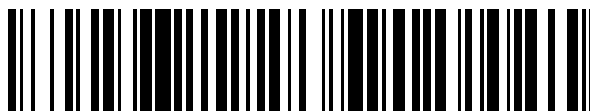


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 781**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/25

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2016 PCT/IB2016/051750**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16151557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2016 E 16717470 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3274468**

54 Título: **Un método para medir la actividad proteasa de C3 y C5 convertasa de la vía de complemento alternativa**

30 Prioridad:

25.03.2015 US 201562138235 P

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

05.08.2019

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
100 College Street
New Haven, CT 06510, US**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, KRISTA y
FORBES, CHRISTEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 721 781 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

Un método para medir la actividad proteasa de C3 y C5 convertasa de la vía de complemento alternativa

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere a los campos de la inmunología y más específicamente, a la vía de complemento alternativa

10 Antecedentes

La vía alternativa del sistema de complemento desempeña un papel en los procesos inmunológicos, inflamatorios, de coagulación, así como neurodegenerativos. Está implicada en varias enfermedades humanas, tales como degeneración macular asociada a la edad, septicemia, cáncer, hemoglobinuria paroxística nocturna ("PNH") y el síndrome urémico hemolítico atípico ("aHUS"). Un fármaco dirigido al complemento, un anticuerpo terapéutico contra C5 (Soliris, Alexion), es el primer tratamiento aprobado para la PNH y el aHUS.

La vía alternativa está basada en una serie de etapas enzimáticas que culminan en la escisión de los componentes de complemento C3 en los productos de escisión C3a, C3b y C5 en C5a y C5b, por medio de las C3 y C5 convertasas, respectivamente. Los reguladores de la vía alternativa pueden, entre otras cosas, prevenir o facilitar la formación y la actividad de las C3 y C5 convertasas.

Los métodos para estudiar las C3 y C5 convertasas y su regulación normalmente requieren la unión a partículas tales como zimosano o eritrocitos y el uso de suero como fuente de proteínas de complemento. Sin embargo, el suero está poco definido y la reproducibilidad experimental puede resentirse.

Existe la necesidad de desarrollar métodos mejorados para estudiar el sistema de complemento *in vitro* y para identificar reguladores del sistema de complemento que pueden usarse para desarrollar nuevos fármacos.

30 Sumario

Las realizaciones divulgadas en el presente documento resuelven el problema analizado anteriormente proporcionando métodos para medir la actividad proteasa de los componentes de complemento C5 y C3 convertasa y el factor D en un tampón de ensayo asérico. La divulgación también proporciona kits para medir la actividad proteasa de C5 y C3 convertasa y de factor D.

Una realización proporciona un método para medir la actividad proteasa de C5 convertasa. El método comprende una etapa de unir covalentemente biotina a C3b para producir C3b biotinilado. El C3b biotinilado está unido a una proteína de unión a biotina, que está inmovilizada sobre una fase sólida. La fase sólida se incuba en presencia de factor D y de factor B en un tampón asérico y sin gelatina para formar una C5 convertasa. Se transfiere C5 al tampón, dando como resultado la escisión de C5 por la C5 convertasa para formar C5a y C5b. La cantidad de C5a puede medirse con un inmunoensayo. Los componentes individuales, bio-C3b, factor B, factor D y C5 son sustancialmente homogéneos.

Ciertas realizaciones proporcionan un método para medir la actividad proteasa de C3 convertasa. El método comprende una etapa de unir covalentemente biotina a C3b para producir C3b biotinilado. C3b biotinilado se une a una proteína de unión a biotina que se inmoviliza sobre una fase sólida, que se incuba en presencia de factor D y de factor B en un medio asérico y sin gelatina para formar una C3 convertasa. Se transfiere C3 al tampón, dando como resultado la escisión de C3 por la C3 convertasa para formar C3a y C3b. La cantidad de C3a se mide con un inmunoensayo. Los componentes individuales, bio-C3b, factor B, factor D y C3 son sustancialmente homogéneos.

Otras realizaciones concretas proporcionan un kit para medir la actividad proteasa de C5 convertasa en un tampón asérico y sin gelatina usando componentes sustancialmente homogéneos de la vía de complemento alternativa. El kit comprende (i) C3b biotinilado sustancialmente homogéneo; (ii) una fase sólida recubierta con una proteína de unión a biotina; (iii) factor B, factor D y C5 sustancialmente homogéneos; y, (iv) un anticuerpo anti-C5a.

