira de membrana de celulosa 3, sobre la cual se
- 20 dispone una almohadilla de muestra 1 para absorber el fluido de muestra y permitir la migración gradual de los complejos inmunes de muestra y configurado de partículas, una mecha 6 en el extremo distal 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 conjugado de detección. La tira de membrana de celulosa 3 es la región de la zona de prueba, sobre la
- 25 cual se dispone una línea de prueba 4, que comprende anticuerpos monoclonales o policlonales divididos 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 la prueba se ejecutó con éxito. El inmunoensayo de flujo lateral comprende además un respaldo de película de poliéster 7 unido a la tira de membrana de celulosa 3, y un respaldo de película de laminado sensible a la presión 8. Cada inmunoensayo de flujo lateral se puede empaquetar en una
- 30 bolsa de barrera de vapor nulo MYLAR®, por ejemplo.

- 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 cualquier analito diana presente se unirá al conjugado de anticuerpo de detección. Después, la muestra continúa migrando a través de la membrana 3 hasta
- 35 que llega a la línea de prueba 4 donde el complejo objetivo/conjugado se unirá a los anticuerpos inmovilizados que producen una línea visible en la membrana. La muestra migra entonces 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 prueba se unirá a la línea de control y producirá una segunda línea visible en la membrana. El ligando de la línea de control es a menudo un anticuerpo contra la región Fe del anticuerpo conjugado. Esta línea de control indica que la muestra
- 40 ha migrado a través de la membrana de acuerdo con lo previsto.

- En ciertas formas de realización, un inmunoensayo de flujo lateral de acuerdo con la presente invención comprende una tira de membrana única para la detección de un analito individual. En otras formas de realización, el inmunoensayo de flujo lateral detecta dos o más analitos. Cuando el inmunoensayo de flujo lateral detecta dos o
- 45 más analitos, la prueba se puede configurar con múltiples tiras de membrana dispuestas en paralelo (véase, por ejemplo, el esquema de la Figura 5(B)), o con múltiples líneas de prueba dispuestas en serie en una tira de membrana única (véase, por ejemplo, el esquema de la Figura 9(B)).

- Haciendo referencia a la Figura 6, en algunas formas de realización, la tira de membrana de inmunoensayo de flujo lateral está encerrada en un casete de prueba 9 que tiene un puerto 10 para instilar la muestra de ensayo y una
- 50 ventana 11 para ver los resultados de la prueba. Los inmunoensayos de flujo lateral de la Figura 6 están configurados para analizar un solo analito y cada uno comprende una línea de prueba 4 y una línea de control 5.

- Haciendo referencia a la Figura 7, en algunas formas de realización, el inmunoensayo de flujo lateral está
- 55 configurado para analizar dos analitos en un solo casete de prueba en paralelo. En algunas formas de realización, el inmunoensayo de flujo lateral comprende dos puertos 10 para instilar las muestras de ensayo y una tira de membrana 3 separada para cada analito (véase la Figura 7(A)). En otras formas de realización, el inmunoensayo de flujo lateral comprende un puerto 10 para instilar la muestra y una tira de membrana 3 separada para cada analito (véase la Figura 7(B)).

Haciendo referencia a la Figura 8, en algunas formas de realización, el inmunoensayo de flujo lateral puede estar configurado para analizar tres analitos en un solo casete de prueba en paralelo. En algunas formas de realización, el inmunoensayo de flujo lateral puede comprender tres puertos 10 para instilar la muestras de ensayo y una tira de membrana 3 separada para cada analito (véase la Figura 8(A)). En otras formas de realización, el inmunoensayo de flujo lateral puede comprender un puerto 10 para instilar la muestras de ensayo y una tira de membrana 3 separada para cada analito (véase la Figura 8(B)).

Haciendo referencia a la Figura 10, en ciertas formas de realización, el inmunoensayo de flujo lateral puede estar configurado para analizar múltiples analitos en un solo casete de prueba en serie. La Figura 10(A) representa un casete de prueba que comprende una tira de membrana 3 con dos líneas de prueba 4 y una línea de control 5 dispuestas en serie. La Figura 10(B) representa un casete de prueba que comprende una tira de membrana 3 con tres líneas de prueba 4 y una línea de control 5 dispuestas en serie.

El inmunoensayo de flujo lateral actualmente divulgado puede proporcionar una detección cualitativa y/o cuantitativa de los marcadores diana. Cualitativamente, dos líneas claras en la membrana pueden representar un resultado positivo, mientras que una sola línea en la zona de control puede representar un resultado negativo.

En algunas formas de realización de la invención, se proporciona un inmunoensayo de flujo lateral para la detección en el punto de atención de un marcador de activación del complemento en una muestra de fluido corporal que comprende proteínas del complemento, comprendiendo el inmunoensayo de flujo lateral ejemplar: una tira de membrana; un anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo del marcador; una línea de prueba 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, en el que el marcador se selecciona del grupo que consiste en C3 intacto e iC3b.

Se muestra una forma de realización ejemplar de un dispositivo de este tipo en la Figura 20, donde (A) muestra una representación conceptual de la estructura del dispositivo, siendo la tira de membrana una tira de membrana de nitrocelulosa y empleando una almohadilla de conjugado marcada con oro, que es deseable en ciertas aplicaciones, y donde (B) muestra un método de uso de la forma de realización mostrada en (A) para evaluar los niveles de activación del complemento en una muestra.

En algunas formas de realización, el anticuerpo de detección comprende una etiqueta que proporciona una señal que puede ser leída visualmente por un médico o electrónicamente a través de un lector comercial. Son adecuadas diversas etiquetas para su uso en los presentes ensayos divulgados. En una forma de realización específica, la etiqueta puede ser oro coloidal como se muestra en la Figura 20(A).

De acuerdo con varias formas de realización, la detección y captura de pares de anticuerpos debe seleccionarse cuidadosamente para evitar interferencias entre C3 e iC3b. La principal preocupación es el C3 intacto que produce una señal en un ensayo para la detección de iC3b. Dado que ambas moléculas se derivan de la misma molécula de proteína, la interferencia puede presentar un problema. Como C3 está presente en niveles aproximadamente 200 veces más altos que iC3b en individuos normales, incluso un ligero grado de interferencia puede tener un gran impacto en la medición precisa de la activación de iC3b y C3. Esto se complica aún más por el hecho de que el manejo inadecuado, el almacenamiento inadecuado e incluso los propios reactivos pueden causar la activación *in vitro* de C3. Sorprendentemente, los Solicitantes descubrieron que no todos los anticuerpos adecuados para su uso en ensayos ELISA tradicionales son igualmente adecuados para su uso en los ensayos de la presente invención.

Las tablas 1 y 2 a continuación muestran las dificultades para identificar 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 dieron 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 de iC3b. Curiosamente, los inventores observaron que los pares de anticuerpos adecuados para su uso en ensayos ELISA tradicionales no son necesariamente 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 una considerable variabilidad entre pruebas. Esta reactividad cruzada produjo una señal de iC3b de falso positivo a un nivel de dos veces la de iC3b en circulación normal. Dado que el doble o el triple real de los niveles de iC3b serán signos de una activación masiva del complemento, un inmunoensayo de flujo lateral con un 1% de reactividad cruzada carece de utilidad clínica. MP

Biomedicals® (55237) funcionó mucho mejor, produciendo una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 0,5% (aproximadamente el 0,05%), compatible con la utilidad clínica. Sin embargo, cabe destacar que ambos anticuerpos se desempeñaron igualmente bien en los ensayos ELISA tradicionales.

5

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 (55237)	sin reactividad cruzada en condiciones de ensayo
ratón	C3a	Quidel (A203)	cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	varianza entre ensayos demasiado alta
pollo	C3a	GenTex (GTX78198)	conejo	C3d	Abcam (ab15981)	sin lecturas positivas (no funciona)
ratón	C3a	Quidel (A203)	conejo	C3d	Abcam (ab15981)	reacción cruzada con C3b/iC3b+++
cabra	C3a	SantaCruz (sc17237)	conejo	C3d	Abcam (ab15981)	el AB solamente puede reaccionar con C3a, no con C3 intacto
ratón	C3a	Hycult (HM2073)	conejo	C3d	Abcam (ab15981)	reacciona de forma cruzada con C3b/iC3b+
ratón	C3a	Hycult (HM2074)	conejo	C3d	Abcam (ab15981)	sin lecturas positivas
pollo	C3a	Abcam (ab48580)	conejo	C3d	Abcam (ab15981)	sin lecturas positivas
ratón	C3a	Hycult (HM2073)	pollo	C3a	Abcam (ab48580)	sin lecturas positivas
ratón	C3a	Quidel (A203)	pollo	C3a	Abcam (ab48580)	sin lecturas positivas
pollo	C3a	Abcam (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 (sc17237)	cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	similar a HM2073, mejor en suero diluido
conejo	C3d	Abcam (ab15981)	ratón	C3a	Quidel (A203)	cuando anti-C3d es Ab de captura, también se une a C3b y iC3b, lo que evita la unión eficiente de C3 intacto cuando se analizan muestras mixtas.
conejo	C3d	Abcam (ab15981)	pollo	C3a	GenTex (GTX78198)	
conejo	C3d	Abcam (ab15981)	cabra	C3a	SantaCruz (sc17237)	
conejo	C3d	Abcam (ab15981)	pollo	C3a	Abcam (ab48580)	
conejo	C3d	Abcam (ab15981)	ratón	C3a	Hycult (HM2073)	
conejo	C3d	Abcam (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)	reactividad cruzada con C3b/C3c a alta conc.
ratón	iC3b	AbD serotec (MCA2607)	conejo	C3d	Abcam (ab15981)	menor intensidad de señal que usando anti-C3
ratón	iC3b	Quidel (A209)	conejo	C3d	Abcam (ab15981)	menor intensidad de señal que usando anti-C3
ratón	iC3b	Quidel (A209)	rata	C3d	Hycult (HM2198)	buena señal, menor que usando anti-C3
ratón	iC3b	Quidel (A209)	rata	C3g	Hycult (HM2199)	Sin señal
ratón	iC3b	Quidel (A209)	ratón	neo C3d	Quidel (A250)	menor intensidad de señal que usando HRP-anti C3, mejor especificidad que usando anti-C3d
rata	iC3b	Hycult (HM2199)	cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	buena señal
rata	iC3b	Hycult (HM2199)	ratón	C3 activo	Hycult (HM2168)	señal débil
rata	iC3b	Hycult (HM2199)	ratón	C3 activo	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	C3 activo	Hycult (HM2168)	cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	demasiada interferencia con señal débil de C3
ratón	C3 activo	Hycult (HM2168)	rata	C3g	Hycult (HM2199)	
ratón	C3 activo	Hycult (HM2257)	cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	sin señal sin señal
ratón	C3 activo	Hycult (HM2257)	rata	C3g	Hycult (HM2199)	
ratón	C3 alfa	Meridian (H54189M)	cabra	C3	MP Biomedicals (55237)	Sin señal
ratón	neo C3d	Quidel (A250)	rata	C3g	Hycult (HM2199)	señal muy baja

En una forma de realización ejemplar, el marcador puede ser C3 intacto y el anticuerpo de detección se une a un primer epítipo de C3 intacto, en el que el primer epítipo es un dominio C3a que está presente en C3 intacto y que se pierde tras la activación de C3. En una forma de realización adicional, el marcador es C3 intacto y el anticuerpo de captura se une a un segundo epítipo en C3, en el que el segundo epítipo es una región en el dominio C3d que está presente en C3 intacto, C3b, iC3b y C3d. Véase la Figura 3(A).

En otra forma de realización ejemplar, el marcador puede ser iC3b y el anticuerpo de detección se une a un primer epítipo de iC3b, en el que el primer epítipo es un neoepítipo en iC3b que se revela cuando C3b se desactiva en iC3b y que se ocluye cuando iC3b se degrada además en C3c y C3d. En una forma de realización adicional, el marcador es iC3b y el anticuerpo de captura se une a un segundo epítipo en iC3b, en el que el segundo epítipo es un neoepítipo presente solo en C3b, iC3b y C3dg. Véase la Figura 3(B).

En un ejemplo 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 específico, el marcador es iC3b, el anticuerpo de captura es Quidel® A209 y el anticuerpo de detección es Quidel® A250.

Un experto en la técnica apreciará que son adecuados diversos analitos de control para su uso en los métodos de la presente invención para proporcionar una verificación de que el ensayo se completó con éxito. En una forma de realización, el analito de control es IgG.

- 5 Otra ventaja de los métodos instantáneos es evitar la activación sustancial del complemento en la muestra en virtud de la propia prueba, lo que puede conducir a resultados de falsos positivos. Es bien sabido que C3 es una proteína delicada capaz de autoactivarse debido a la manipulación, almacenamiento y contacto de las muestras con materiales o sustancias extrañas. Por lo tanto, la naturaleza de C3 puede llevar a falsos positivos en los ensayos ELISA tradicionales y de turbidez para la activación del complemento que implican un manejo extenso de la muestra
- 10 y múltiples etapas. Los métodos instantáneos evitan dichos falsos positivos al reducir y/o eliminar las etapas de preparación y manejo de la muestra, particularmente cuando se usan en el contexto de un ensayo de flujo lateral, por ejemplo. Por consiguiente, en una forma de realización de los métodos, el complemento en la muestra de fluido corporal no se activa sustancialmente de manera experimental mediante un inmunoensayo de flujo lateral.
- 15 En algunas formas de realización de los presentes métodos, es deseable tener un inmunoensayo de flujo lateral que pueda detectar más de un marcador de activación del complemento en un solo ensayo. Por ejemplo, puede ser muy deseable un inmunoensayo de flujo lateral dual que pueda detectar cualitativamente y cuantitativamente tanto C3 intacto como iC3b en la misma alícuota de un fluido corporal. Por lo tanto, en otra forma de realización, se proporciona un inmunoensayo de flujo lateral para la detección en el punto de atención de marcadores de activación
- 20 del complemento en una muestra de fluido corporal que comprende proteínas del complemento, comprendiendo el inmunoensayo de flujo lateral: una tira de membrana; un primer anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de C3 intacto; una primera línea de prueba que comprende un primer anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo del C3 intacto; un segundo anticuerpo de detección que se une a un primer epítipo de iC3b; una segunda línea de prueba que comprende un segundo anticuerpo de captura que se une a un segundo epítipo de
- 25 iC3b; y al menos una línea de control que comprende un anticuerpo que se une a un analito de control.

En algunas formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo de detección comprenden una etiqueta que proporciona una señal. Son adecuadas diversas etiquetas para su uso en los presentes métodos divulgados. En algunas formas de realización, la etiqueta es oro coloidal.

- 30 De acuerdo con varios aspectos de la invención, el complemento en la muestra no se activa sustancialmente de manera experimental mediante el inmunoensayo de flujo lateral.

- 35 En algunas formas de realización, el primer anticuerpo de detección se une a un primer epítipo de C3 intacto, en el que el primer epítipo de C3 intacto es un dominio C3a que está presente en C3 intacto y que se pierde tras la activación de C3.

- 40 En otras formas de realización, el primer anticuerpo de captura se une a un segundo epítipo de C3 intacto, en el que el segundo epítipo es una región en el dominio C3d que está presente en C3 intacto, C3b, iC3b y C3dg.

- 45 En otras formas de realización, el segundo anticuerpo de detección se une a un primer epítipo de iC3b, en el que el primer epítipo de iC3b es un neopítipo en iC3b que se revela cuando C3b se desactiva en iC3b y que se ocluye cuando iC3b se degrada aún más en C3c y C3d.

- 50 En aún otras formas de realización, el segundo anticuerpo de captura se une a un segundo epítipo de iC3b, en el que el segundo epítipo de iC3b es un neopítipo presente solo en C3b, iC3b y C3dg.

En otras formas de realización más, los anticuerpos que se unen a C3 intacto y los anticuerpos que se unen a iC3b no tienen sustancialmente reactividad cruzada.

- 50 De acuerdo con varias formas de realización, las etapas de detección y comparación se pueden realizar en 30 minutos o menos.

EJEMPLOS

- 55 Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Clasificación de pacientes

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

La prueba se utiliza para medir la gravedad de la lesión a los 15, 30 o 60 minutos de la lesión. Es más útil para pacientes que pueden haber sufrido lesiones que no son obvias por inspección visual. Se extrae una gota de sangre de una línea arterial (línea A) o punción digital. Se extrae una muestra de 10 µl con una pipeta de volumen fijo. Después, la muestra se mezcló con 990 µl de tampón de muestra. La sangre y el tampón de la muestra se mezclan. Usando un bulbo de pipeta de volumen fijo, se extraen 100 µl y se añaden por pipeteo en el casete de inmunoensayo de flujo lateral que contiene las tiras de ensayo integradas de C3 intacto e iC3b. Como alternativa, se pueden aplicar 100 µl para separar los casetes de ensayo de flujo lateral de C3 intacto e iC3b. Después de 10 minutos, pero antes de 40 minutos, el casete se lee y los resultados se registran, preferiblemente de forma electrónica por un lector. Si la primera lectura tiene un nivel de iC3b (o una relación equivalente de iC3b:C3 intacto) superior a 50 µg/ml en sangre, existe evidencia de activación del complemento y alta inflamación. El personal asume lesiones graves y alerta al personal de emergencias. De lo contrario, se toma una segunda lectura 5 minutos más tarde. Si el nivel de iC3b (o la relación equivalente de iC3b:C3 intacto) es superior a 50 µg/ml en sangre o si el nivel de iC3b ha aumentado en más del 25%, se supone que el paciente tiene una lesión grave y se alerta al personal de emergencias. Un aumento menor o ningún aumento es sugestivo, pero no concluyente, de lesiones menos graves.

Ejemplo 2**25 Supervisión de la trayectoria de un paciente de traumatismo**

Al inicio del turno, el personal de la UCI realiza una curva estándar utilizando 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml y 1000 ng/ml de los estándares de C3 intacto e iC3b. Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral se leen con un lector electrónico después de 20 minutos.

El objetivo de la supervisión de la trayectoria es detectar cambios en el estado inflamatorio e inmune de pacientes que se han estabilizado después de un traumatismo grave. En este ejemplo, se debe detectar la dificultad respiratoria causada por neumonía o disfunción inflamatoria. El perfil esperado del paciente es aquel que tiene una puntuación de gravedad de la lesión (ISS) igual o mayor a 16 y que requiere asistencia por ventilador para respirar.

El paciente recibe una prueba del complemento a intervalos frecuentes, que se alinea con los puntos de tiempo para analizar los niveles de glucosa en sangre. Este intervalo entre las pruebas suele ser de aproximadamente dos horas. La sangre se recoge utilizando el mismo método que para la prueba de glucosa, ya sea mediante una línea A o con punción digital. Se extrae una muestra de 10 µl con una pipeta de volumen fijo. Después, la muestra se mezcló con 990 µl de tampón de muestra. La sangre y el tampón de la muestra se mezclan. Usando un bulbo de pipeta de volumen fijo, se extraen 100 µl y se añaden por pipeteo en el casete de LFA que contiene casetes de inmunoensayo de flujo lateral de C3 intacto e iC3b integrados. Como alternativa, se pueden aplicar 100 µl para separar los casetes de C3 intacto e iC3b. El casete o casetes se colocarán en el lector junto a la cama del paciente. El lector está configurado para tomar una lectura después de 20 minutos. Los datos se recopilan y los valores de iC3b, C3 intacto e iC3b:(C3 intacto) se registran en cada punto de tiempo.

Los cambios en los niveles de C3 intacto o iC3b a lo largo del tiempo o los cambios en la tasa de cambio pueden indicar un cambio en el estado inflamatorio. Un aumento brusco en iC3b, acompañado por un descenso en C3 intacto, indica una dificultad respiratoria inminente. Como siguiente curso de acción, un médico realiza un lavado broncoalveolar (BAL) en el paciente para determinar si el paciente está experimentando VAP. Si las bacterias están presentes en niveles de 104 por ml o más, se indica VAP y el paciente recibe tratamiento con antibióticos. De lo contrario, se asume una disfunción inflamatoria no infecciosa y el paciente puede ser tratado con agentes antiinflamatorios y/o inhibidores del complemento. El paciente también puede tener ajustada la configuración del ventilador.

Ejemplo 3

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

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

5

La prueba se utiliza para medir la gravedad inicial de la enfermedad, así como la eficacia de la terapia. Uno de los diagnósticos estándar realizados en pacientes con SLE es la medición de los niveles totales de C3. Los niveles de C3 normalmente están deprimidos en pacientes con SLE y vuelven a la normalidad (>1 mg/ml) después de un tratamiento exitoso. Sin embargo, en general no se sabe si la activación de C3 ha sido suprimida o solo se ha

10 ralentizado lo suficiente como para permitir que los mecanismos normales de reposición restauren los niveles de C3 a la normalidad.