Ciertas realizaciones proporcionan un kit para medir la actividad proteasa de C3 convertasa en un tampón asérico y sin gelatina usando componentes sustancialmente homogéneos de la vía de complemento alternativa. El kit comprende: (i) C3b biotinilado sustancialmente homogéneo; (ii) una fase sólida recubierta con una proteína de unión a biotina; (iii) factor B, factor D y C3 sustancialmente homogéneos; y, (iv) un anticuerpo anti-C3a.

Se proporcionan numerosos aspectos diferentes de acuerdo con estos y otros aspectos de la presente divulgación. Otras características y aspectos de la presente divulgación resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada

Breve descripción de las figuras

- 5 La Fig. 1 es una representación esquemática de la vía alternativa de la cascada de complemento.
 La Fig. 2 (a) es una ilustración esquemática del método para medir la actividad de C5 convertasa en esferas.
 La Fig. 2 (b) es una ilustración esquemática del método para medir la actividad de C5 convertasa en un pocillo de microplaca.
 La Fig. 3 es una representación esquemática que ilustra un método para medir la actividad proteasa de factor D
 10 usando factor B como sustrato.
 La Fig. 4 es una ilustración esquemática de un método para detectar la actividad proteasa de factor D por su sustrato natural, el factor B con un biosensor.
 La Fig. 5 es un diagrama de barras, que muestra que la actividad de C5 convertasa es dependiente de la presencia de bio-C3b.
 15 La Fig. 6 es una gráfica, que muestra que la actividad de proteasa de C5 convertasa aumentó a medida que se tituló la cantidad de bio-C3b de 0,4 pmol a 25 pmol por pocillo de una microplaca recubierta con estreptavidina.
 La Fig. 7 es una gráfica, que muestra que la actividad del factor D se inhibió a altas concentraciones de anhídrido isoatoico.
 La Fig. 8 es un registro de un biosensor de interferometría de biocapa ("BLI") recubierta con estreptavidina que muestra la escisión por factor D del factor B y la inhibición del factor D mediante 3,4-dicloroisocoumarina ("DCIC").
 20 La Fig. 9 es una gráfica que muestra una curva de respuesta a la dosis de la inhibición por DCIC del factor D.
 La Fig. 10 (a) es una gráfica que muestra que la tasa de actividad de C5 convertasa en las esferas era dependiente de la concentración de su sustrato, C5.
 La Fig. 10 (b) es una gráfica que muestra que la tasa de actividad de C5 convertasa en las microplacas era dependiente de la concentración de su sustrato, C5.
 25 La Fig. 11 es una gráfica que muestra que a medida que se tituló OmCI de 0 a 200 nM, se redujo la actividad de C5 convertasa.
 La Fig. 12 (a) es una gráfica, que ilustra que la actividad convertasa en las esferas fue mayor a mayores concentraciones de factor B.
 La Fig. 12 (b) es una gráfica, que ilustra que la actividad convertasa en las microplacas fue mayor a mayores concentraciones de factor B.
 30 La Fig. 13 es una gráfica, que ilustra que a medida que se aumentó la concentración de factor D, aumentó la actividad de C5 convertasa.
 La Fig. 14 es una gráfica, que ilustra que la actividad de C5 es dependiente de la concentración de bio-C3b.
 35 La Fig. 15 es un diagrama de barras, que ilustra que la actividad de C5 convertasa se redujo a medida que se tituló la concentración de bio-C3b de 0,8x, hasta 0,1x de la capacidad de unión a biotina total de las esferas recubiertas de estreptavidina.
 La Fig. 16 es una gráfica, que ilustra que el NiCl₂ es necesario para la actividad de C5 convertasa.

40 Definiciones

Como se usa en el presente documento, la palabra "un/uno" o "pluralidad" antes de un sustantivo representa uno o más del sustantivo en concreto. Por ejemplo, la frase "una célula de mamífero" representa "una o más células de mamífero".

- 45 El término "homogéneo" o "sustancialmente homogéneo", aplicado a un componente de la vía de complemento alternativa significa que el componente está libre o sustancialmente libre de proteínas contaminantes. El alcance de la homogeneidad puede determinarse mediante técnicas tales como electroforesis en gel u otros métodos bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Un componente de complemento que es homogéneo en más del 90 % tiene menos de un 10 % de proteínas contaminantes en una base de pmol por pmol. Un componente de complemento que es homogéneo en más del 95 % tiene menos de un 5 % de proteínas contaminantes en una base de pmol por pmol. Un componente de complemento que es homogéneo en más del 99 % tiene menos de un 1 % de proteínas contaminantes en una base de pmol por pmol.

- 55 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente y se conocen en la técnica y pueden significar cualquier cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, independientemente de la longitud de la modificación postraducciona.

- El término "anticuerpo" se conoce en la técnica. En resumen, puede referirse a un anticuerpo completo que comprende dos polipéptidos de cadena ligera y dos polipéptidos de cadena pesada. Los anticuerpos completos incluyen diferentes isotipos de anticuerpo que incluyen anticuerpos IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo primatizado, un anticuerpo desinmunizado y un anticuerpo completamente humano. El anticuerpo puede producirse en o proceder de cualquiera de una variedad de especies, por ejemplo, mamíferos tales como seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, orangután, babuinos o chimpancés), caballos, vacas,

cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsteres, ratas y ratones. El anticuerpo puede ser un anticuerpo purificado o recombinante.

El término "anticuerpo" incluye "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno" o términos similares que se conocen en la técnica y puede, por ejemplo, referirse a un fragmento de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse a un antígeno diana (por ejemplo, C5 humano) e inhibir la actividad del antígeno diana. Dichos fragmentos incluyen, por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv monocatenario (scFv), un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂. Un fragmento scFv es una sola cadena de polipéptido que incluye las regiones variables tanto de cadena pesada como de cadena ligera del anticuerpo del que procede el scFv. Además, en la definición de anticuerpo también se incluyen intracuerpos, minicuerpos, triacuerpos y diacuerpos y son compatibles para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Todorovska et al. (2001) *J Immunol Methods* 248(1):47-66; Hudson y Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231(1):177-189; Poljak (1994) *Structure* 2(12):1121-1123; Rondon y Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51:257-283. Un fragmento de unión a antígeno también puede incluir la región variable de un polipéptido de cadena pesada y la región variable de un polipéptido de cadena ligera. Por lo tanto, un fragmento de unión a antígeno puede comprender las CDR del polipéptido de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo. Para un análisis detallado acerca de la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de los protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n.º 0 598 877; las patentes de los Estados Unidos n.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598.

La expresión "fragmento de anticuerpo" también puede incluir, por ejemplo, anticuerpos de un solo dominio, tales como anticuerpos camelizados de un solo dominio. Véanse, por ejemplo, Muyldermans et al. (2001) *Trends Biochem Sci* 26:230-235; Nuttall et al. (2000) *Curr Pharm Biotech* 1:253-263; Reichmann et al. (1999) *J Immunol Meth* 231:25-38; las publicaciones de solicitud PCT n.º WO 94/04678 y WO 94/25591; y la patente de los Estados Unidos n.º 6.005.079. La expresión "fragmento de anticuerpo" también incluye anticuerpos de un solo dominio que comprenden dos dominios V_H con modificaciones, de tal forma que se forman los anticuerpos de un solo dominio.

El término "anticuerpo" también se refiere a anticuerpos monoclonales obtenidos de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea. Es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. No debe interpretarse que el modificador "monoclonal" requiera la producción del anticuerpo por cualquier método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito originariamente por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975) o puede producirse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de fagotecas de anticuerpo usando las técnicas descritas en Clarkson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) o Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

El término "k_a" se conoce bien en la técnica y puede referirse a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo a un antígeno. El término "k_d" también se conoce bien en la técnica y puede referirse a la constante de velocidad para la disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno. Y el término "K_D" se conoce en la técnica y puede referirse a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno. La constante de disociación en equilibrio se deduce a partir de la relación de las constantes de velocidad cinéticas, K_D = k_a/k_d. Dichas determinaciones se miden normalmente a, por ejemplo, 25 °C o 37 °C. Por ejemplo, puede determinarse la cinética de la unión del anticuerpo a C5 humano a pH 8,0, 7,4, 7,0, 6,5 y 6,0 mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 usando un método de captura anti-Fc para inmovilizar el anticuerpo.