En cada visita al médico, se recoge sangre de un paciente para las pruebas de C3 total, C3 intacto e iC3b. Solo se requiere una gota para las 3 pruebas combinadas. La sangre se recoge mediante punción digital a menos que se

15 extraiga sangre para otras pruebas, en cuyo caso, la sangre provendrá de esa fuente. Se extrae una muestra de 10 µl con una pipeta de volumen fijo. Después, la muestra se mezcló con 990 µl de tampón de muestra. La sangre y el tampón de la muestra se mezclan. Con un bulbo de pipeta de volumen fijo, se extraen 100 µl y se añaden por pipeteo en el casete de LFA que contiene un casete de flujo lateral integrado que mide el C3 total, el C3 intacto y el iC3b. Como alternativa, se pueden aplicar 100 µl a casetes separados para cada ensayo. El casete o casetes se

20 colocan en el lector en el consultorio del médico. El lector está configurado para tomar una lectura después de 20 minutos.

Los datos se recogen en cada visita al 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 lo que ahora es

25 posible. La nueva información estará disponible en el momento en que el especialista consideraría estable el estado 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 subyacente de la enfermedad sigue siendo muy activo y el especialista puede optar por ajustar aún más la terapia aumentando las dosis de fármacos antiinflamatorios o añadiendo medicación adicional.

30

Ejemplo 4

Determinación de los niveles basales de C3 intacto e iC3b en el líquido lagrimal basal de un individuo sano durante un periodo de 24 horas.

35

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

40 Para determinar los niveles de C3 intacto e iC3b en el ojo de un individuo sano, se tomaron tres lecturas en total. Las muestras se recogieron y se evaluaron en el Tiempo = 0 horas, 12 horas y 24 horas.

Para la recogida de lágrimas, se tira hacia atrás del párpado inferior y se seca brevemente con un Kimwipe® en la parte inferior del ojo. El Kimwipe® se corta rápidamente donde se recogió la lágrima, dejando unos milímetros de

45 borde seco rodeando el punto de la lágrima. La muestra de lágrima del Kimwipe® se coloca luego en 220 µl de tampón de diluyente BioAssay Works y se agita vorticialmente 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 µl de muestra a cada inmunoensayo de flujo lateral (C3 intacto e iC3b) y se analizan.

50 Para el análisis, cada casete se inserta en el lector y se lee después de 20 minutos.

Los resultados variaron entre 50-60 µg/ml de C3 intacto y entre 5-8 µg/ml de iC3b (véase la Figura 15).

Ejemplo 5

55

Determinación de los niveles basales de C3 intacto e iC3b en dos individuos sanos en un solo punto de tiempo

Antes de analizar la primera muestra de ensayo, se realiza una curva estándar utilizando 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100

ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml y 3000 ng/ml de los 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 de reposo de C3 intacto e iC3b se recogen de dos donantes sanos. El lector de inmunoensayo de flujo lateral se enciende. Dedo se limpia con un hisopo con alcohol. El dedo se pincha con una lanceta y se aprieta suavemente para recoger 10 µl de sangre usando el tubo MICROSAFE® por acción capilar. La muestra de sangre se expulsó directamente a un tubo lleno de 990 µl de tampón de ensayo de muestra y luego se tapó y se mezcló por inversión 6-8 veces. Se transfirieron 100 µl de la mezcla de muestra de sangre a una prueba CompAct de C3 intacto usando la pipeta de volumen exacto de 100 µl. Después, una segunda mezcla de 100 µl de muestra de sangre se transfirió a la prueba CompAct de iC3b utilizando una pipeta de volumen exacto de 100 µl. El temporizador se configuró para leer después de 20 minutos ambas pruebas.

Se determinó que los resultados del primer paciente eran aproximadamente 500 µg/ml para C3 intacto y 200 ng/ml para iC3b. Esto indica que hay una relación de 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 valores están dentro de los intervalos normales esperados. Los valores de iC3b están en el intervalo inferior de lo que se considera normal.

Ejemplo 6

Determinación de los niveles basales de C3 intacto e iC3b en un individuo sano en un solo punto de tiempo después de un ejercicio intenso

Usando el protocolo anterior del Ejemplo 5, uno de los individuos sanos se analizó de nuevo después de un ejercicio intenso (véase la Figura 18). El esfuerzo no alteró significativamente los niveles de iC3b o C3.

Ejemplo 7

Interferencia entre los anticuerpos de C3 intacto e iC3b en los inmunoensayos de flujo lateral

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 luego se añadieron por pipeteo 0,1 ml en el casete. Las lecturas se tomaron a los 20 minutos. El resultado del lector se convirtió a la concentración de iC3b usando una curva estándar generada de 10 ng/ml a 100.000 ng/ml. Se restó el fondo de un casete ejecutado solo con tampón. Las contribuciones fraccionarias se calcularon restando la concentración real de iC3b (de la prueba de iC3b sin C3 añadido) de la concentración aparente de iC3b en cada punto y luego normalizando frente a las concentraciones reales de iC3b. Véase la Figura 14. Para los casetes H08K-01, con la concentración más alta de C3 ensayada, aproximadamente la mitad de la señal de iC3b provino de C3 intacto y la mitad de iC3b real. Para la versión J24K03, aproximadamente cuatro veces más la señal de iC3b provino de la interferencia de C3 intacto que de iC3b real. Aunque estos pares de anticuerpos funcionan bien en los ensayos ELISA, presentan interferencias significativas cuando se usan en inmunoensayos de flujo lateral para los mismos analitos. En 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.

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 prueba. H08K-01 tiene anti-iC3b monoclonal de ratón en el conjugado de oro y Anti-C3 policlonal en la línea de prueba.

Ejemplo 8

Generación de la curva estándar de iC3b para inmunoensayos de flujo lateral

Una forma de realización de la invención comprende una tira de ensayo de flujo lateral sin las carcassas del casete. Estas tiras tenían un anticuerpo monoclonal anti-iC3b (Quidel® A209) conjugado con el oro y el anticuerpo anti-C3 (MP Biomedical® 55237) conjugado con la tira. Las curvas estándar se muestran en la Figura 11(A). Las curvas estándar indicaron un rango lineal de aproximadamente 10 veces y una sensibilidad de aproximadamente 100 ng/ml. Otra forma de realización de la invención configura las tiras para su uso en un casete que permite la aplicación controlada de la muestra a la tira de ensayo. Esto mejoró la reproducibilidad entre ensayos, aunque todavía hay una considerable dependencia del tiempo en el ensayo. Los resultados de la curva estándar se muestran en la Figura

11(B). Una tercera forma de realización aumenta la concentración de anticuerpo de 0,5 mg/ml a 1 mg/ml aplicado sobre el conjugado de oro y elimina BSA del tampón de absorción. Los resultados de la curva estándar se muestran en la Figura 11(C).

5 Las curvas estándar se generan como se describe en el ejemplo 9 a continuación.

Ejemplo 9

Generación de la curva estándar de iC3b para inmunoensayos de flujo lateral

10

Se diluyeron diez (10) µl de una solución madre de iC3b (concentración 1 mg/ml) en 990 µl de tampón de dilución de muestra para crear 10 µg/ml de solución madre de trabajo utilizando un tubo tapado de 2 ml. Se mezcló el tubo por inversión lentamente 10-12 veces. El investigador diluyó 500 µl de 10 µg/ml de solución madre en 500 µl de tampón BAW para crear una solución madre de 5 µg/ml en otro tubo tapado de 2 ml. La mezcla se realizó invirtiendo lentamente el tubo 10-12 veces. La dilución 1:1 (500 µl:500 µl) se repitió, como se ha descrito anteriormente, nueve veces más para crear las siguientes soluciones madre de trabajo: 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/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 solo).

15

Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral (LFA) se prepararon etiquetándolos y se distribuyeron en grupos de tres. Para cada dilución, el investigador añadió por pipeteo 100 µl de la primera solución madre de trabajo (10 µg/ml para C3 intacto y 5 µg/ml para iC3b) en el puerto de muestra del 1^{er} LFA. Para cada concentración, el investigador esperó 20 segundos antes de cargar 100 µl de la misma solución madre de trabajo en el 2^o LFA. Los casetes se leyeron después de 10, 20 y 30 minutos usando el lector de BioAssay Works LFDR 101 (Forsite Diagnostics) usando la configuración de la línea de prueba seguida de la configuración de la línea de control y los datos registrados.

25

Una vez finalizado el experimento, los datos se representaron utilizando el software GraphPad Prism 5. La curva estándar se ajusta a la ecuación logística de tres parámetros: $Y = \text{Interior} + (\text{Superior-Inferior})/(1+EC50/X)$. Véase la Figura 12.

Ejemplo 10

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

Se diluyeron diez (10) µl de una solución madre de intacto (concentración 1 mg/ml) en 990 µl de tampón de dilución de muestra para crear 10 µg/ml de solución madre de trabajo utilizando un tubo tapado de 2 ml. Se mezcló el tubo por inversión lentamente 10-12 veces. El investigador diluyó 500 µl de 10 µg/ml de solución madre en 500 µl de tampón BAW para crear una solución madre de 5 µg/ml en otro tubo tapado de 2 ml. La mezcla se realizó invirtiendo lentamente el tubo 10-12 veces. La dilución 1:1 (500 µl:500 µl) se repitió, como se ha descrito anteriormente, nueve veces más para crear las siguientes soluciones madre de trabajo:

40

10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/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 solo).

Los casetes de LFA se prepararon etiquetándolos y se distribuyeron en grupos de tres. Para cada dilución, se añadieron por pipeteo 100 µl de la primera solución madre de trabajo (10 µg/ml para C3 intacto y 5 µg/ml para iC3b) en el puerto de muestra del 1^{er} LFA. Para cada concentración, el investigador esperó 20 segundos antes de cargar 100 µl de la misma solución madre de trabajo en el 2^o LFA. Los casetes se leyeron después de 10, 20 y 30 minutos usando el lector de BioAssay Works LFDR 101 (Forsite Diagnostics) usando la configuración de la línea de prueba seguida de la configuración de la línea de control y los datos registrados.

50

Una vez finalizado el experimento, los datos se representaron utilizando el software GraphPad Prism 5. La curva estándar se ajusta a la ecuación logística de tres parámetros: $Y = \text{Interior} + (\text{Superior-Inferior})/(1+EC50/X)$. Véase la Figura 13.

Ejemplo 11

Forma de realización de un procedimiento de ensayo de flujo lateral CompAct™

La Figura 21 representa una forma de realización ejemplar de un inmunoensayo de formato de flujo lateral.

Inicialmente, el dedo de un paciente se limpia con un algodón con alcohol y el dedo se pincha con una lanceta. Después se aprieta el dedo para facilitar la presentación de la sangre, que luego se recoge en un tubo Microsafe™. La sangre se expulsa del tubo Microsafe™ directamente a un puerto de muestra de un casete de prueba CompAct™. A continuación, se añaden tres gotas de tampón de ensayo en el puerto de muestra para mezclar y diluir la muestra de sangre. Las muestras se dejan reposar durante un periodo de tiempo, por ejemplo, de 15 a 20 minutos. Si se desea, se puede extraer una segunda muestra de sangre como se describe, y después la muestra se introduce en un segundo casete de prueba CompAct™ ("B"). En algún momento en o antes del final del periodo de tiempo deseado, cada casete de prueba puede inspeccionarse visualmente para asegurarse de que la línea de control sea fácilmente visible y que el frotis de la muestra no cause un problema en la lectura de los datos. Una vez ha transcurrido el periodo de tiempo deseado, cada casete de prueba puede introducirse en un dispositivo de lectura para capturar datos de cada prueba, por ejemplo, como se muestra en la Figura 21. También se muestran en la Figura 21 bocetos conceptuales de los procedimientos de limpieza y extracción de muestras, así como fotografías de casetes de prueba y un lector de prueba contemplado dentro del alcance de la presente invención.

15 Ejemplo 12

Sensibilidad de la forma de realización del ensayo de flujo lateral CompAct™ para C3 humano

Se diluyeron diez (10) µl de una solución madre de proteína C3 humana purificada (Complement Technology, Inc., N.º A113, concentración 1 mg/ml) en 990 µl de tampón de diluyente de muestra (BioAssay Works, ISOT-003) para crear 10 µg/ml de solución madre de trabajo en un tubo tapado de 2 ml. La solución madre de trabajo se mezcló por inversión lentamente 10-12 veces. El investigador diluyó 500 µl de 10 µg/ml de solución madre en 500 µl de tampón BAW para crear una solución madre de 5 µg/ml en otro tubo tapado de 2 ml. La mezcla se realizó invirtiendo lentamente el tubo 10-12 veces. La dilución 1:1 (500 µl:500 µl) se repitió, como se ha descrito anteriormente, nueve veces más para crear las siguientes soluciones madre de trabajo: 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/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 solo).

Los casetes de ensayo de flujo lateral (LFA) se prepararon etiquetándolos y se distribuyeron en grupos de tres. Cada conjunto de pruebas por triplicado se fotografió (Nikon D80 con lente Micro Nikkor AF de 60 mm), y las imágenes se reunieron en una sola imagen utilizando la aplicación Paint. Las fotografías de cada réplica se pueden ver en la Figura 22.

Para cada dilución, se añadieron por pipeteo 100 µl de la primera solución madre de trabajo (10 µg/ml para C3 intacto y 5 µg/ml para iC3b) en el puerto de muestra de un primer LFA. Para cada concentración, el investigador esperó 20 segundos antes de cargar 100 µl de la misma solución madre de trabajo en el 2º LFA. Los casetes se leyeron después de 10, 20 y 30 minutos usando el lector de BioAssay Works LFDR-001 (Forsite Diagnostics) usando la configuración de la línea de prueba seguida de la configuración de la línea de control y los datos registrados. El valor de Sandwich para cada punto de tiempo se calculó como un porcentaje: $\frac{[\text{Línea de prueba}]}{[\text{Línea de control}]} \times 100\%$ y los resultados se muestran en la Figura 23. La evaluación de la variabilidad de los ensayos utilizados en este ejemplo se calculó y se muestra en la Figura 24.

Ejemplo 13

Sensibilidad de la forma de realización del ensayo de flujo lateral CompAct™ para iC3b humano

Se diluyeron diez (10) µl de una solución madre de proteína iC3b humana purificada (Complement Technology, Inc., N.º A115, concentración 1 mg/ml) en 990 µl de tampón de diluyente de muestra (BioAssay Works, ISOT-003) para crear 10 µg/ml de solución madre de trabajo en un tubo tapado de 2 ml. La solución madre de trabajo se mezcló por inversión lentamente 10-12 veces. El investigador diluyó 500 µl de 10 µg/ml de solución madre en 500 µl de tampón BAW para crear una solución madre de 5 µg/ml en otro tubo tapado de 2 ml. La mezcla se realizó invirtiendo lentamente el tubo 10-12 veces. La dilución 1:1 (500 µl:500 µl) se repitió, como se ha descrito anteriormente, nueve veces más para crear las siguientes soluciones madre de trabajo: 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/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 solo).

Los casetes de inmunoensayo de flujo lateral (LFA) se prepararon etiquetándolos y se distribuyeron en grupos de tres. Cada conjunto de pruebas por triplicado se fotografió (Nikon D80 con lente Micro Nikkor AF de 60 mm), y las imágenes se reunieron en una sola imagen utilizando la aplicación Paint. Las fotografías de cada réplica se pueden ver en la Figura 25.

Para cada dilución, el investigador añadió por pipeteo 100 µl de la primera solución madre de trabajo (10 µg/ml para C3 intacto y 5 µg/ml para iC3b) en el puerto de muestra del 1^{er} LFA. Para cada concentración, el investigador esperó 20 segundos antes de cargar 100 µl de la misma solución madre de trabajo en el 2^o LFA. Los casetes se leyeron después de 10, 20 y 30 minutos usando el lector de BioAssay Works LFDR-001 (Forsite Diagnostics) usando la configuración de la línea de prueba seguida de la configuración de la línea de control y los datos registrados. El valor de Sandwich para cada punto de tiempo se calculó como un porcentaje: [Línea de prueba]/[Línea de control] x 100% y los resultados se muestran en la Figura 26.

10 Ejemplo 14

Evaluación de C3 e iC3b nativos humanos utilizando una forma de realización de ensayo de flujo lateral

La sangre entera se recogió mediante una punción digital usando una lanceta de seguridad (Fisher Healthcare, 02-675-160) y se transfirió a través de una pipeta a un tubo de 2 ml. A continuación, se diluyeron inmediatamente 30 µl de sangre en 270 µl de tampón de diluyente de muestra (BioAssay Works, ISOT-003) en un tubo de 2 ml separado, y se aplicaron 100 µl de la dilución de sangre 1:10 al LFA de iC3b. La dilución de la sangre 1:10 se diluyó adicionalmente en tampón de diluyente de muestra hasta una concentración final de 1:3162, y se aplicaron 100 µl al LFA de C3. Las líneas de Prueba y Control se leyeron para cada prueba a los 20 y 30 minutos utilizando un lector (Forsite, N.º LFDR-001) y se ejecutaron muestras por triplicado para cada punto de datos. La concentración estimada de C3 nativo e iC3b se derivó utilizando el valor de Sandwich para la muestra y la curva estándar para el ensayo particular. Los datos para estos ensayos se muestran en la Figura 27.

Ejemplo 15

25

Evaluación de los niveles de C3 humano a partir de muestras de sangre entera, plasma y suero humanos

Este estudio analizó muestras de donantes humanos de sangre entera, plasma y suero para determinar los niveles de C3 nativo y los niveles de iC3b. Se tomaron muestras de tres donantes en tres puntos de tiempo diferentes durante un periodo de una semana los días 1, 2 y 5. Los procedimientos utilizados para extraer las muestras e introducirlas en los casetes fueron sustancialmente como se describe en el Ejemplo 11. Se analizaron las muestras de sangre entera inmediatamente después de la extracción mediante una prueba de ensayo de flujo lateral CompAct™, mientras que las muestras de plasma y suero se prepararon y se analizaron a través de una prueba de ensayo de flujo lateral CompAct™ o un ensayo ELISA estándar.

35

Para las muestras analizadas con un ensayo de flujo lateral CompAct™, se prepararon plasma-EDTA y suero a partir de sangre entera fresca de acuerdo con los protocolos del fabricante (Becton, Dickinson and Company) y se congelaron en partes alícuotas a -80°C. Las alícuotas se descongelaron en hielo y se analizaron mediante el ensayo CompAct™. Las concentraciones estimadas de iC3b se derivaron de curvas estándar de proteínas purificadas.

40

Para las muestras analizadas en un ensayo ELISA estándar, se utilizaron los siguientes procedimientos. Primero, se recubrieron placas de 96 pocillos utilizando 50 µl de anticuerpo monoclonal diluido a 2 µg/ml en 1x PBS. Para los ensayos ELISA C3 humanos, las placas Immulon 4HBX (Thermo Scientific, 3855) se recubrieron con anticuerpo monoclonal C3/C3a antihumano de ratón (Cell Sciences, HM2075). Para los ensayos ELISA de iC3b humanos, las placas Immulon 1B de 96 pocillos (Thermo Scientific, 3355) se recubrieron con anticuerpo monoclonal anti-iC3b humano (Quidel, A209). Las placas de ELISA se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 1-2 horas. El líquido que contenía el anticuerpo monoclonal se desechó y cada pocillo se lavó dos veces con IX PBS-Tween al 0,05% (PBS-T). A continuación, los pocillos se bloquearon con 200 µl de tampón StartingBlock (Thermo Scientific, 37538) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después, el tampón se descartó y las células se lavaron tres veces con IX PBS-T. Los estándares de proteína purificada se diluyeron en IX PBS a una concentración de 1 µg/ml en una placa de microtitulación separada (Thermo Fisher N.º 9205). El estándar C3 humano utilizado fue de Complement Technology, Inc (N.º A113) y el estándar iC3b humano usado también fue de Complement Technology, Inc. (N.º A115). Cada estándar se diluyó entonces en serie utilizando volúmenes iguales de IX PBS.

55 Cada muestra de plasma y suero se preparó a partir de sangre entera como se ha descrito anteriormente, y luego se diluyó 1:20 en IX PBS en la placa de microtitulación separada y después se diluyó en serie utilizando IX PBS. Después, se transfirieron 50 µl de cada muestra diluida al pocillo apropiado de la placa ELISA y se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora. Después, el líquido se descartó y cada pocillo se lavó seis veces con IX PBS-T. Se diluyeron 1:2000 cincuenta (50) µl de anti-C3-HRP de cabra (MP Biomedicals, n.º 55237) en tampón

StartingBlock y se añadieron a cada pocillo de la placa ELISA. Las muestras se incubaron entonces durante una hora a temperatura ambiente. El líquido se descartó después y cada pocillo se lavó seis veces con IX PBS-T. Se añadieron cincuenta (50) ul de una mezcla 1:1 de sustrato de peroxidasa de rábano picante TMB (Thermo Fisher n.º 1854060 y n.º 1854050) a cada pocillo. Después de tres minutos, se añadieron 25 ul de H₂SO₄ 1 M a cada pocillo para detener la reacción. Después se analizó la placa ELISA utilizando un lector de placas BMG Labtech POLARstart Omega a 450 nm. Los resultados de estos experimentos se pueden ver en las Figuras 28 y 29.

La Figura 28 muestra que los niveles de proteína C3 humana evaluados utilizando una forma de realización de ensayo de flujo lateral CompAct™ de la invención generalmente coinciden con los niveles observados en la bibliografía que se generaron utilizando métodos ELISA.

La Figura 29 muestra que los niveles de proteína iC3b detectados en muestras de plasma y suero varían significativamente entre la forma de realización del ensayo de flujo lateral CompAct™ y los métodos ELISA conocidos previamente. Los datos mostrados en (A), (B) y (C) se muestran como gráficos de barras por donante, mientras que los datos en (D) se muestran numéricamente en una tabla. Este fue un resultado sorprendente que destaca las ventajas de los métodos y ensayos de la presente invención. Sin desear limitarse a una teoría particular, los solicitantes proponen que los niveles significativamente más bajos de iC3b analizados utilizando el ensayo CompAct pueden deberse a las rápidas velocidades a las que se generan los datos en comparación con los métodos ELISA mucho más lentos y más numerosos. Es posible que acortar los tiempos de reacción no permita que los factores en una muestra actúen y potencialmente activen las proteínas del complemento. El aumento en el número de etapas de manipulación y manejo requeridas por el ELISA también puede contribuir a estos resultados de una manera similar, por ejemplo, facilitando la interacción entre C3 intacto y los agentes de activación.

Esta hipótesis se apoya como se muestra en la Figura 30, donde resulta evidente que cuando se usan muestras purificadas de iC3b, tanto las pruebas CompAct™ como las pruebas ELISA producen datos similares. Sin embargo, cuando se utilizan muestras derivadas de fluidos corporales, el resultado varía significativamente. Independientemente del mecanismo detrás de los resultados, una diferencia tan grande en los niveles detectados de iC3b en la misma muestra puede conducir fácilmente a diagnósticos clínicos erróneos, destacando una de las ventajas de las formas de realización de la presente invención.

Ejemplo 16

El efecto del tiempo en los niveles detectados de iC3b

En un esfuerzo por evaluar los efectos del tiempo en los niveles de iC3b detectados en muestras expuestas a temperatura ambiente usando el ensayo CompAct™, las muestras diluidas de sangre entera, plasma y suero obtenidas en el Ejemplo 15 se volvieron a ensayar después de cuatro horas de tiempo a temperatura ambiente. Otros métodos y condiciones de ensayo fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 15 y los datos se muestran en la Figura 31. Los datos muestran claramente que hay un aumento de aproximadamente 100 veces los niveles de iC3b en cada muestra debido al paso del tiempo a temperatura ambiente. Este efecto previamente desconocido indica fuertemente que los aumentos sustanciales en los niveles de iC3b tienen lugar rápidamente a temperatura ambiente. Esto resalta aún más una ventaja de las formas de realización de la presente invención y los posibles datos falsos generados por métodos anteriores, incluidos los ensayos ELISA, que requieren horas para generar datos.

En un esfuerzo por conseguir una mejor resolución en términos de los aumentos de activación de C3 a lo largo del tiempo en diversas muestras, se evaluaron alícuotas de sangre entera, plasma y muestras de suero obtenidas en el Ejemplo 15 anterior en diferentes puntos de tiempo para determinar la rapidez con que puede observarse la activación de C3.

La Figura 32 muestra los niveles de iC3b detectados utilizando una forma de realización de ensayo CompAct™ de la invención en muestras de sangre entera en comparación con muestras que contienen estándares de proteína iC3b purificada. Las muestras se analizaron después de 5, 10, 15 o 20 minutos de exposición a temperatura ambiente y los ensayos se realizaron sustancialmente como se describe en el ejemplo 15. (A) muestra que se pueden detectar algunos aumentos en iC3b en sangre entera después de solo 5 minutos la temperatura ambiente, y la magnitud de este aumento parece acelerarse con el tiempo, como puede verse por la pendiente creciente de los datos en (B), (C) y (D).

La Figura 33 muestra la diferencia en los niveles de iC3b detectados en una forma de realización de ensayo CompAct™ de la invención después de una exposición de 5 minutos o 60 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de plasma y suero se obtuvieron y se prepararon como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 15. Como se puede ver en la Figura 33, el aumento en los niveles de iC3b detectado fue mucho más fuerte a los 60 minutos que a los 5 minutos. Además, e inesperadamente, los aumentos en los niveles de iC3b no parecen aumentar uniformemente con el tiempo, como lo demuestran las alteraciones significativas en la pendiente con el tiempo. Este fenómeno añade una capa adicional de complejidad al análisis adecuado de la activación del complemento y resalta aún más la importancia de minimizar el tiempo y el procesamiento del ensayo. Varias formas de realización de la presente invención abordan este problema previamente desconocido en la detección de la activación del complemento.

Ejemplo 17

Generación dependiente del tiempo de iC3b en plasma humano

En este ejemplo, el plasma humano de un donante sano se diluyó 1:10 en un tampón de diluyente de muestra y se ensayó inmediatamente mediante tiras de LFA de iC3b. El plasma diluido continuó incubándose a temperatura ambiente y se ensayó después de un tiempo de incubación adicional de 30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h y 72 h (3 días). Las líneas de prueba y control para cada punto de tiempo se leyeron por un lector (Forsite, N.º LFDR-001) 30 minutos después de la aplicación de la muestra al LFA. El valor de Sandwich se calculó como un porcentaje (línea de prueba/línea de control x 100%) después de restar la señal de la línea de prueba de una muestra de tampón solo (no se muestra). La Figura 34 muestra la activación dependiente del tiempo de iC3b en plasma, mostrando (A) las tiras reactivas después de la incubación y mostrando (B) los datos de acuerdo con lo leído por el lector Forsite. La gráfica de (B) se representa con horas en el eje X y el valor de Sandwich en el eje Y.

Ejemplo 18

Generación dependiente del tiempo de iC3b en plasma y suero humanos usando ELISA

En este ejemplo, como se muestra en la Figura 35, el plasma y el suero humanos de un donante sano se diluyeron en serie en tampón ELISA y se incubaron con pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-iC3b durante (A) 2 minutos o (B) 5 minutos antes de detener la incubación mediante extracción y lavado. Después, todos los pocillos se incubaron con anticuerpo policlonal anti-C3 conjugado con HRP para la detección. La proteína iC3b purificada también se diluyó y se incubó conjuntamente con las muestras de plasma y suero durante los tiempos indicados para generar una curva estándar para cada punto de tiempo como se muestra en la Figura 35. La concentración de iC3b en el suero diluido se derivó de la curva estándar correspondiente de iC3b para cada punto de tiempo.

Como se muestra en la Figura 35, (A) y (B), la activación de iC3b en plasma y suero humanos puede tener lugar muy rápidamente, incluso tan rápido como dos minutos en algunos casos. La activación de iC3b en suero humano fue particularmente fuerte en este ejemplo y destaca el efecto drástico que puede tener el tiempo en las muestras analizadas utilizando ensayos de tipo ELISA.

En otro experimento, el suero humano de un donante sano se diluyó en serie en tampón ELISA y se incubó con pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-iC3b durante los tiempos indicados antes de detener la incubación mediante extracción y lavado. Después, todos los pocillos se incubaron con anticuerpo policlonal anti-C3 conjugado con HRP para la detección. La proteína iC3b purificada también se diluyó y se incubó conjuntamente con el suero diluido durante los tiempos indicados para generar una curva estándar para cada punto de tiempo. La concentración de iC3b en el suero diluido se derivó de la curva estándar correspondiente de iC3b para cada punto de tiempo. La Figura 36 muestra los niveles relativos de iC3b detectados a lo largo del tiempo en estas muestras, con una duplicación de los niveles de iC3b mostrada en tan solo 15 minutos de incubación.

Ejemplo 19

Activación de C3 en ausencia de complejos de antígeno:anticuerpo

Después de recubrir los pocillos con anticuerpo anti-ovoalbúmina (no reconoce C3 ni iC3b) y el bloqueo con el tampón StartingBlock (Pierce 37538), el suero humano se diluyó en tampón Veronal (Lonza, 12-624E) en los pocillos y se dejó incubar durante 10 o 60 minutos +/- EDTA 10 mM. Después del lavado, los pocillos se incubaron durante 60 minutos con el anticuerpo policlonal anti-C3 conjugado con HRP para la detección utilizando una solución de

peróxido (Thermo Sci., 1854060) y el sustrato de peroxidasa TMB (Thermo Sci., 1854050). Los pocillos se leyeron para determinar la absorbancia a 450 nm.

La Figura 37 muestra que el C3 derivado del suero en este experimento se activó significativamente después de 10 minutos o 60 minutos de incubación en la placa recubierta con OVA. Sin desear quedar sujeto a una teoría específica, parece que esta activación es a través de una vía de activación sensible a EDTA. Cabe destacar que la deposición de C3 se produjo en los pocillos recubiertos con anticuerpo anti-ovoalbúmina en ausencia de ovoalbúmina, lo que demuestra que no se requiere un complejo de ovoalbúmina:anticuerpo contra ovoalbúmina para la activación y deposición de C3. Este resultado altamente inesperado significa que la deposición observada de C3 probablemente no tenga lugar a través de un fenómeno de captura tradicional que normalmente está asociado con un ensayo ELISA.

Ejemplo 20

15 Activación de C3 en ausencia de pocillos recubiertos con anticuerpo

Los pocillos se bloquearon con tampón StartingBlock (en ausencia de anticuerpo), el suero humano se diluyó en el tampón Veronal (Lonza, 12-624E) en los pocillos y se dejó incubar durante 10 o 60 minutos +/- EDTA 10 mM. Después del lavado, los pocillos se incubaron durante 60 minutos con el anticuerpo policlonal anti-C3 conjugado con HRP para la detección utilizando una solución de peróxido (Thermo Sci., 1854060) y el sustrato de peroxidasa TMB (Thermo Sci., 1854050). Los pocillos se leyeron para determinar la absorbancia a 450 nm.

La Figura 38 muestra que, aparentemente, el C3 derivado del suero humano se activa a través de una ruta sensible a EDTA y se deposita en pocillos bloqueados con tampón en ausencia de anticuerpo. Por lo tanto, no solo no se requiere un complejo de antígeno:anticuerpo para la activación y deposición de C3, como se muestra en el Ejemplo 19, sino que ni siquiera se requiere un anticuerpo para observar este fenómeno. Al igual que con el Ejemplo 19 anterior, este resultado altamente inesperado indica que la deposición de C3 observada no es un fenómeno de captura que normalmente se asocia con la inmunodetección ELISA.

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende las etapas de
5 detectar en una muestra de un sujeto un nivel de iC3b, en el que la detección implica una interacción específica entre el iC3b y un anticuerpo sin reactividad cruzada con respecto al mismo; y
comparar el nivel detectado con un nivel de referencia, cuyo nivel de referencia está dentro de un intervalo de 10 ng/ml a 5.000 ng/ml; en el que la determinación de que el nivel detectado está por encima del nivel de
10 referencia, indica que el sujeto padece o es susceptible a una activación del complemento patológica y/o no deseable, en el que las etapas de detección y comparación se realizan en 30 minutos o menos utilizando un ensayo de flujo lateral.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo sin reactividad cruzada está **caracterizado por que** una solución de 1 ug/ul de C3 produce una señal equivalente a menos de aproximadamente 1 ng/ml de
15 iC3b.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo sin reactividad cruzada es o comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en A209, MCA2607 y HM2199.
- 20 4. Un método que comprende las etapas de
detectar en una muestra de un sujeto un nivel de C3 intacto, en el que la detección implica una interacción específica entre el C3 intacto y un anticuerpo sin reactividad cruzada con respecto al mismo; y
comparar el nivel detectado con un nivel de referencia, cuyo nivel de referencia está dentro de un intervalo
25 de 350 ug/ml a 1.700 ug/ml; en el que la determinación de que el nivel detectado está por debajo del nivel de referencia, indica que el sujeto padece o es susceptible a una activación del complemento patológica y/o no deseable, en el que las etapas de detección y comparación se realizan en 30 minutos o menos utilizando un ensayo de flujo lateral.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo sin reactividad cruzada está **caracterizado por que** una solución de 1 ug/ul de iC3b produce una señal equivalente a menos de aproximadamente 1 ng/ml de C3.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo sin reactividad cruzada es o comprende
35 HM2075.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la activación del complemento no deseable y/o patológica está causada por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en
40 lupus eritematoso sistémico, traumatismo, estrés inflamatorio, trastornos autoinmunes, hemorragia intracraneal, infección, rechazo a trasplante, enfermedad ocular, enfermedad cardíaca, lesión por isquemia/reperfusión, degeneración macular relacionada con la edad, hemoglobinuria paroxística nocturna, angiodema hereditario, enfermedad renal, trastornos asociados con el embarazo, y trastornos neurológicos.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra se selecciona del
45 grupo que consiste en sangre entera, suero, plasma, orina, lágrimas, saliva, exudado de heridas, líquido de lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de detección se realiza en condiciones controladas, de tal forma que la ejecución de la etapa no activa sustancialmente el
50 complemento dentro de la muestra.