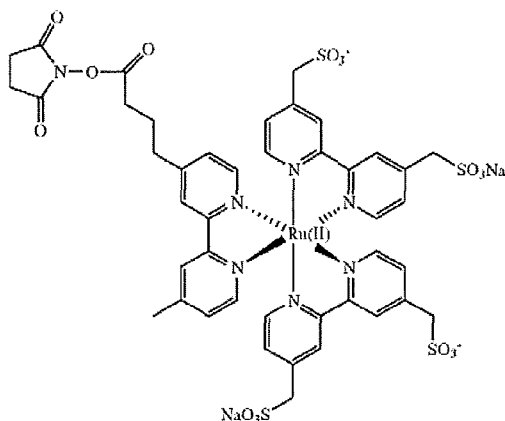
El término "CI₅₀" se conoce bien en la técnica y es una medida de la eficacia de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica. La CI₅₀ es la concentración de la sustancia a la cual se inhibe un 50 % de la actividad de la función biológica.

El término "asérico" se conoce bien en la técnica y se refiere a un medio o tampón preparado sin el uso de suero animal. La expresión "libre de gelatina" se refiere a un medio o tampón preparado sin gelatina.

La expresión "proteína de unión a biotina" o "BBP" se refiere a proteínas que tienen una alta afinidad por la biotina, tales como avidina, estreptavidina o neutravidina. La unión entre biotina y una BBP, tal como estreptavidina, es la interacción no covalente más fuerte conocida entre una proteína y su ligando. En general, la K_d entre una BBP y la biotina es de aproximadamente 10⁻¹⁴ a aproximadamente 10⁻¹⁵ M.

El término "complejo", cuando se usa para describir una interacción proteína: proteína o proteína:ligando, tal como aquella entre biotina y una BBP, se refiere a un estado físico en el que la proteína:proteína o el ligando:proteína están estrechamente asociados en una interacción de unión.

El término "SULFO-TAG™" se refiere a un reactivo de amina, éster de N-hidroxisuccinimida, que se acopla fácilmente a los grupos amina primarios de las proteínas en condiciones levemente básicas para formar un enlace de amida estable y que tiene la estructura:



Normalmente, el reactivo SULFO-TAG™ se usa para modificar biomoléculas para la medición de electroluminiscencia. Véanse las patentes de los Estados Unidos n.º 7.063.946 y 8.192.926; las solicitudes de patente de los Estados Unidos n.º 2013/0011860 y 2011/0263451.

El término "electroluminiscencia" o "ECL" es un proceso que usa marcadores diseñados para emitir luz cuando se estimulan electroquímicamente. La generación de luz se produce cuando se aplica un bajo voltaje a un electrodo, desencadenando una reacción de oxidación y reducción cíclica de un ion de metal pesado, tal como rutenio. Un segundo componente de la reacción es un transportador de electrones, tal como la tripropilamina, que media la reacción redox. Debido a que el quelato de metal se recicla y el transportador está presente en exceso, la señal generada por el ensayo se intensifica. La reacción de ECL se desencadena tras la aplicación de un potencial eléctrico.

Los términos "inmovilizado" o "unido" abarcan todos los mecanismos para la unión de anticuerpos y proteínas. Dichos mecanismos incluyen todos los mecanismos de unión de receptor-ligando, unión de anticuerpo-hapteno, unión covalente, unión no covalente, acoplamiento químico, absorción por interacciones hidrófobas/hidrófobas, electrostáticas hidrófilas/hidrófilas o iónicas y similares.

La expresión "fase sólida" se refiere a un material insoluble al que puede unirse o inmovilizarse un componente. La fase sólida incluye normalmente, sin limitación, cualquier superficie comúnmente usada en inmunoensayos. Por ejemplo, la fase sólida puede incluir los pocillos de la microplaca, esferas o micropartículas, hechas de polímeros de hidrocarburos, tales como poliestireno y polipropileno, vidrio, metales, geles u otros materiales, las paredes de tubos de ensayo o membranas.

El término "microplaca", como se usa a lo largo de la memoria descriptiva, se refiere a una placa plana con múltiples "pocillos" usados como pequeños tubos de ensayo. Las microplacas también se conocen en la técnica como placas de microtitulación, placas de micropocillos o placas multipocillo. Las microplacas tienen normalmente 6, 24, 96, 384 o 1536 pocillos de muestra dispuestos frecuentemente en una matriz rectangular 2:3. Se han fabricado algunas microplacas con 3456 o 9600 pocillos. Las microplacas pueden referirse a productos de tipo "cinta de matriz" que se han desarrollado que proporcionan una tira continua de microplacas grabadas sobre una cinta de plástico flexible.

Las microplacas pueden fabricarse de una variedad de materiales, tales como poliestireno, polipropileno, policarbonato, vidrio, cuarzo o cicloolefinas. Las microplacas pueden colorearse para la detección de la absorbancia óptica o la luminiscencia o negras para ensayos biológicos luminiscentes.

El término "esferas", como se usa a lo largo de la memoria descriptiva, incluye partículas que tienen una forma esférica y generalmente tienen un diámetro de entre aproximadamente 0,01 µm y aproximadamente 100 µm. El término abarca partículas que se denominan en la técnica como microesferas y nanoesferas. Las esferas pueden fabricarse de una gran variedad de materiales, incluyendo cerámica, vidrio, polímeros y metales. Un polímero puede ser poliestireno. Las esferas pueden estar monodispersas.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente divulgación. En el presente documento se describen métodos y materiales para su uso en la

presente divulgación; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

El sistema de complemento

El sistema de complemento actúa junto con otros sistemas inmunológicos del organismo como defensa contra la intrusión de patógenos celulares y víricos. Existen al menos 25 proteínas de complemento. Los componentes de complemento logran sus funciones defensivas inmunitarias interactuando en una serie intrincada pero precisa de eventos de escisión enzimática y de unión a membrana. La cascada de complemento resultante da lugar a la producción de productos con funciones opsonicas, inmunorreguladoras y líticas.

La cascada de complemento puede progresar a través de la vía clásica ("CP"), la vía de lectina ("LP") o la vía alternativa ("AP"). La vía de lectina se inicia normalmente con la unión de la lectina de unión a manosa ("MBL") a sustratos ricos en manosa.

La AP puede ser independiente de anticuerpo y puede iniciarse por ciertas moléculas en las superficies de los patógenos. La CP se inicia típicamente mediante reconocimiento por anticuerpos de y la unión a, un sitio antigénico en una célula diana. Estas vías convergen en la C3 convertasa - el punto donde se escinde el componente de complemento C3 mediante una proteasa activa para proporcionar C3a y C3b.

En la Fig. 1 se muestra una ilustración esquemática de la AP.

Se cree que la C3 convertasa de la AP se inicia por la hidrólisis espontánea del componente C3 de complemento, que es abundante en el plasma sanguíneo. Este proceso, también conocido como "*tickover*" (activación constitutiva a ritmo lento), se produce mediante la escisión espontánea de un enlace tioéster en C3 para formar C3i o C3(H₂O). El *tickover* se facilita por la presencia de superficies que soportan la unión de C3 activado y/o tienen características de carga neutras o positivas (por ejemplo, superficies celulares bacterianas). Esta formación de C3(H₂O) permite la unión de la proteína plasmática, factor B, que a su vez permite que el factor D escinda al factor B en Ba y Bb. El fragmento Bb permanece unido a C3 para formar un complejo que contiene C3(H₂O)Bb - la C3 convertasa de "fase fluida" o de "iniciación". Aunque solo se produce en pequeñas cantidades, la C3 convertasa en fase fluida puede escindir múltiples proteínas C3 en C3a y C3b y da como resultado la generación de C3b y su posterior unión covalente a una superficie (por ejemplo, una superficie bacteriana). El factor B unido a C3b unido a la superficie se escinde por el factor D y por lo tanto, forma el complejo de C3 convertasa de AP unido a la superficie que contiene C3b, Bb. Véase, por ejemplo, Muller-Eberhard (1988) Ann Rev Biochem 57:321-347.

Se cree que la C5 convertasa de AP se forma tras la adición de un segundo monómero de C3b a la C3 convertasa de AP. Véanse, por ejemplo, Medicus et al. (1976) J Exp Med 144:1076-1093 y Fearon et al. (1975) J Exp Med 142:856-863. Se cree que el papel de la segunda molécula de C3b es unirse a C5 y presentarlo para su escisión por la C5 convertasa. Véase, por ejemplo, Isenman et al. (1980) J Immunol 124:326-331. Las C3 y C5 convertasas de AP se estabilizan mediante la adición de la proteína trimérica properdina, como se describe en, por ejemplo, Medicus et al. (1976), *anteriormente citado*. Sin embargo, no es necesaria la unión de properdina para formar una C3 o C5 convertasa de la vía alternativa funcional. Véanse, por ejemplo, Schreiber et al. (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75: 3948-3952 y Sissons et al. (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77: 559-562.