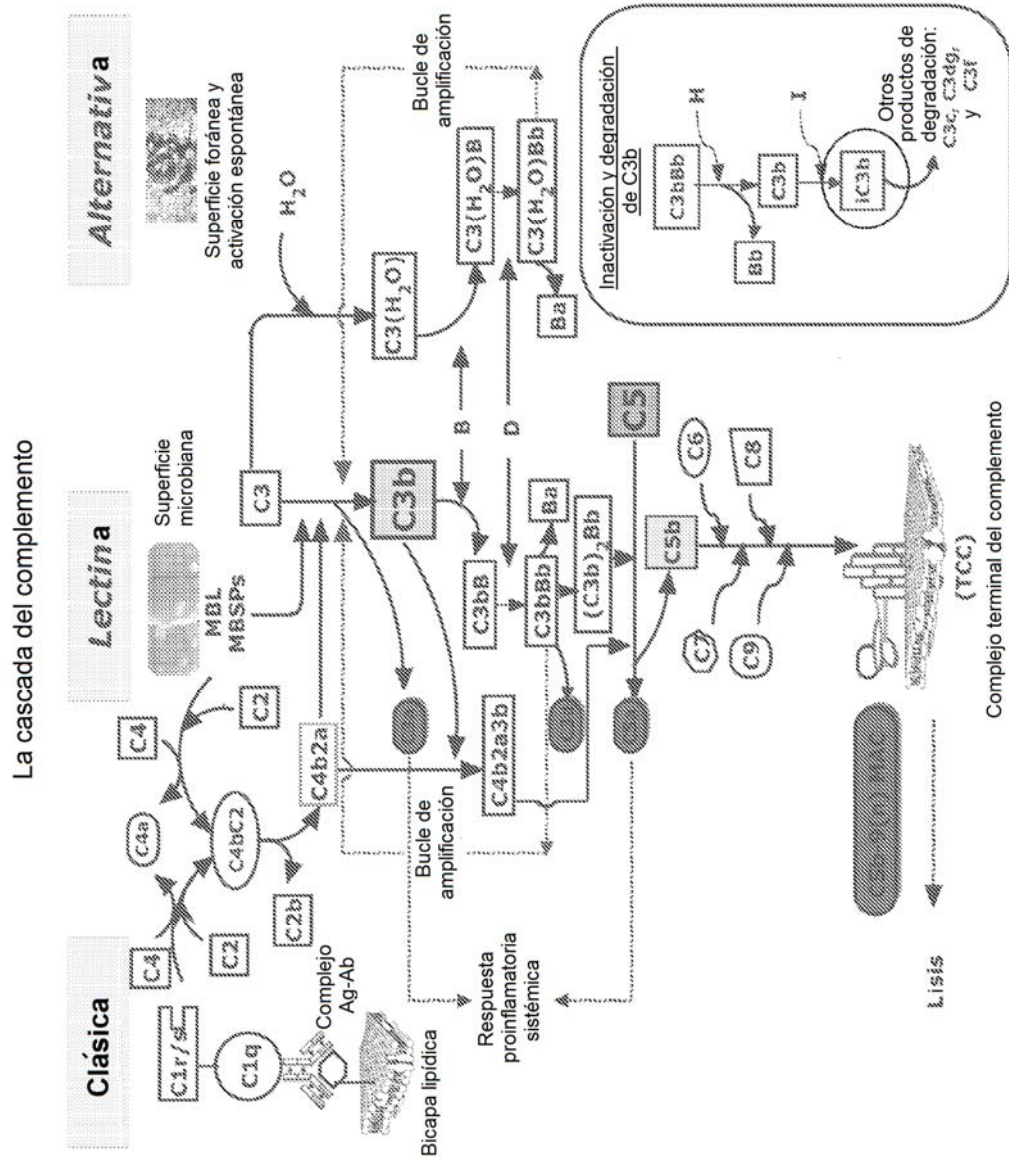


FIG. 1

C3 se activa y se desactiva por la actividad de la proteasa

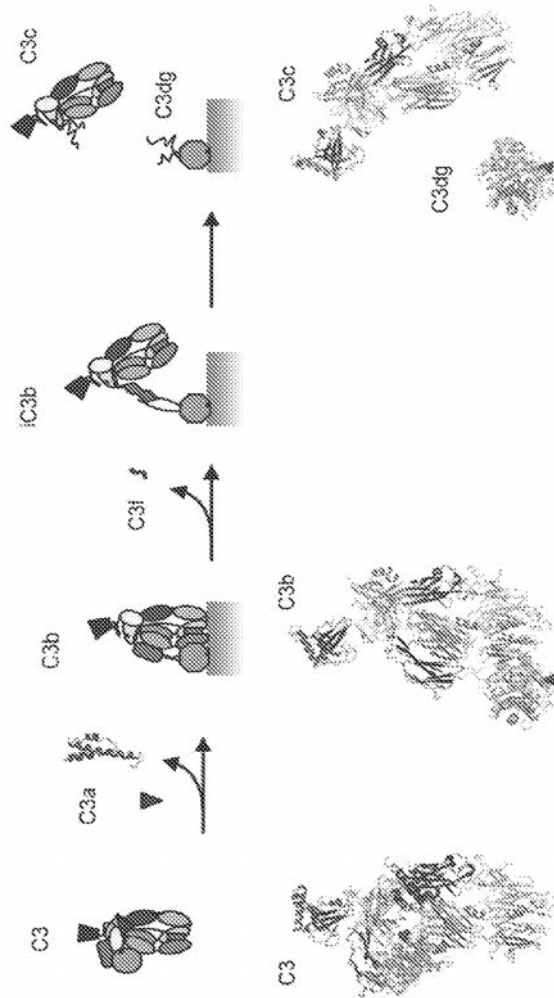


FIG. 2

Pares de anticuerpo que reconocen C3 intacto o iC3b

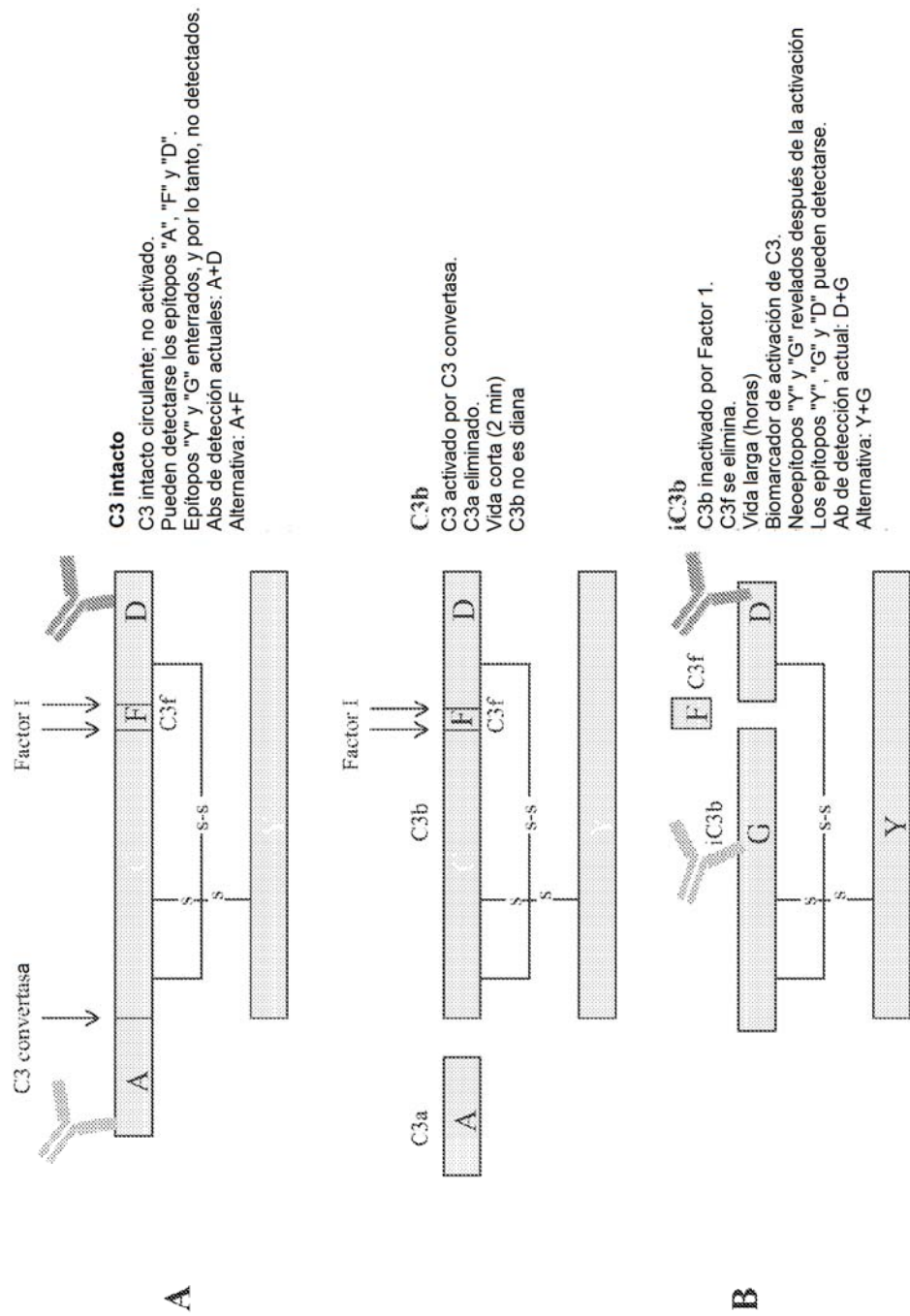


FIG. 3

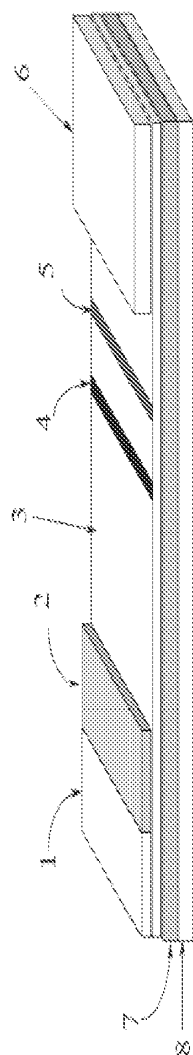


FIG. 4

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

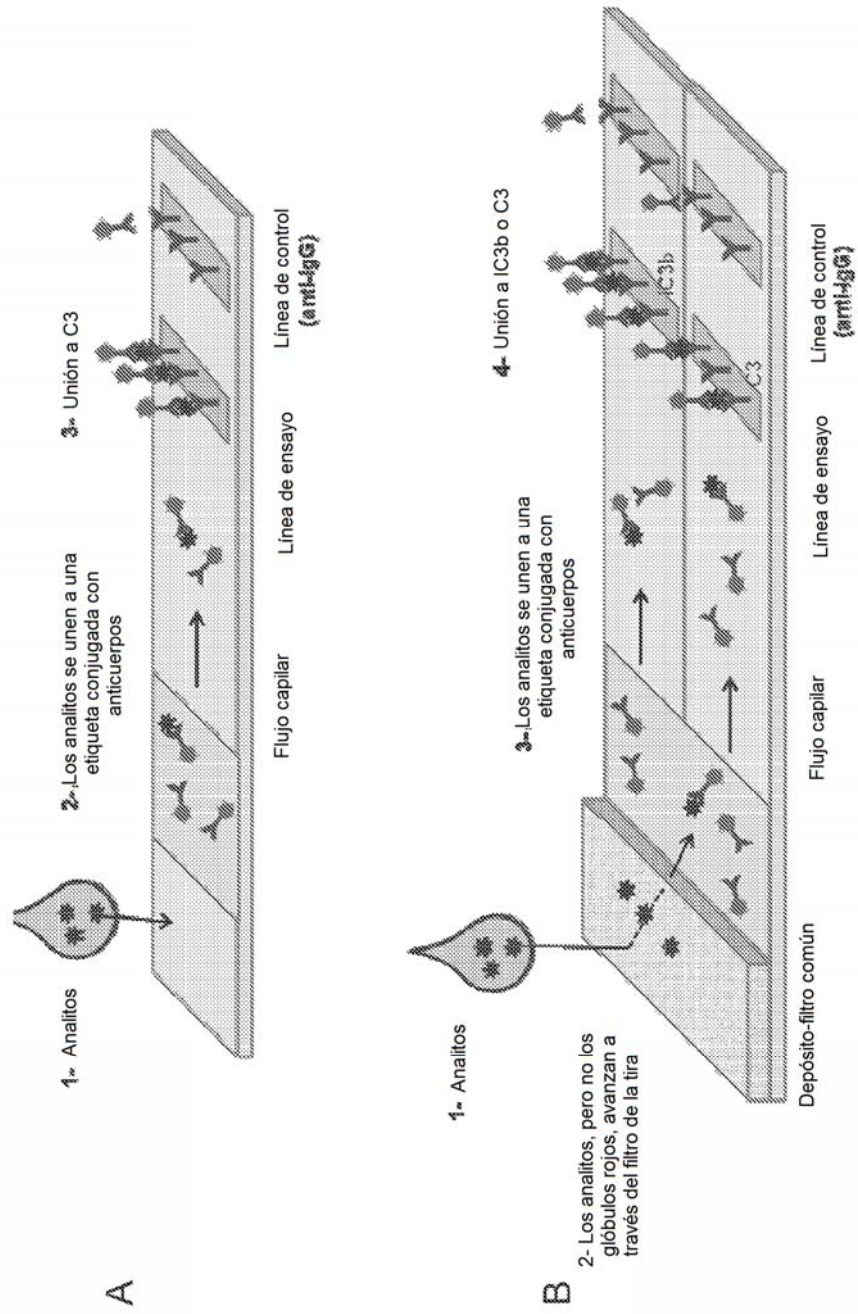


FIG.5

Casets de prueba de prueba de inmunoensayo de flujo lateral de analito individual