Además de su papel en las C3 y C5 convertasas, C3b también funciona como una opsonina mediante su interacción con los receptores de complemento presentes en las superficies de células presentadoras de antígenos, tales como macrófagos y células dendríticas. La función opsonica de C3b se considera generalmente una de las funciones antiinfecciosas más importantes del sistema de complemento. Los pacientes con lesiones genéticas que bloquean la función de C3b son propensos a las infecciones por una gran variedad de organismos patógenos, mientras que los pacientes con lesiones posteriores en la secuencia de la cascada de complemento, es decir, pacientes con lesiones que bloquean las funciones de C5, son más propensos únicamente a la infección únicamente por *Neisseria* y tan solo propensos hasta cierto punto.

La C5 convertasa de AP escinde a C5, que es una beta globulina de 190 kDa que se encuentra en el suero humano normal a aproximadamente 75-100 µg/ml (0,4-0,5 µM). C5 se encuentra glucosilado, atribuyéndose un 1,5-3 por ciento de su masa a carbohidratos. C5 maduro es un heterodímero de cadena alfa de 999 aminoácidos de 115 kDa que está unido por disulfuro a una cadena beta de 655 aminoácidos de 75 kDa. C5 se sintetiza como un producto de proteína precursor monocatenario de una sola copia de gen (Haviland et al. (1991) J Immunol. 146: 362-368). La secuencia de ADNc del transcrito de este gen humano predice un precursor de pro-C5 secretado de 1658 aminoácidos junto con una secuencia líder de 18 aminoácidos. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 6.355.245.

El precursor de pro-C5 se escinde después de los aminoácidos 655 y 659, para proporcionar la cadena beta en forma de un fragmento amino terminal (restos de aminoácido +1 a 655 de la secuencia anterior) y la cadena alfa en forma de un fragmento carboxilo terminal (restos de aminoácido 660 a 1658 de la secuencia anterior), eliminándose cuatro aminoácidos (restos de aminoácido 656-659 de la secuencia anterior) entre ambos.

- C5a se escinde de la cadena alfa de C5 por la C5 convertasa tanto alternativa como clásica en forma de un fragmento amino terminal que comprende los primeros 74 aminoácidos de la cadena alfa (es decir, los restos de aminoácido 660-733 de la secuencia anterior). Aproximadamente un 20 por ciento de la masa de 11 kDa de C5a se atribuye a carbohidratos. El sitio de escisión para la acción de la convertasa se encuentra en o inmediatamente adyacente a, Arg en el resto de aminoácido 733. Un compuesto que pueda unirse o que se encuentre adyacente a este sitio de escisión podría tener el potencial de bloquear el acceso de las enzimas C5 convertasas al sitio de escisión y de este modo, actuar como inhibidor del complemento. Un compuesto que se une a C5 en un sitio distal al sitio de escisión también podría tener el potencial de bloquear la escisión de C5, por ejemplo, mediante inhibición mediada por impedancia estérica de la interacción entre C5 y la C5 convertasa. Un compuesto, en un mecanismo de acción consistente con el del inhibidor de complemento de la saliva de la garrapata, inhibidor C de *Ornithodoros moubata* C ("OmCI") (que es una proteína de unión a C5 que puede usarse en los métodos de la presente divulgación), también puede prevenir la escisión de C5 reduciendo la flexibilidad del dominio C345C de la cadena alfa de C5, que reduce el acceso de la C5 convertasa al sitio de escisión de C5. Véase, por ejemplo, Fredslund et al. (2008) Nat Immunol 9(7):753-760.
- C5 también puede activarse por medios distintos a la actividad de C5 convertasa. La digestión limitada con tripsina (véase, por ejemplo, Minta y Man (1997) J Immunol 119:1597-1602 y Wetsel y Kolb (1982) J Immunol 128:2209-2216) y el tratamiento con ácido (Yamamoto y Gewurz (1978) J Immunol 120:2008 y Damerau et al. (1989) Molec Immunol 26:1133-1142) también pueden escindir a C5 y producir C5b activo.
- La escisión de C5 libera C5a, una potente anafilotoxina y factor quimotáctico y da lugar a la formación del complejo de complemento terminal lítico, C5b-9. C5a y C5b-9 también tienen propiedades activadoras celulares pleiotrópicas, mediante la amplificación de la liberación de factores inflamatorios aguas abajo, tales como enzimas hidrolíticas, especies de oxígeno reactivo, metabolitos del ácido araquidónico y diversas citocinas.
- La primera etapa en la formación del complejo de complemento terminal implica la combinación de C5b con C6, seguido de C7 y C8 para formar el complejo C5b-8 en la superficie de la célula diana. Tras la unión del complejo C5b-8 con varias moléculas de C9, se forma el complejo de ataque a membrana ("MAC", C5b-9, complejo de complemento terminal - "TCC"). Cuando se insertan números suficientes de MAC en las membranas de las células diana, se crean aberturas (poros de MAC) y se media una rápida lisis osmótica de las células diana. Las concentraciones menores no líticas de los MAC pueden producir otros efectos. En particular, la inserción en la membrana de pequeños números de los complejos C5b-9 en las células endoteliales y plaquetas puede provocar una activación celular perjudicial. En algunos casos, la activación puede preceder a la lisis celular.
- C3a y C5a son anafilotoxinas. Estos componentes activados del complemento pueden desencadenar la desgranulación de mastocitos, lo que libera histamina por los basófilos y mastocitos y otros mediadores de la inflamación, dando como resultado la contracción del músculo liso, una permeabilidad vascular aumentada, activación de leucocitos y otros fenómenos inflamatorios, incluyendo proliferación celular, dando como resultado hiperplasia. C5a también funciona como péptido quimiotáctico que sirve para atraer a los granulocitos proinflamatorios al sitio de activación del complemento.
- Los receptores de C5a se encuentran sobre las superficies de las células epiteliales bronquiales y alveolares y en las células de músculo liso bronquiales. También se han encontrado receptores de C5a en eosinófilos, mastocitos, monocitos, neutrófilos y linfocitos activados.
- Aunque un sistema de complemento que funciona adecuadamente proporciona una robusta defensa contra los microbios infecciosos, se ha relacionado la regulación o activación inadecuada del complemento con la patogénesis de una variedad de trastornos, incluyendo, por ejemplo, artritis reumatoide ("RA"); nefritis lúpica; asma; lesión por isquemia-reperfusión; síndrome urémico hemolítico atípico ("aHUS"); enfermedad por depósitos densos ("DDD") hemoglobinuria paroxística nocturna ("PNH"); degeneración macular (por ejemplo, degeneración macular asociada a la edad ("AMD")); síndrome de hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y bajas plaquetas ("HELLP"); púrpura trombocitopénica trombótica ("TTP"); pérdida fetal espontánea; vasculitis inmunitaria de Pauci; epidermolisis ampollosa; pérdida fetal recurrente; esclerosis múltiple ("MS"); lesión cerebral traumática; y lesión resultante de un infarto de miocardio, derivación cardiopulmonar y hemodiálisis. Véase, por ejemplo, Holers et al. (2008) Immunological Reviews 223:300-316. Se ha demostrado que la inhibición del complemento (por ejemplo, inhibición de la formación terminal de complemento, escisión de C5 o activación del complemento) es eficaz para tratar trastornos asociados con el complemento, tanto en modelos animales como en seres humanos. Véanse, por ejemplo, Rother et al. (2007) Nature Biotechnology 25(11):1256-1264; Wang et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:8563-8568; Wang et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:8955-8959; Rinder et al. (1995) J Clin Invest 96:1564-1572; Kroshus et al. (1995) Transplantation 60:1194-1202; Homeister et al. (1993) J Immunol 150:1055-1064; Weisman et al. (1990) Science 249:146-151; Amsterdam et al. (1995) Am J Physiol 268:H448-H457; y Rabinovici et al. (1992) J Immunol 149:1744.

Métodos para medir la actividad proteasa de los componentes de la AP

Una realización proporciona un método para medir la actividad proteasa de una convertasa inmovilizada sobre una fase sólida, tal como una esfera o una microplaca. La convertasa puede ser una C3 o una C5 convertasa. Como se muestra en la Fig. 2 (a) y la Fig. 2 (b), C3b modificado con biotina ("bio-C3b") se combina generalmente con una fase sólida recubierta de BBP para formar un complejo que inmoviliza a bio-C3b sobre una fase sólida recubierta con las BBP. En algunas realizaciones, la fase sólida puede ser una esfera y en otras realizaciones, una microplaca. En una realización particular, la fase sólida recubierta con bio-C3b se incuba posteriormente con los factores D y B sustancialmente homogéneos en un tampón asérico y libre de gelatina para formar la convertasa. La adición del componente de complemento C3 o C5 da como resultado la escisión por la convertasa para formar C3a o C5a, respectivamente. La cantidad de C3a o C5a puede medirse mediante un ELISA o un ensayo de tipo ELISA, tal como el ensayo ECL de MesoScale Discovery (MSD).