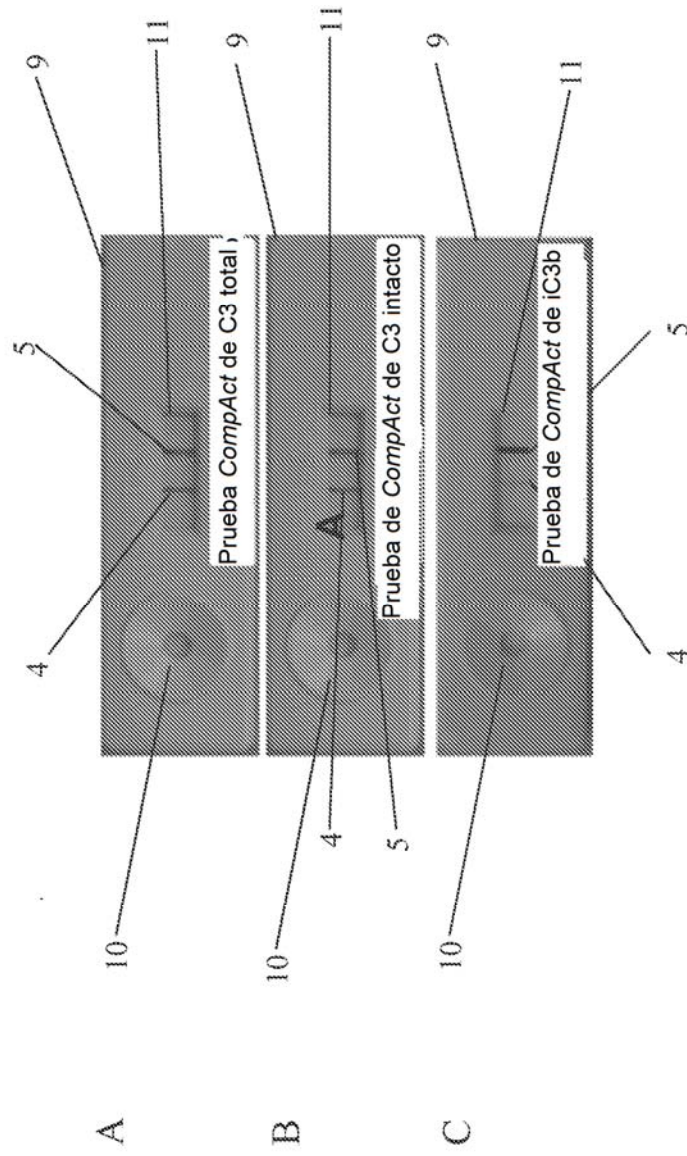


FIG.6

Casetes de prueba de inmunoensayo de flujo lateral de doble analito en paralelo

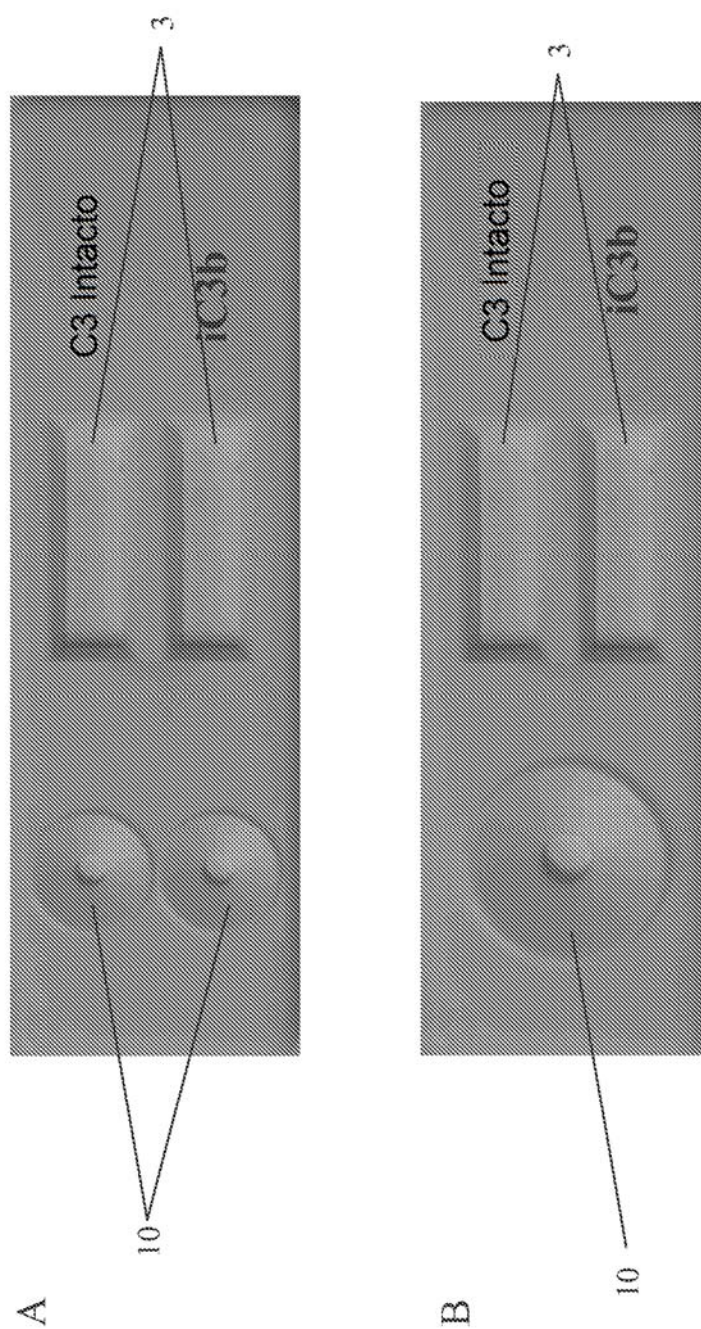


FIG.7

Casetes de prueba de inmunoensayo de flujo lateral de analito individual

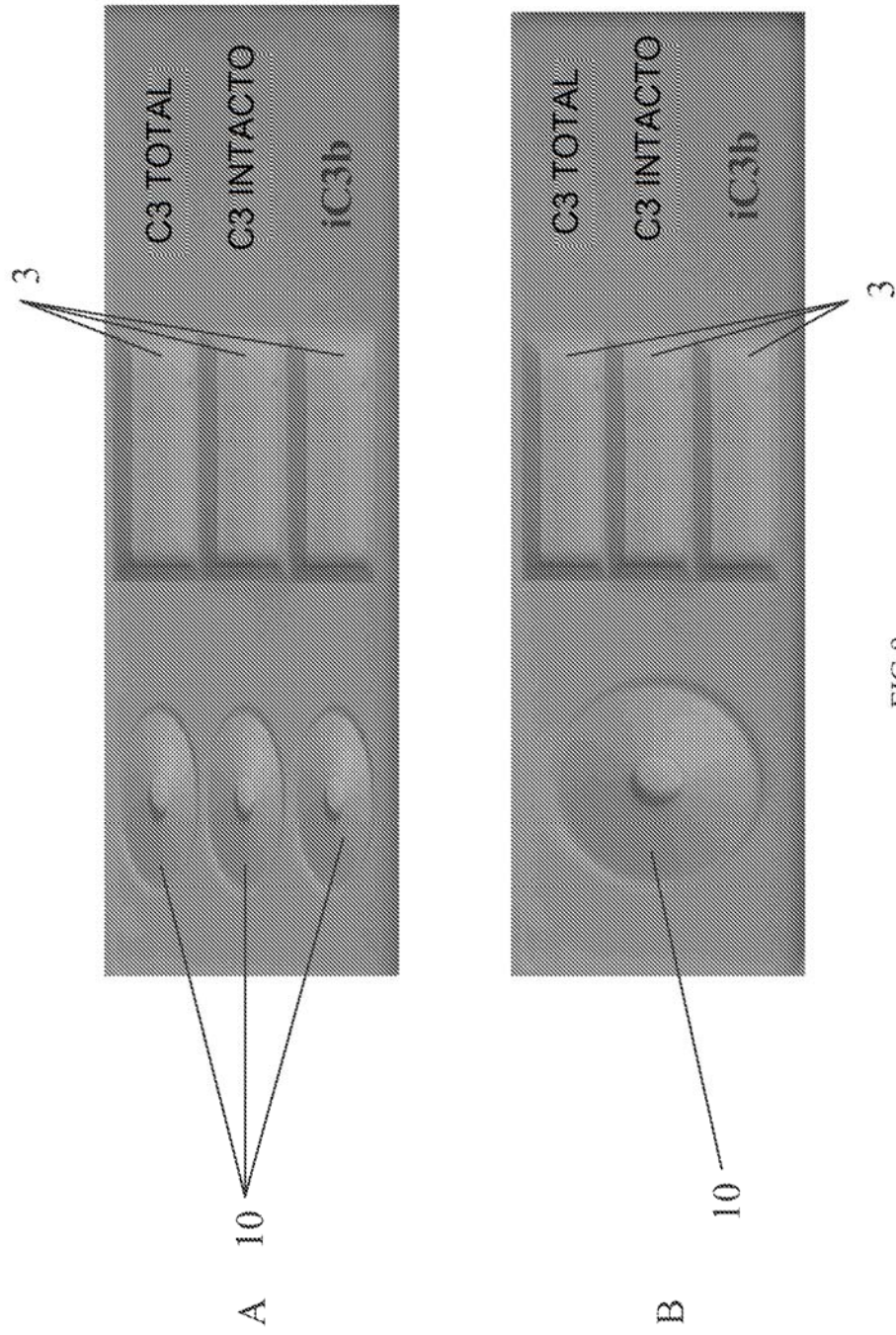


FIG.8

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

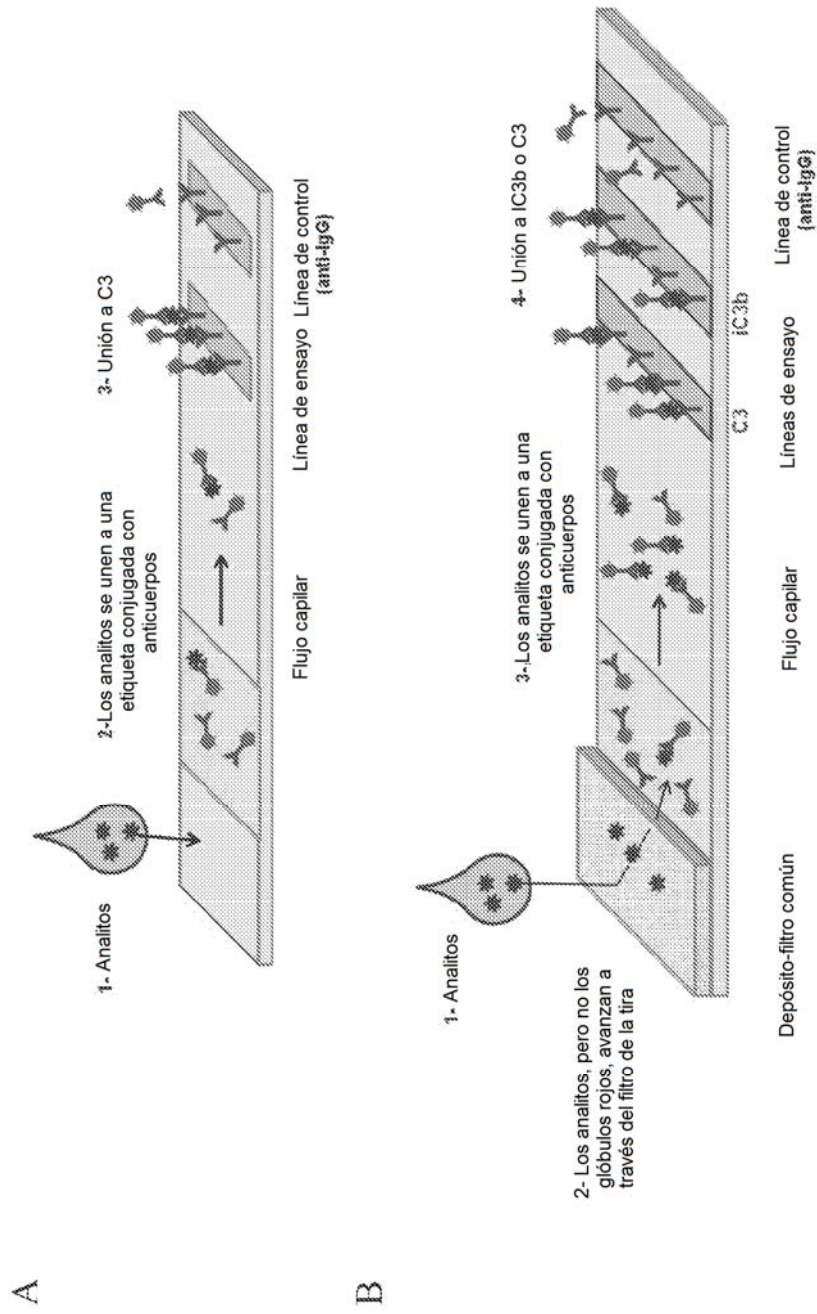


FIG. 9

Casetes de prueba de inmunoensayo de flujo lateral de analito múltiple en serie

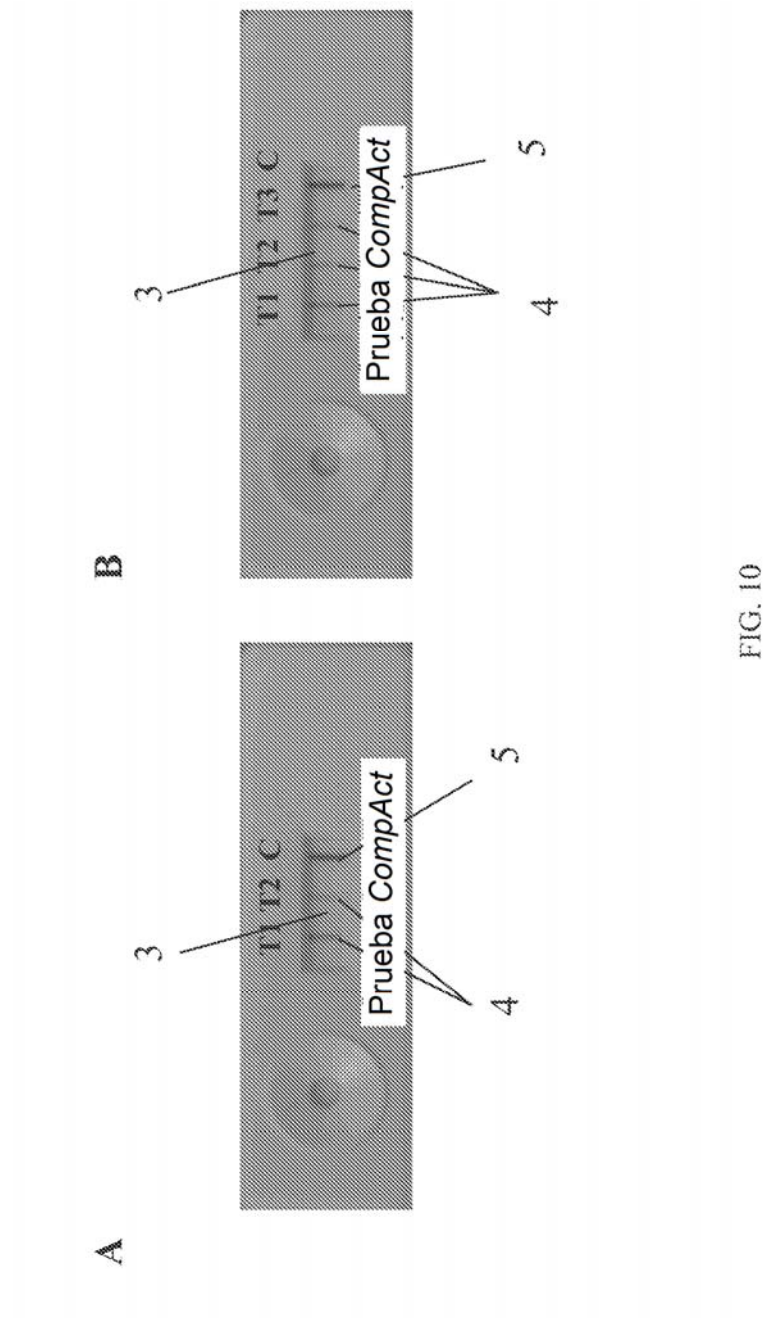


FIG. 10

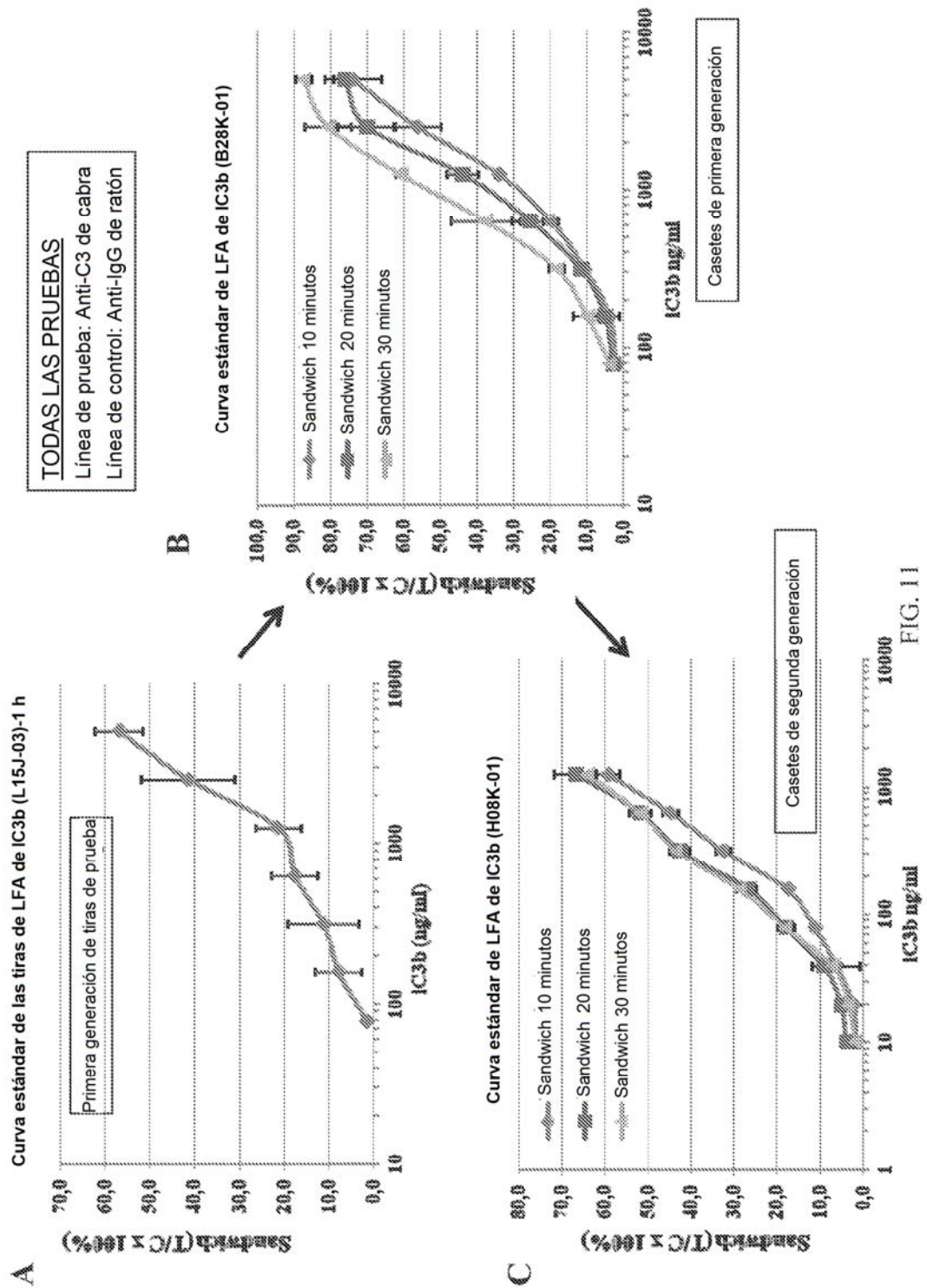


FIG. 11

Sensibilidad de casete de inmunoensayo de flujo lateral de iC3b

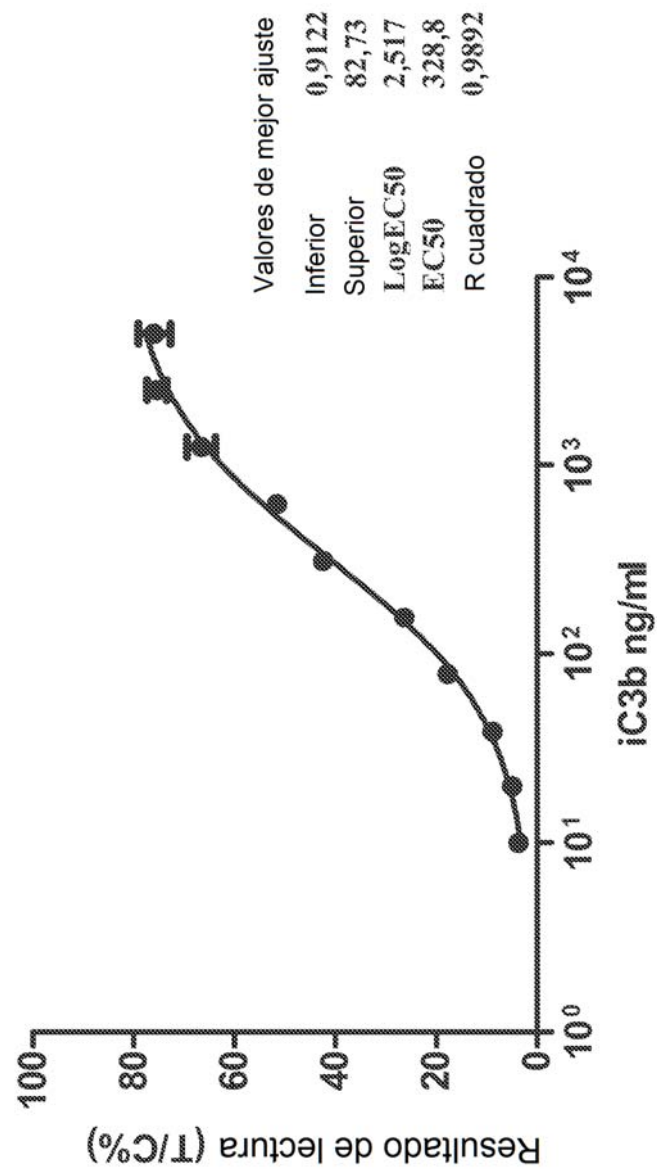


FIG. 12

Sensibilidad del casete de inmunoensayo de flujo lateral de C3 intacto

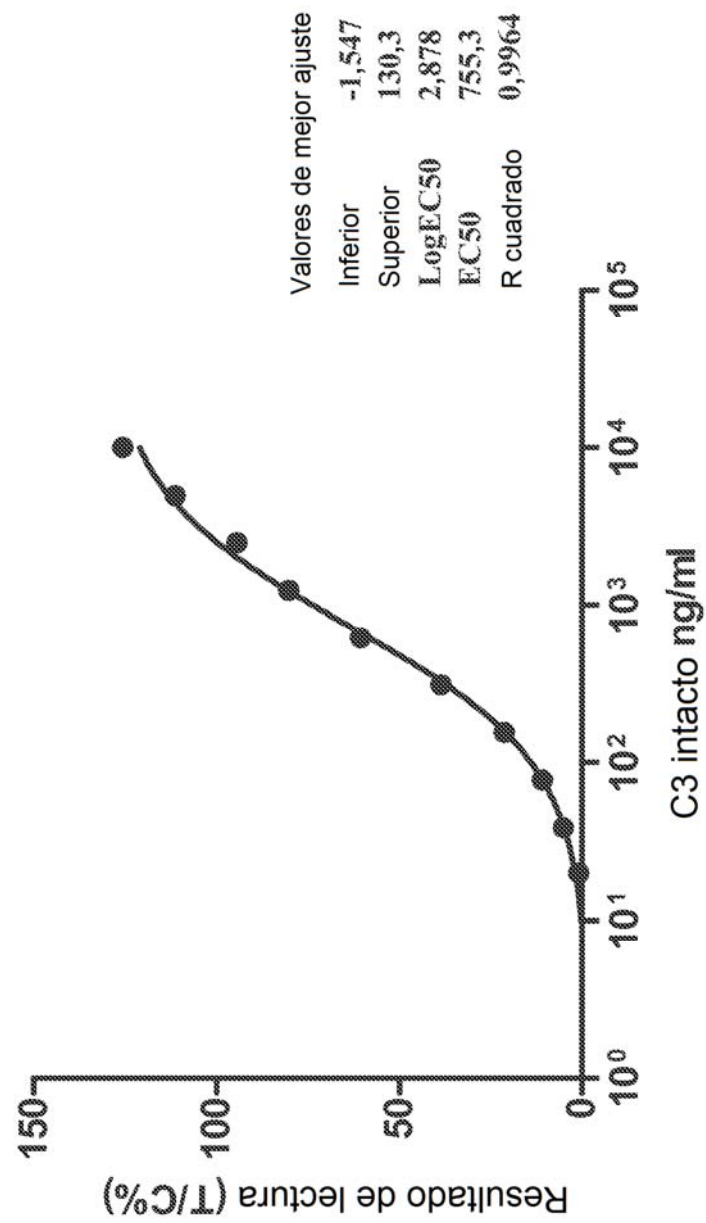


FIG. 13

Intercomunicación entre C3 intacto e iC3b en inmunoensayo de flujo lateral

	Señal de salida de iC3b total		Contribución fraccional de la señal de C3 intacto a iC3b	
	(H08K-01)	(J24K-03)	(H08K-01)	(J24K-03)
Relación de C3 intacto: iC3b				
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

FIG. 14

Niveles de C3 e iC3b en lágrimas basales recogidas de un solo individuo en intervalos de 12 horas

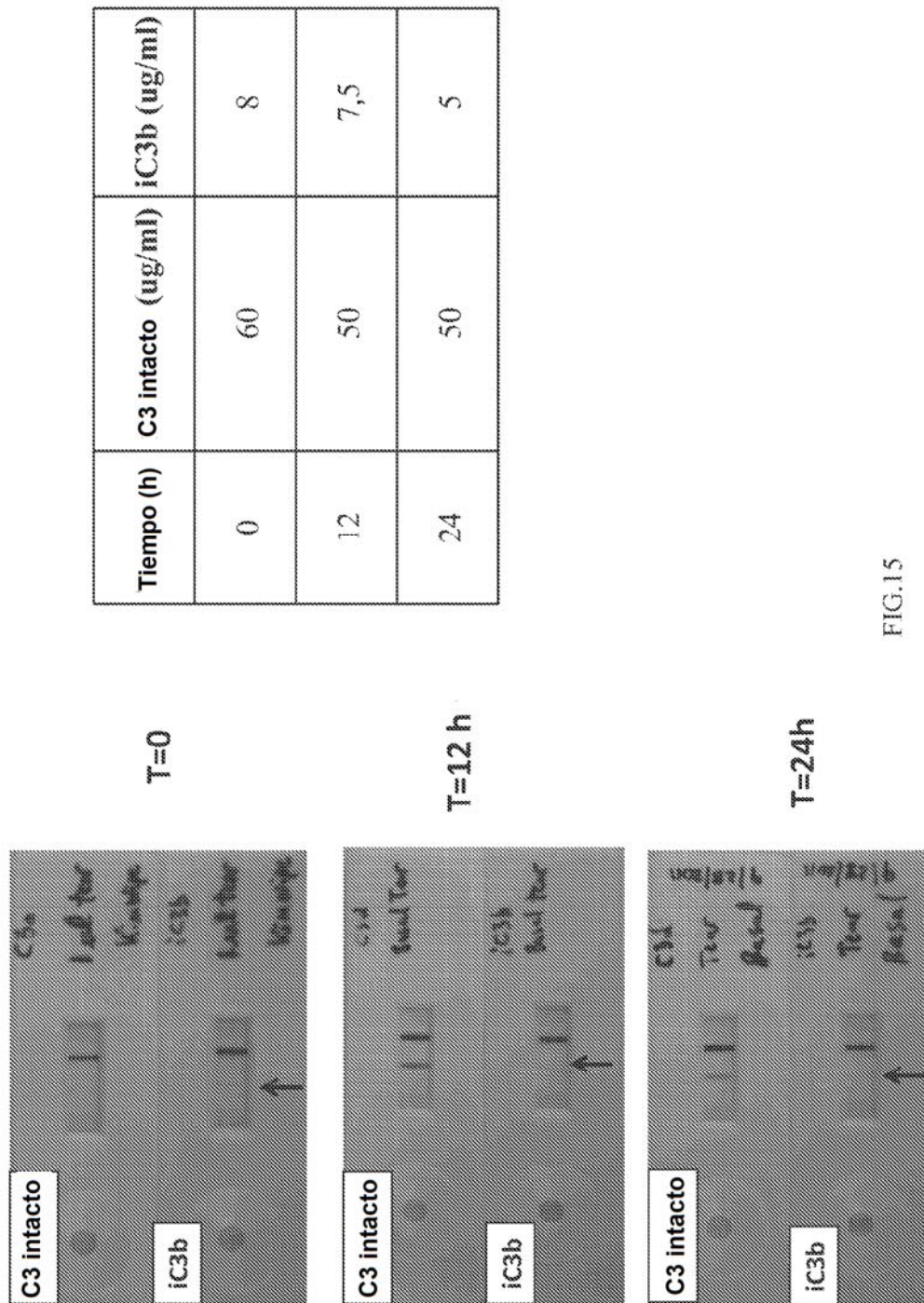


FIG.15

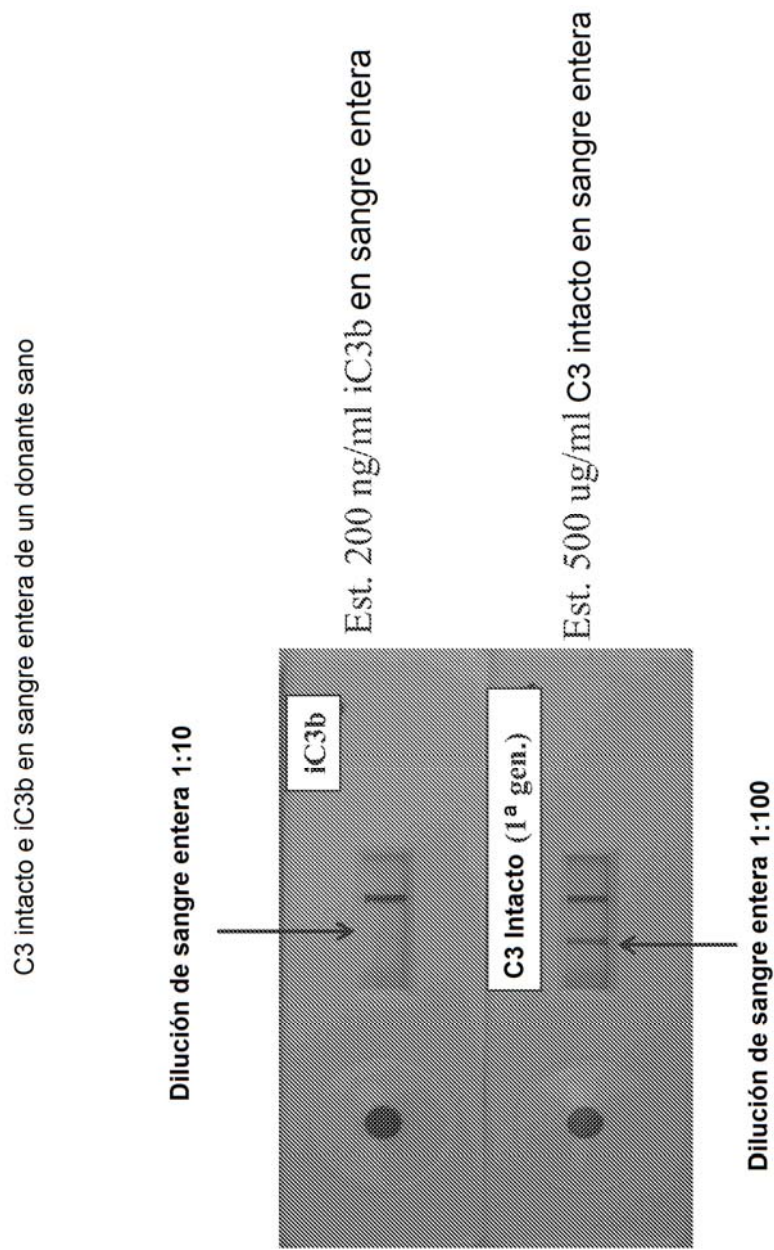


FIG. 16

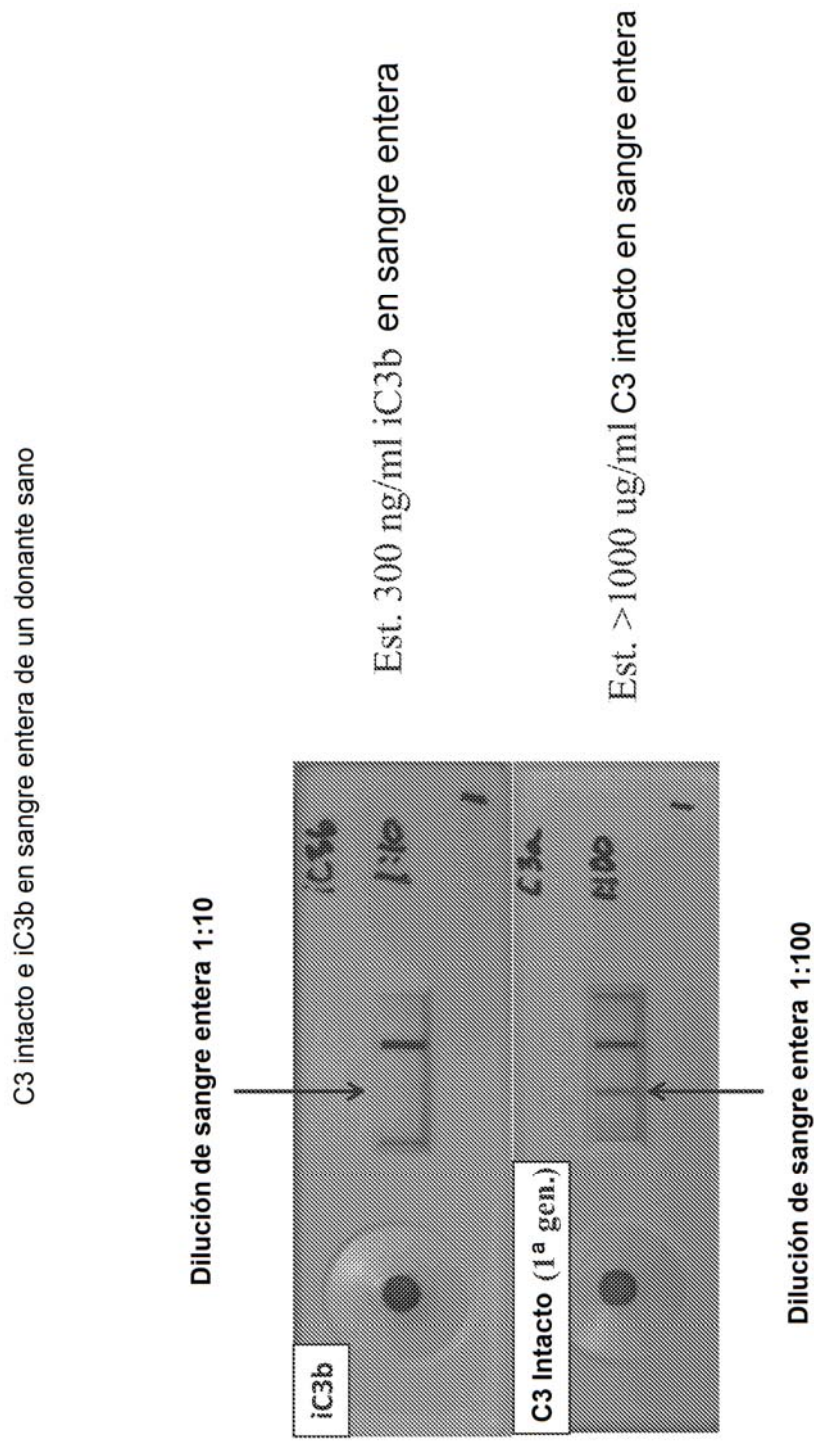


FIG.17

Resultados de la prueba en sangre entera 2 horas después de montar en bicicleta 100 millas

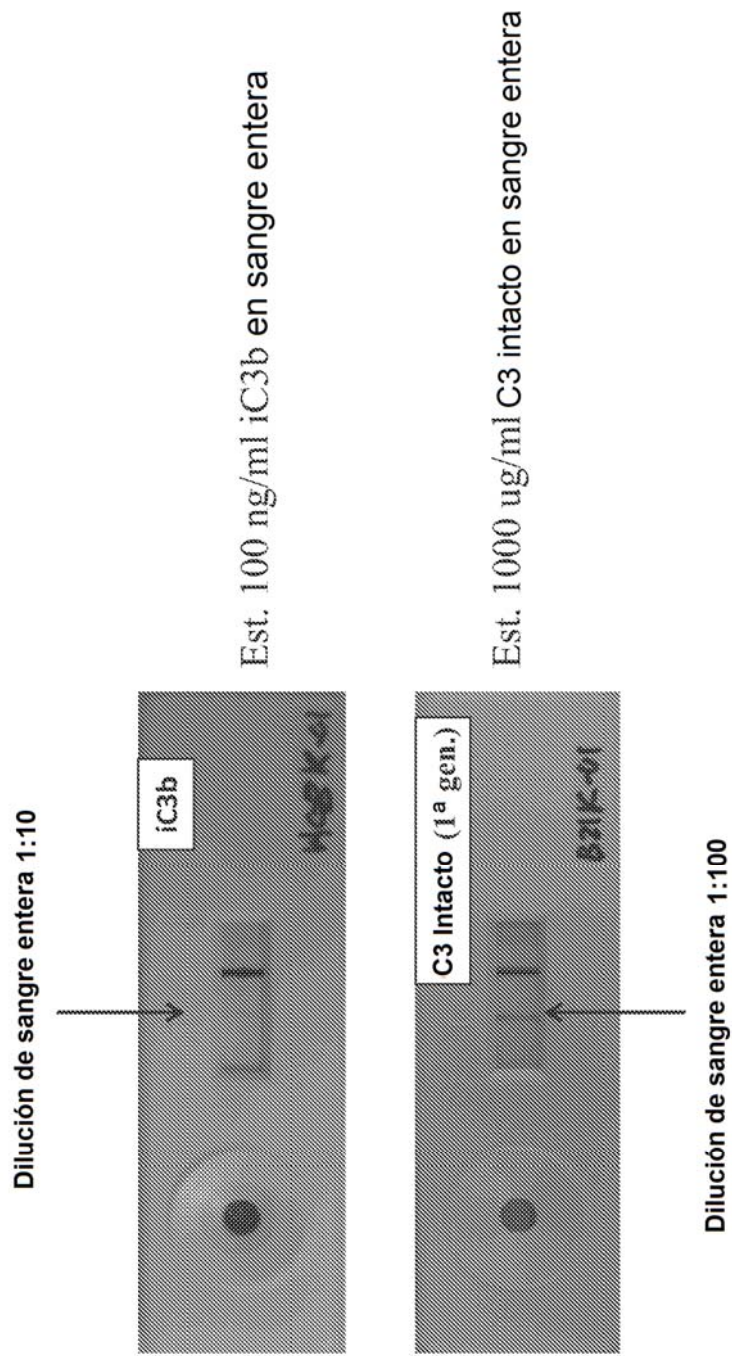


FIG.18

	fuente conocida de componente C3 de complemento	Proteínas de C3 de componente de complemento presentes			enfermedades inflamatorias donde se espera que los biomarcadores de C3 hayan estado o estén presentes
		validado por ELISA Kyphta o LFA	control/normal/sano	deteriorado (enfermedad/enfermo)	
fluido corporal					
sangre entera	Sí	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	infecciones, enfermedades autoinmunes (RA, MS, psoriasis, enfermedad de Crohn, lupus, etc.)
plasma	Sí	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	traumatismo, infarto al miocardio, apoplejía, enfermedad cardíaca, diabetes, fibrosis hepática, enfermedad renal, trasplante de órgano/rechazo, cáncer, alergias a alimentos
suero	Sí	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	traumatismo, enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), infecciones
líquido cefalorraquídeo	Sí	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	degeneración macular relacionada con la edad (AMD), enfermedad de ojo seco (DED), infecciones
lágrimas	Sí	Sí	C3 intacto, iC3b	C3 intacto, iC3b	traumatismo, quemaduras, diversas úlceras, infecciones
exudado de herida	Sí	Sí	N/A	C3 intacto, iC3b	Infección
secreción mucosa (nasal)	Sí	Sí	C3 intacto, iC3b (sanos, pero pueden padecer de alergias estacionales menores)		otitis media con efusión (OME)
Cerumen (cera del oído)		únicamente iC3b	no detectado		Acné, herpes labial
sebo (piel oleosa de glándulas sebáceas), lesiones o piel en general		únicamente iC3b	no detectado (frotar el antebrazo)		
saliva		únicamente iC3b	no detectado		enfermedad periodontal, estomatitis aftosa
orina		Sí	no detectado		glomerulonefritis, infección
sudor					
semen					infección silenciosa en tracto genital masculino
fluido vaginal					infección
leche materna					infección
condensado de respiración					asma, EPOC, enfisema, fibrosis quística

FIG.19

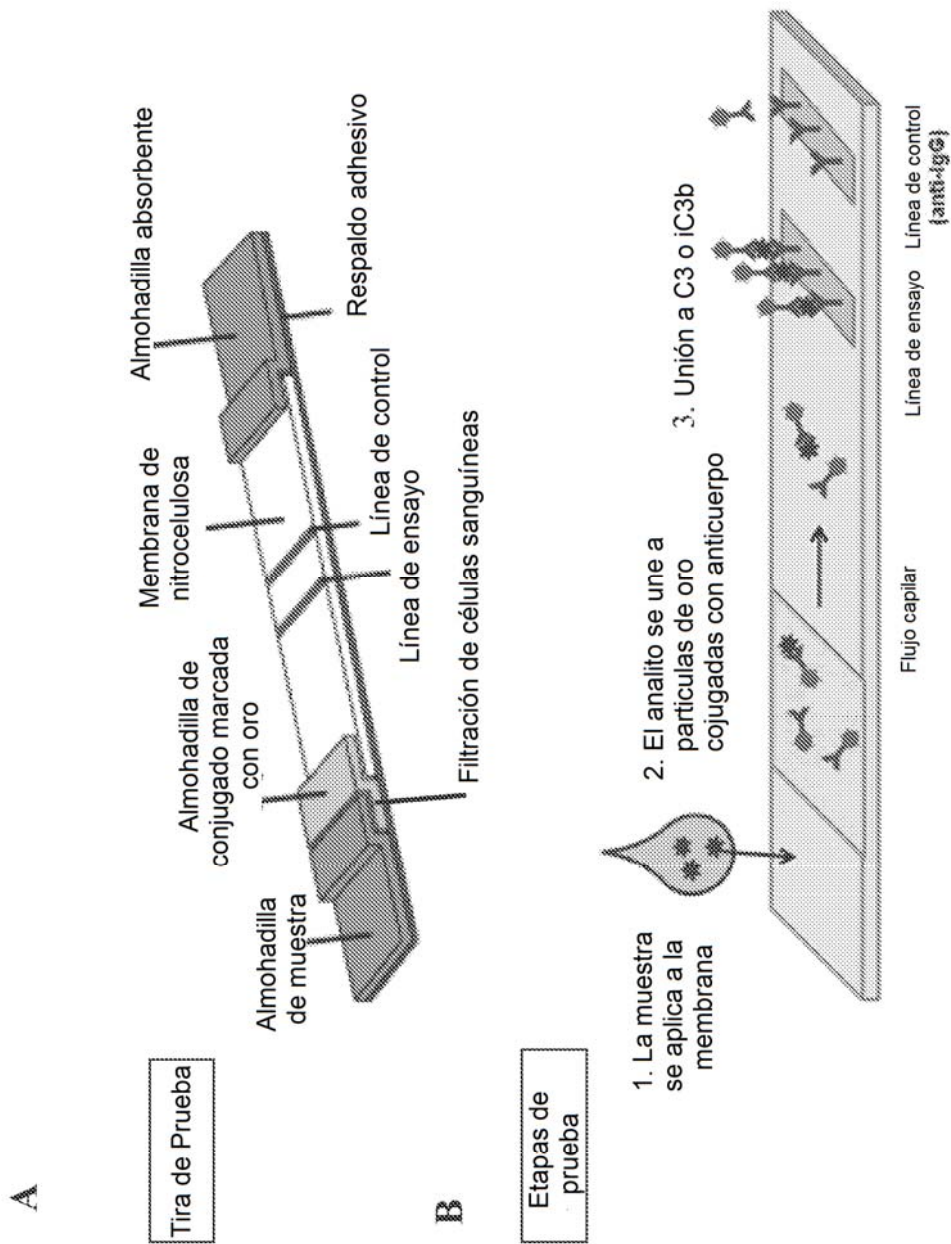


FIG.20

Protocolo Ejemplar

1. Limpiar el dedo usando un algodón con alcohol.
2. Pinchar el dedo con la lanceta.
3. Apretar el dedo suavemente, y recoger por acción capilar 10 ul de sangre usando el tubo MICROSAFE®.
4. Expulsar la muestra de sangre directamente en el puerto de muestra de la Prueba A **CompAct** del casete.
5. Echar inmediatamente 3 gotas de tampón de ensayo en el puerto de muestra para mezclar con la sangre.
6. Ajustar el tiempo durante 15 o 20 minutos.
7. Repetir el ensayo con la tira de sangre del mismo dedo utilizando el casete de la Prueba B **CompAct**.
8. Antes de que transcurran los 15 o 20 minutos, encender el lector **CompAct** de Kypha.
9. Evaluar cada prueba antes de la lectura para asegurarse de que la Línea de control sea fácilmente visible y de que los frotis no sean un problema.
10. Cuando el temporizador alcance el máximo, deslizar la cubierta hacia abajo y colocar la Prueba A **CompAct** en el lector.
11. Deslizar la cubierta hacia atrás y presionar el botón de inicio. El lector mostrará los resultados después de aproximadamente 15 segundos.
12. Capturar los resultados. El lector puede almacenar hasta 250 pruebas.
13. Desechar la Prueba A **CompAct** y reemplazar por la Prueba B **CompAct**.
14. Pulsar el botón de inicio.
15. Capturar los resultados y descartar la prueba B **CompAct**.

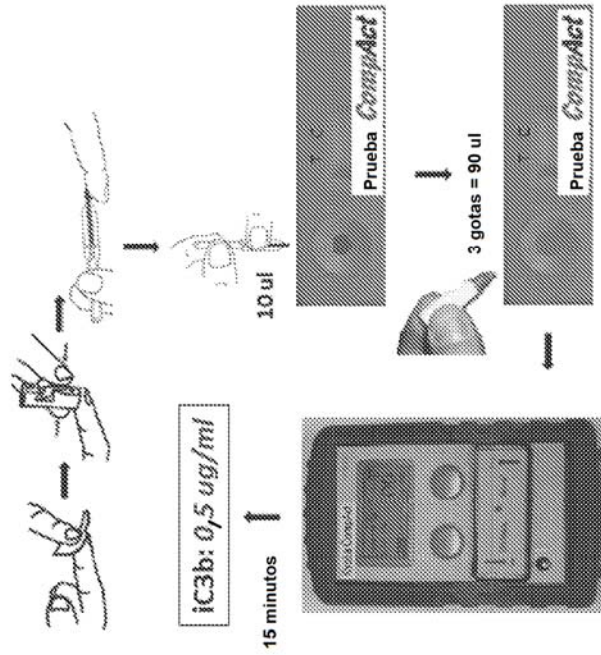


FIG. 21

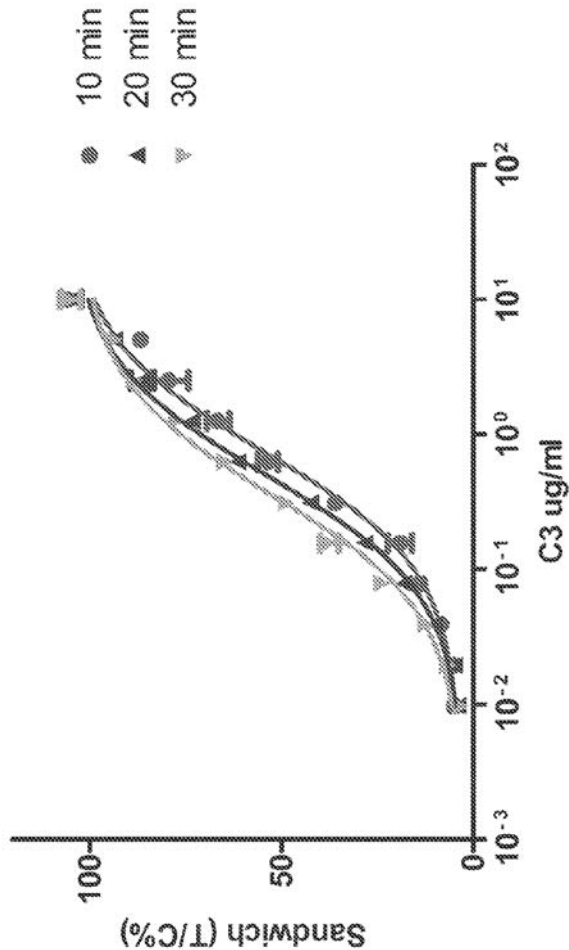
LFA de C3 nativo 20 minutos después de la aplicación de la muestra: la sensibilidad visual es de aproximadamente 10-20 ng/ml

			C3 INTACTO (ng/ml)
		1000 ng	10,000
		500 ng	5000
		250 ng	2500
		125 ng	1250
		62,5	625
		31,3	313
		15,6 ng	156
		7,8 ng	78
		3,9 ng	39
		2 ng	20
		1 ng	10
		0 ng	0

FIG. 22

Sensibilidad de la prueba para C3 nativo y rango dinámico

Curva estándar de LFA para C3 nativo (sandwich)



BAW lote: LO5K-01

Valores de mejor ajuste	10 min	20 min	30 min
Inferior	3,528	2,682	2,970
Superior	106,0	105,2	102,6
LogEC50	-0,1262	-0,3020	-0,4451
EC50	0,7479	0,4989	0,3588

$$Y = \text{Inferior} + [(\text{superior} - \text{Inferior}) - (1 + 10^{(\text{LogEC50} - X)})]$$

FIG. 23

Varianza del ensayo en 10, 20 y 30 minutos					
C3 Nativo	Valores de C.V.				
	Tiempo			Varianza promedio	
	10 min	20 min	30 min	10 a 30	20 a 30
10	11,8	21,4	20,3	17,8	20,9
5	3,1	4,2	5,8	4,4	5,0
2,5	77,2	27,0	12,8	39,0	19,9
1,25	27,1	6,2	3,2	12,2	4,7
0,63	20,0	2,6	12,8	11,8	7,7
0,31	4,0	0,1	5,3	3,1	2,7
0,16	28,7	11,2	19,5	19,8	15,4
0,08	10,5	4,7	0,5	5,2	2,6
0,04	7,9	2,1	1,2	3,7	1,7
0,02	11,4	2,0	2,6	5,3	2,3
0,01	2,9	1,9	1,6	2,2	1,8
0	5,2	0,5	0,3	2,0	0,4
Promedio	17,5	7,0	7,2	10,6	7,1

Los valores CV
generalmente son
inferiores al 10%

Nota: Todos los valores de CV en los intervalos utilizados han de ser del 5% o inferior. A pesar de algunos CV elevados a algunas concentraciones, no se espera que sea un problema grave.

FIG.24

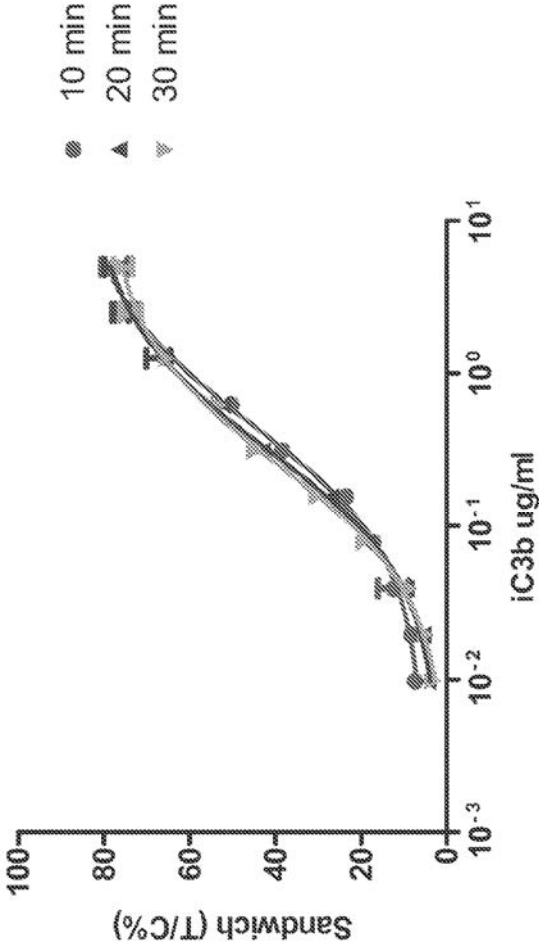
El ensayo de iC3b 20 minutos después de la aplicación de la muestra: La sensibilidad visual es de aproximadamente 10-20 ng/ml

			iC3b (ng/ml)
TC 500 ng	TC 500 ng	TC 500 ng	5000
			2500
TC 250 ng	TC 250 ng	TC 250 ng	
			1250
TC 125 ng	TC 125 ng	TC 125 ng	
			625
TC 63 ng	TC 63 ng	TC 63 ng	
			313
TC 31,3 ng	TC 31,3 ng	TC 31,3 ng	
			156
TC 15,6 ng	TC 15,6 ng	TC 15,6 ng	
			78
TC 7,8 ng	TC 7,8 ng	TC 7,8 ng	
			39
TC 3,9 ng	TC 3,9 ng	TC 3,9 ng	
			20
TC 2 ng	TC 2 ng	TC 2 ng	
			10
TC 1 ng	TC 1 ng	TC 1 ng	
			0
TC 0 ng	TC 0 ng	TC 0 ng	

FIG. 25

Sensibilidad de la prueba para iC3b y rango dinámico

Curva estándar de LFA para iC3b (sandwich)



BAW lote: H08K-01

	10 min	20 min	30 min
Valores de mejor ajuste			
Inferior	5,507	1,570	-0,1276
Superior	86,22	83,37	79,68
LogEC50	-0,3231	-0,4823	-0,5868
EC50	0,4752	0,3294	0,2589

$Y = \text{Inferior} + [(\text{superior} - \text{Inferior}) \cdot (1 + 10^{(\text{LogEC50} - X)})]$

FIG. 26

Estimación de LFA de C3 nativo e iC3b en sangre entera

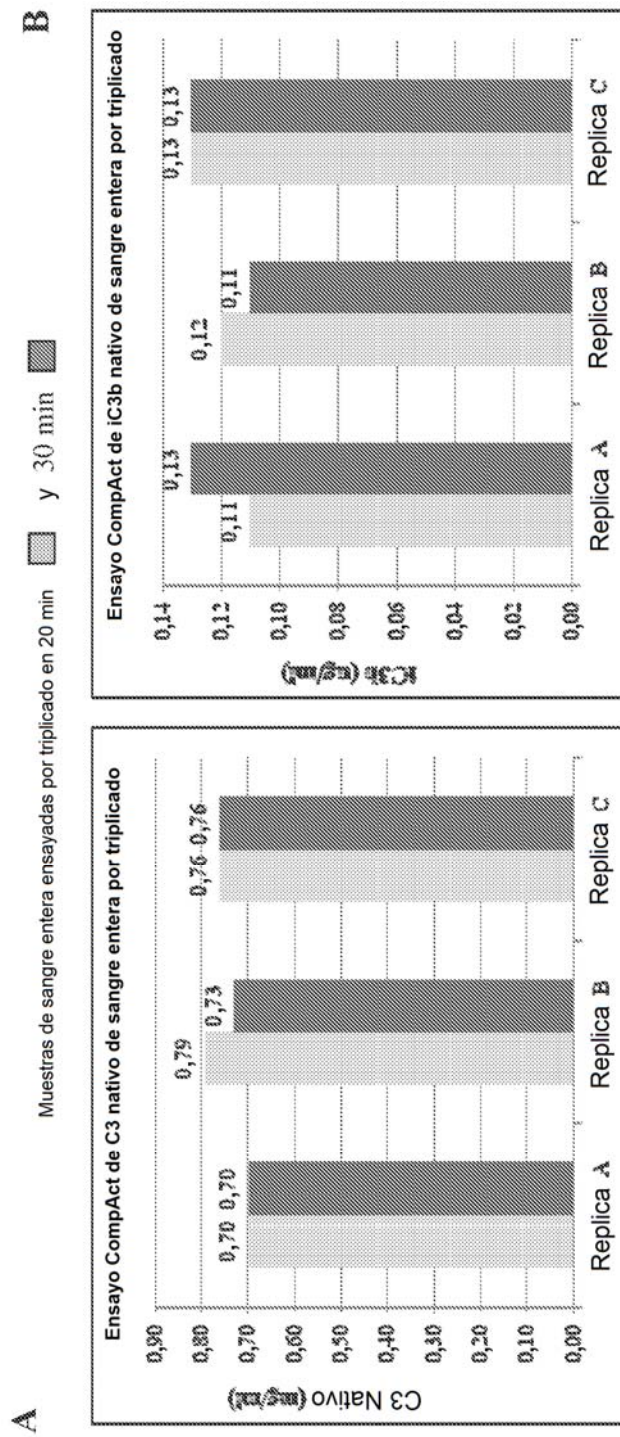


FIG. 27

Comparación de los resultados de las pruebas *CompAct* y ELISA para iC3b en fluidos corporales de tres donantes

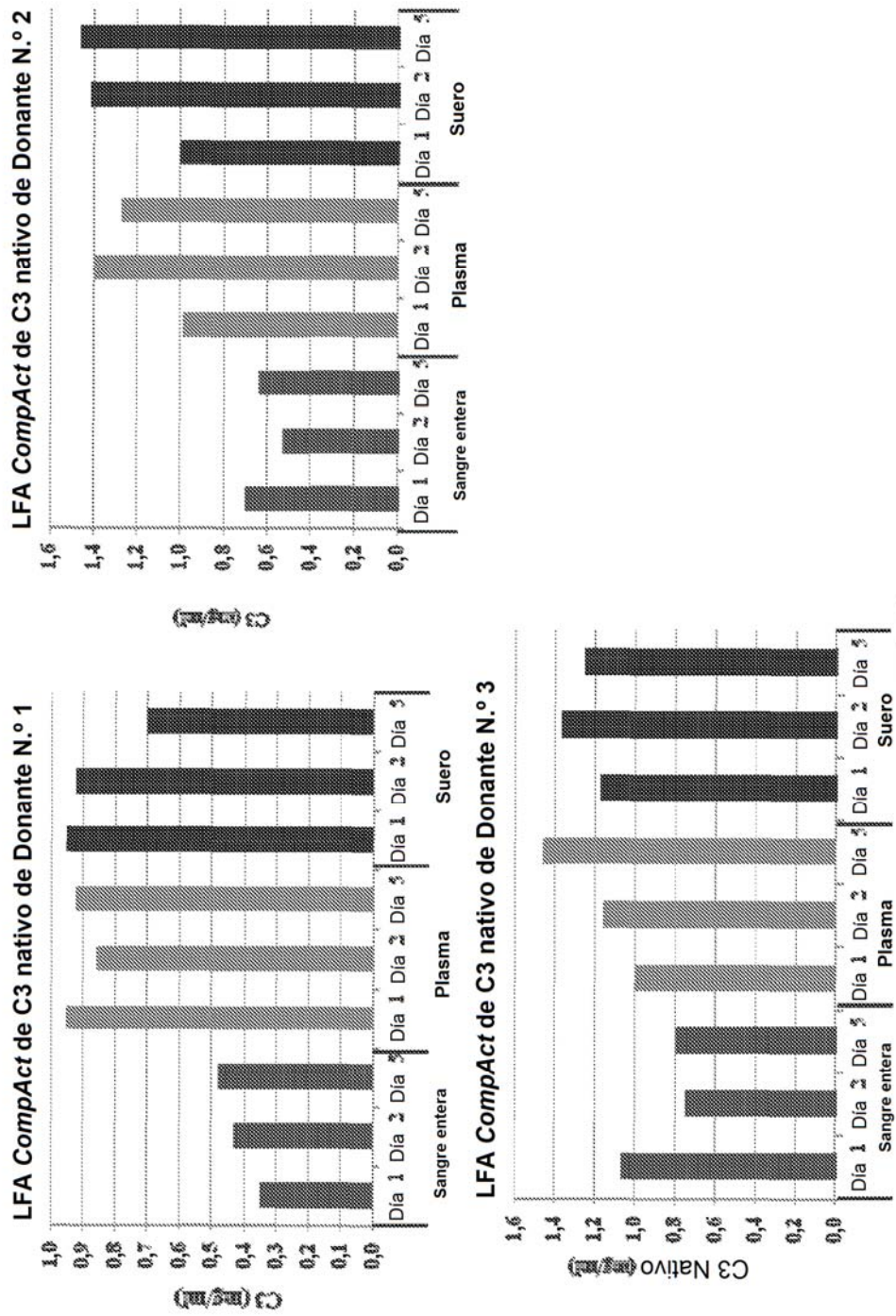


FIG. 28

Comparación de los resultados de las pruebas *CompAct* y ELISA para iC3b en fluidos corporales de tres donantes

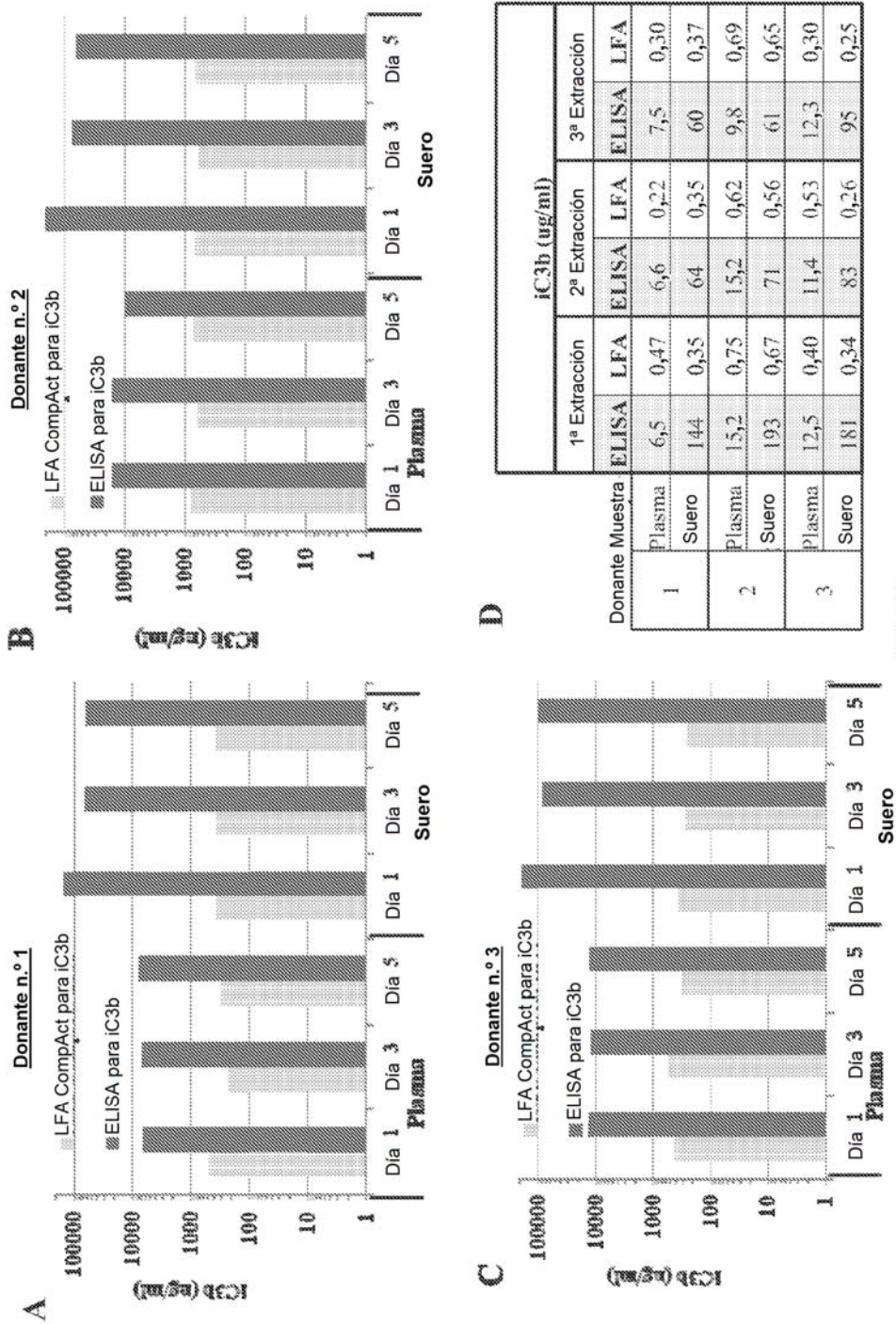


FIG. 29

Cuando se analiza la proteína purificada, tanto LFA como ELISA dan resultados similares

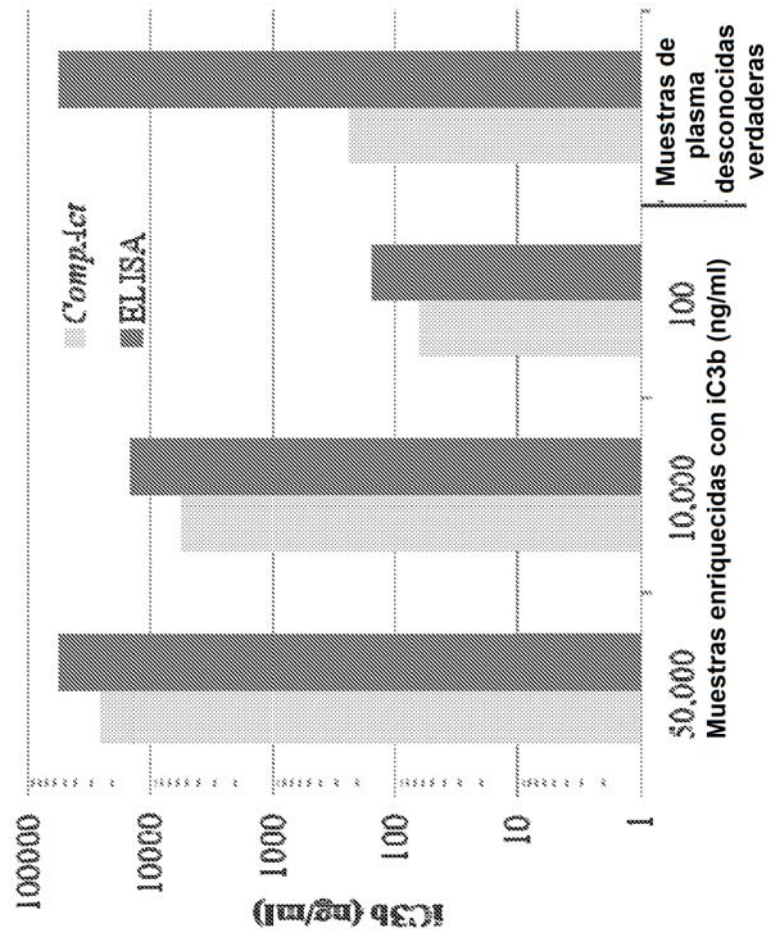
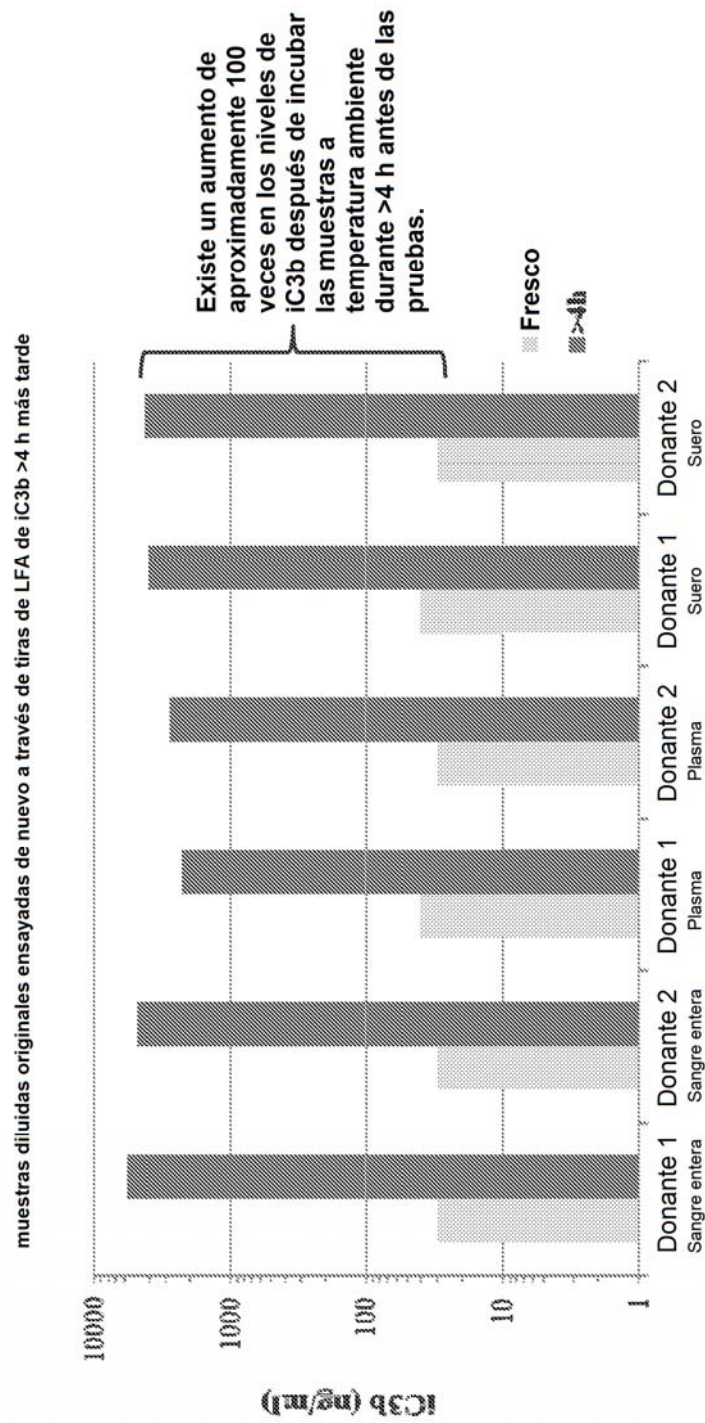


FIG. 30

¿Cómo de grave puede ser un problema de activación de C3 experimental?



Conclusión: Se producen rápidamente aumentos sustanciales en los niveles de iC3b a TA. Aumenta la posibilidad de que la activación de C3 sustancial pueda tener lugar en ensayos ELISA de 3C3b estándar. Las muestras almacenadas a -80°C no difieren sustancialmente de las muestras frescas (no mostrado).

FIG.31

Las muestras se incubaron simultáneamente con anticuerpo de detección anti-C3-HRP de cabra

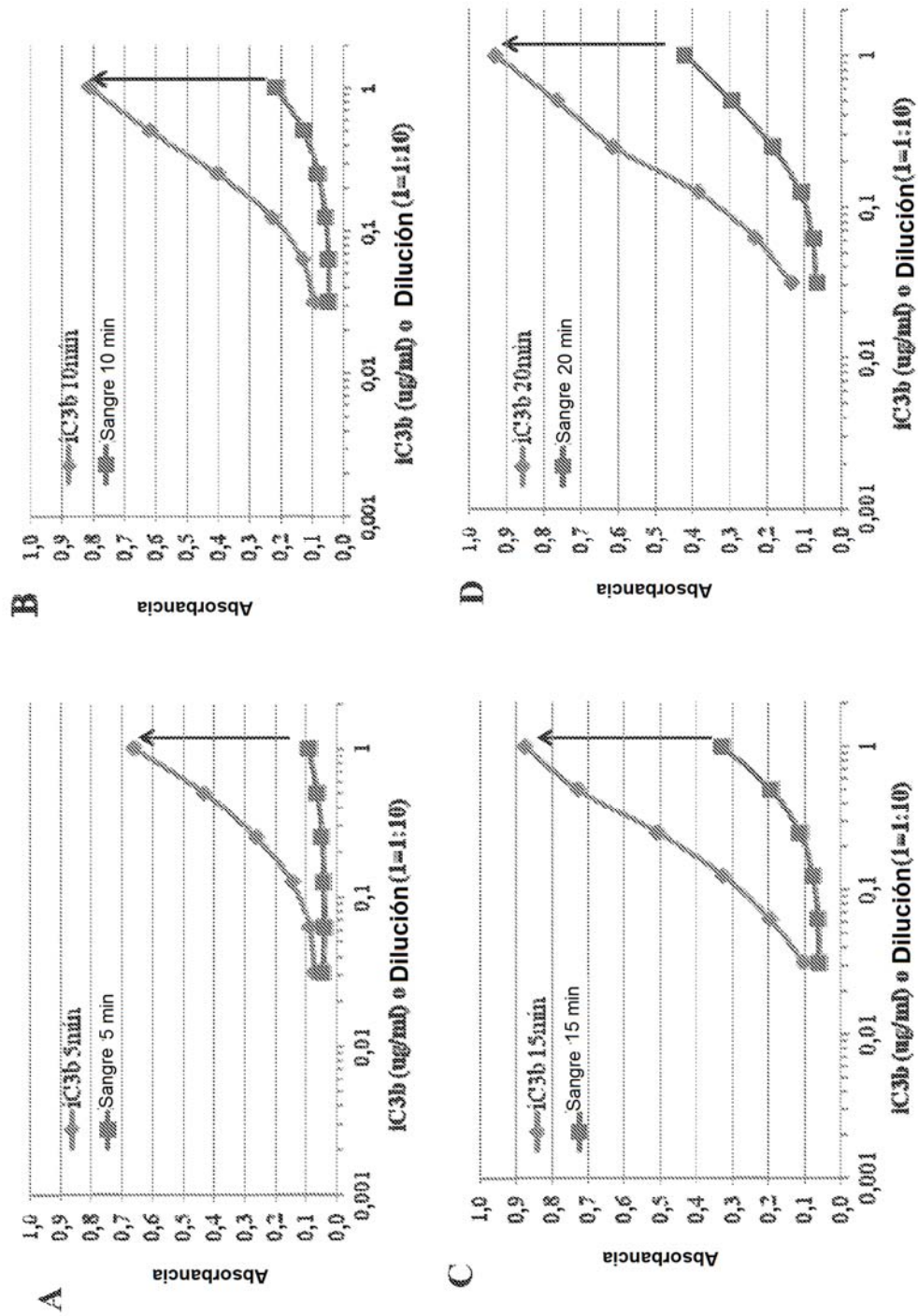
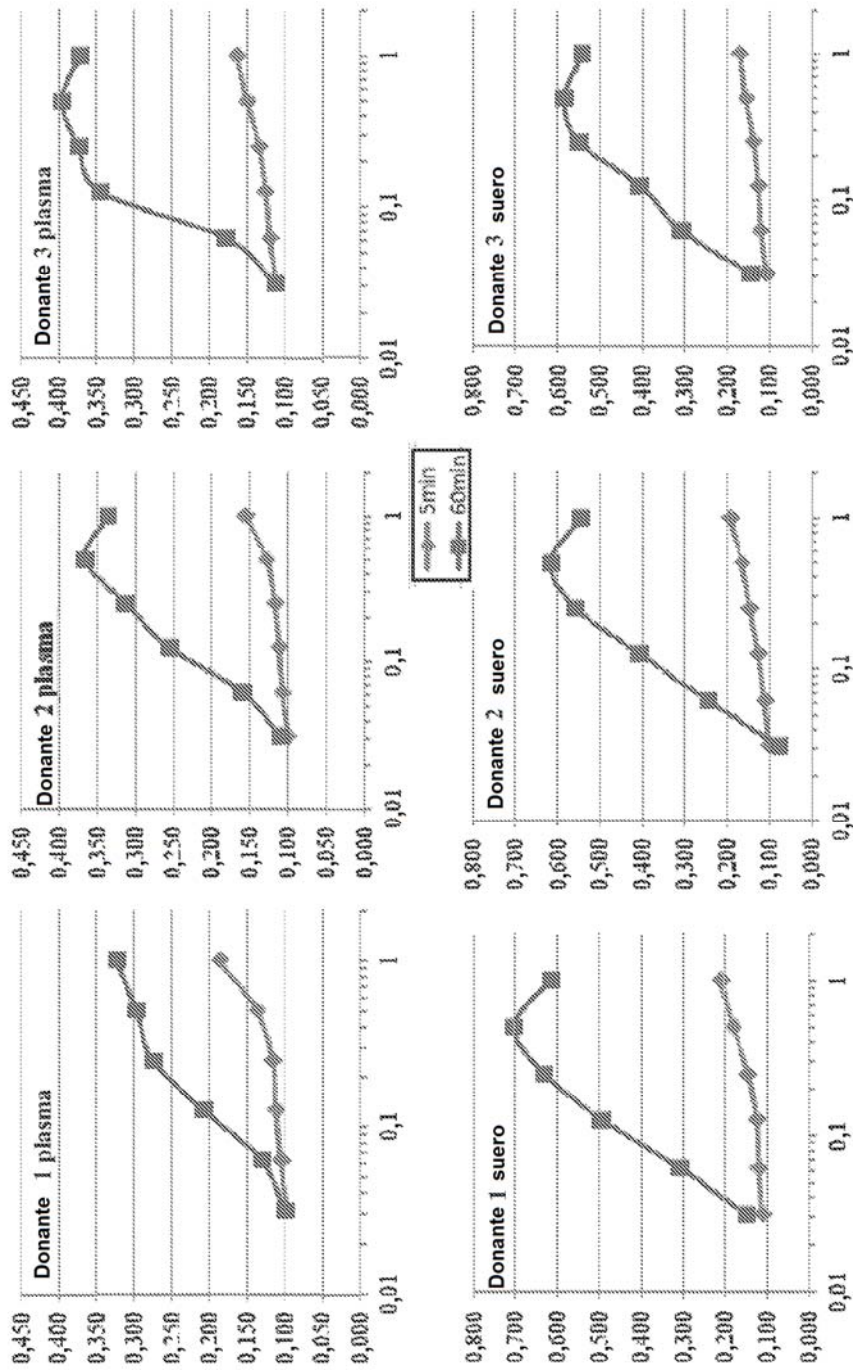


FIG.32

La activación en el tiempo se extiende más allá de aumentos sencillos y lineales



Los datos se normalizaron en curvas estándar de iC3b para fines de comparación directa.

FIG. 33

Generación dependiente del tiempo de iC3b en plasma diluido en tampón de ensayo

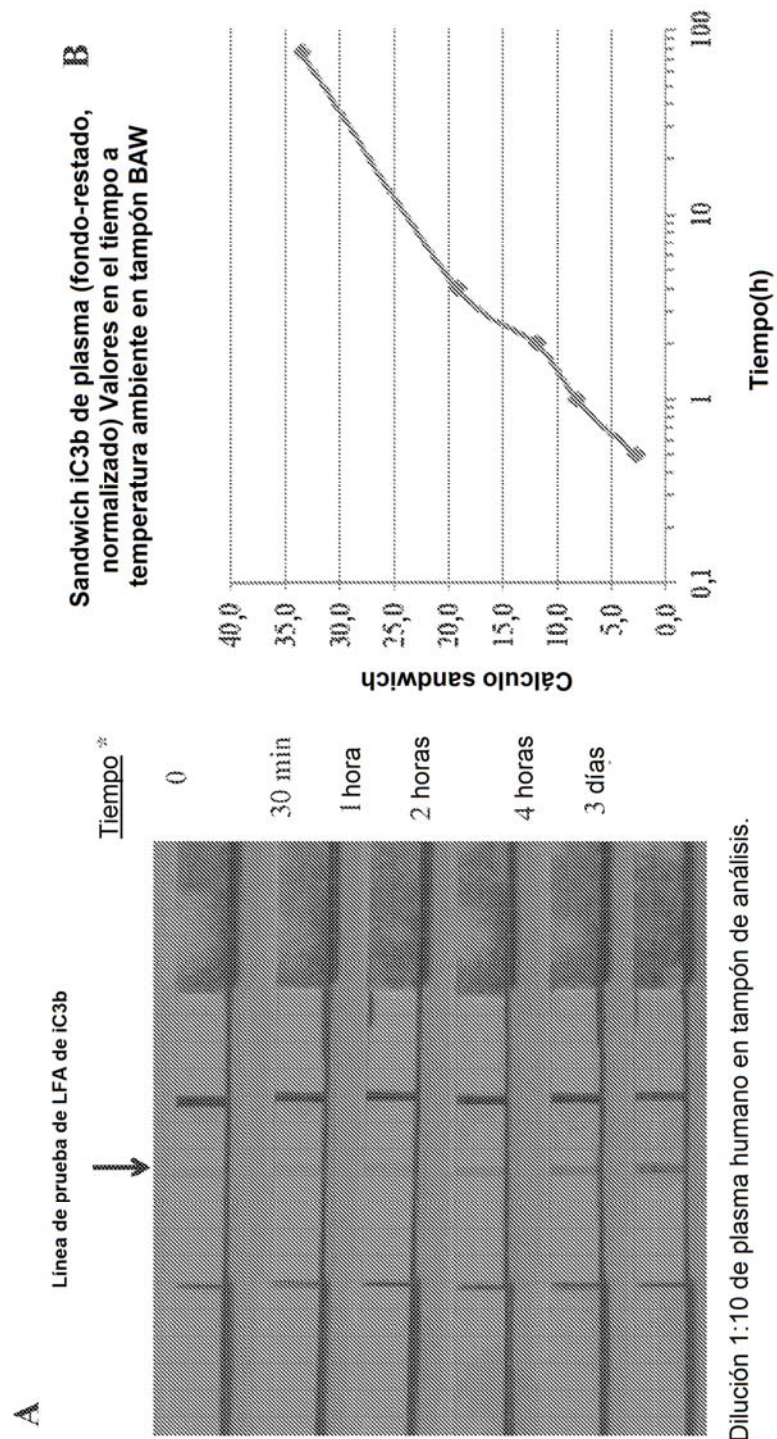


FIG.34

La activación de C3 experimental tiene lugar rápidamente

- Incubar muestras humanas durante solamente 2 o 5 minutos con pocillos recubiertos con mAb anti-iC3b

- Mantener durante 1 h en incubación secundaria con anticuerpo de detección pAb anti-C3

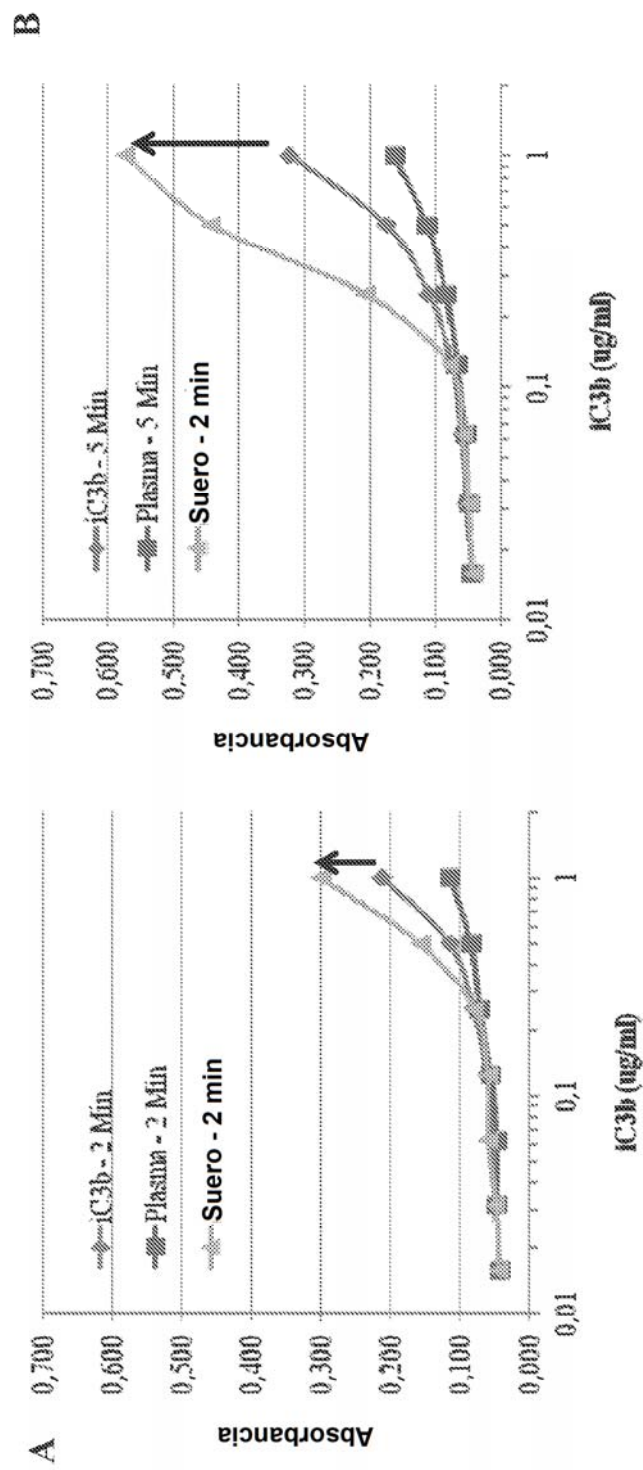


FIG. 35

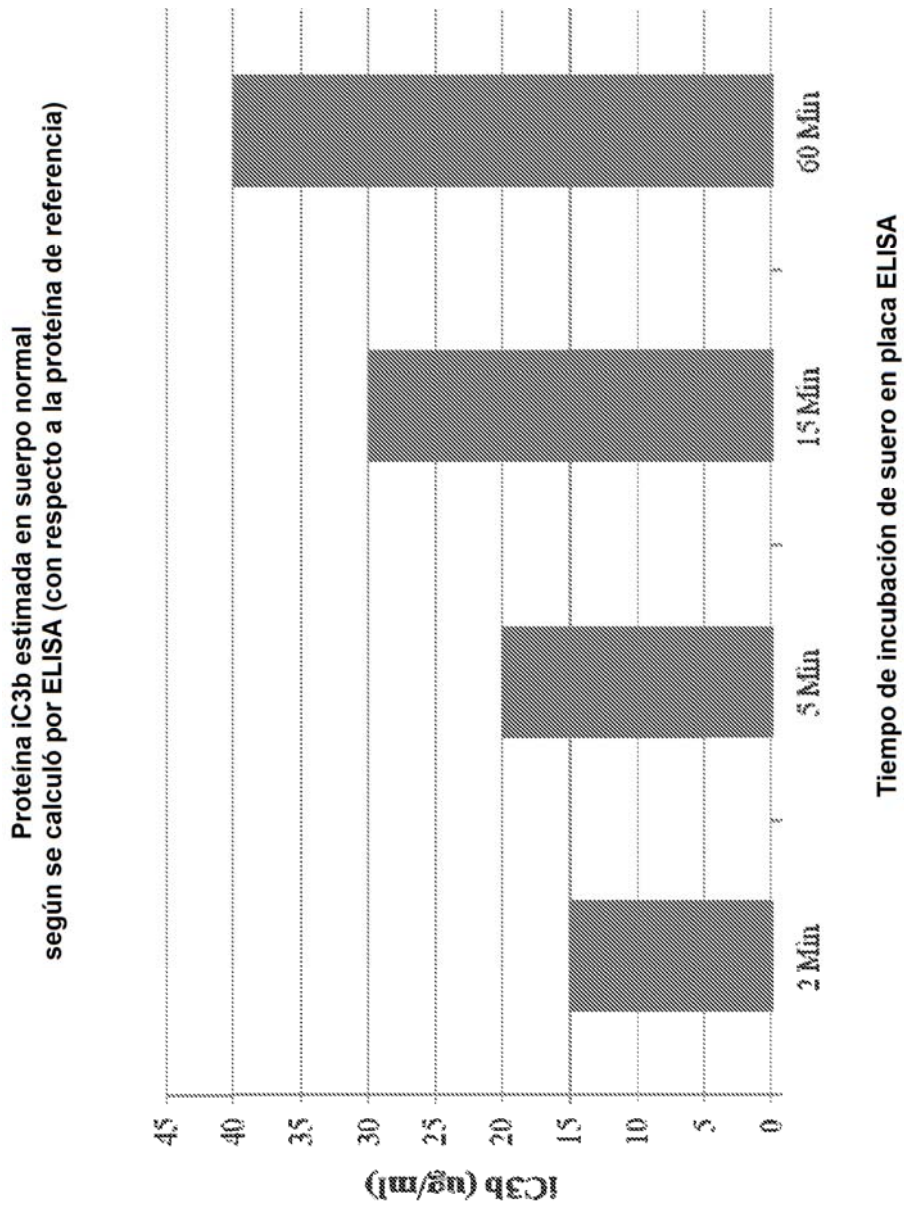


FIG. 36

Ensayo de deposición de C3: activación de C3 en ausencia de complejo de antígeno: anticuerpo

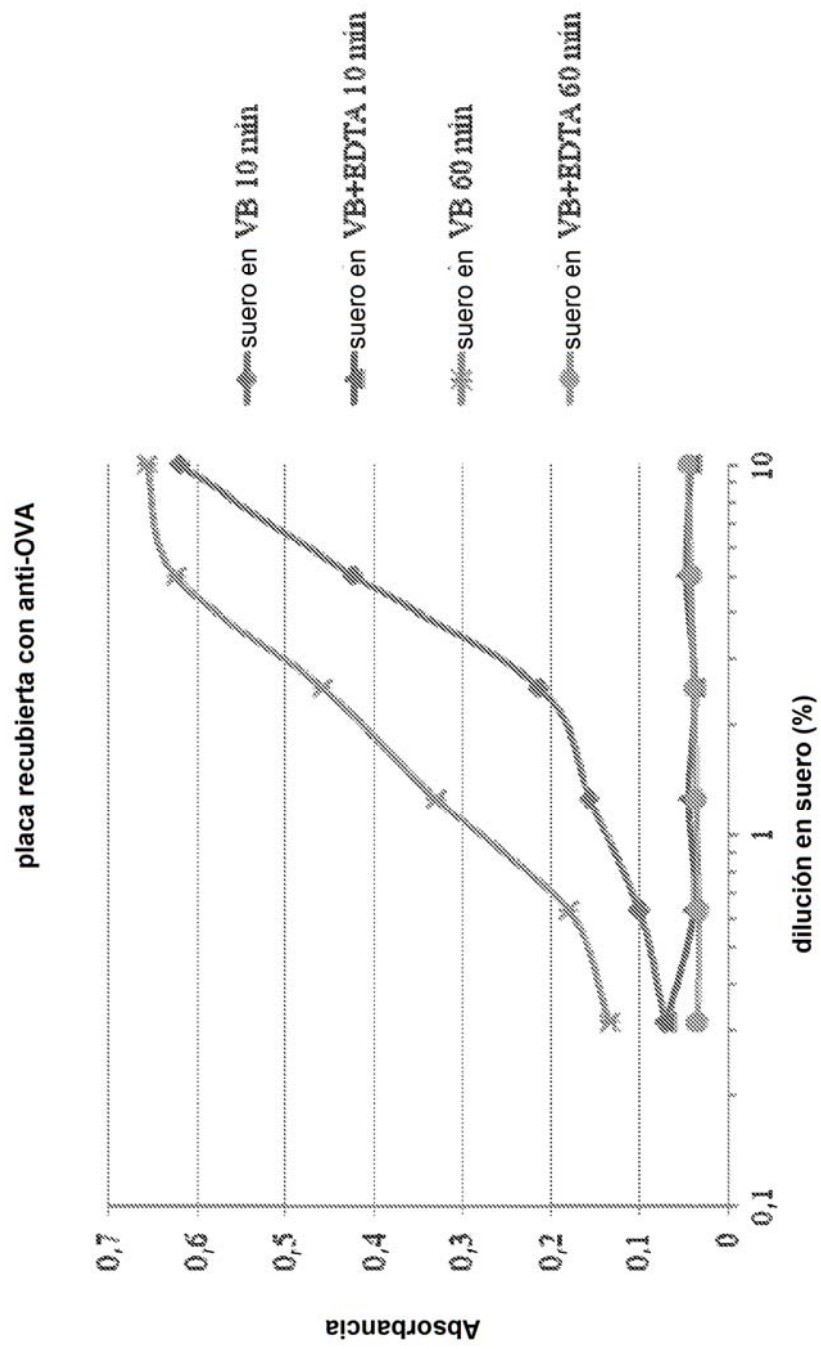


FIG.37

Ensayo de deposición de C3: activación de C3 en ausencia de pocillos recubiertos con anticuerpo

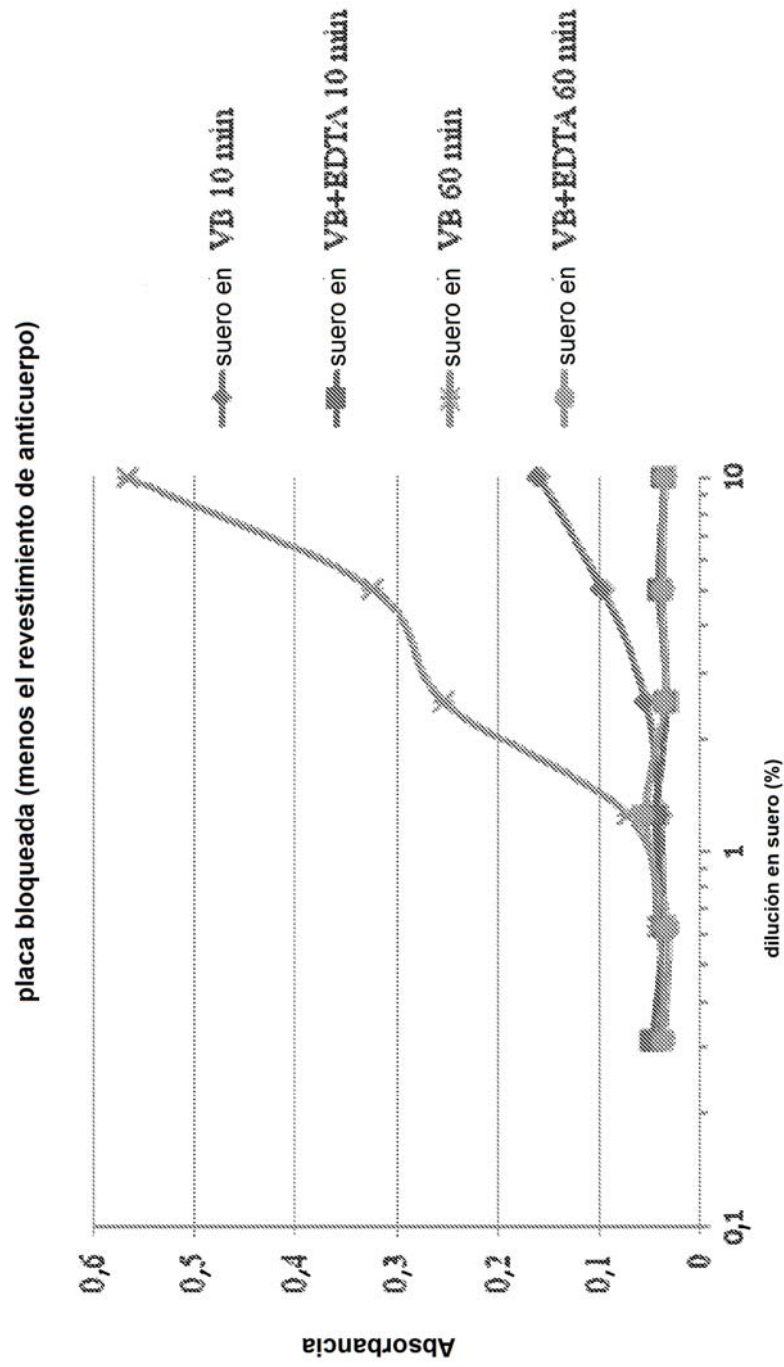


FIG.38