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para medir la actividad proteasa del factor D por su sustrato natural, el factor B. Como se muestra en la Fig. 3, el bio-C3b se une generalmente a una fase sólida recubierta con BBP, seguido de la unión del factor B al bio-C3b inmovilizado. El factor D escinde generalmente al factor B en los fragmentos Ba y Bb y el Ba soluble se disocia del complejo de bio-C3b-Bb. La cantidad de Bb unido a la fase sólida puede medirse con ELISA o MSD.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de uso de un biosensor para medir la velocidad de proteólisis por el factor D del factor B. En la Fig. 4 se representa esquemática un método particular. Bio-C3b, el factor B y Ni^{+2} se incuban generalmente con un biosensor recubierto con BBP para formar un complejo de 269 kDa en la superficie del biosensor. Como se muestra en la Fig. 4, el factor D añadido escinde al factor B en sus fragmentos Ba y Bb. La formación del complejo Bb:bio-C3b puede detectarse con un anticuerpo anti-Bb de ratón para un neopéptido, que tiene una elevada afinidad por Bb, pero una baja afinidad por el factor B. En general, el biosensor detecta los eventos de unión y disociación en su superficie y genera una señal en respuesta a la unión. Los datos generados a partir de la unión de proteínas pueden usarse para calcular los coeficientes cinéticos y los valores de CI_{50} de los inhibidores del factor D.

Componentes homogéneos de la AP

En general, las diversas realizaciones usan componentes de la AP sustancialmente homogéneos, incluyendo C3b, factor B, factor D, C3 y C5. Los componentes de la AP pueden aislarse de plasma humano o pueden producirse de manera recombinante y purificarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véanse las patentes de los Estados Unidos n.º 7.858.087 y 6.221.657. Se encuentran disponibles componentes sustancialmente homogéneos de la AP de CompTech, QUIDEL™, BIOPUR AG y SIGMA-ALDRICH® y otros.

En general, los componentes de la AP son homogéneos en más de aproximadamente un 90 %. Con frecuencia, son homogéneos en más de aproximadamente un 95 %. Los componentes de la AP pueden ser homogéneos en más de aproximadamente un 99 %.

Bio-C3b inmovilizado sobre una fase sólida

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona bio-C3b unido a una BBP inmovilizada sobre una fase sólida, tal como esferas o una microplaca.

La biotina es una coenzima para enzimas carboxilasas implicada en la síntesis de ácidos grasos, isoleucina y valina y en la gluconeogénesis. Tiene una cadena lateral de ácido valérico que se usa con frecuencia como punto de unión para la modificación de proteínas. Al derivatizar la cadena lateral ácida con diversos grupos reactivos, la biotina puede modificar de manera no específica a las cadenas laterales de amina, sulfhidrilo y ácido carboxílico de las proteínas. Pueden usarse brazos espaciadores de polietilenglicol para aumentar la distancia entre la biotina y el grupo reactivo, lo que puede facilitar la unión de biotina a las BBP.

Las proteínas pueden biotinilarse usando protocolos establecidos bien conocidos en la técnica. Véase la patente de los Estados Unidos n.º 4.582.810 y el folleto titulado "Determine reactivity of NHS ester biotinylation and crosslinking reagents", THERMOSCIENTIFIC (2008).

En general, la modificación de C3b para formar bio-C3b implica la incubación de un análogo de biotina reactivo con C3b sustancialmente homogéneo. Normalmente, el análogo de biotina reactivo es un análogo de biotina de N-hidroxisuccinamida que reacciona con aminas primarias. Un análogo particular es NHS-(PEG)₄-biotina (ThermoFisher). El ajuste de la relación molar de biotina a C3b puede controlar el alcance del marcaje. Frecuentemente, la relación molar de biotina a C3b puede variar de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 2:1. En una realización, la relación es de aproximadamente 5:1. La reacción se lleva a cabo típicamente en una solución acuosa con un tampón no reactivo, tal como suero salino tamponado con fosfato ("PBS") o un tampón de carbonato-bicarbonato. De manera óptima, el pH varía de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, normalmente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0. Normalmente, el pH es de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,6. La temperatura de la reacción puede

variar de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 23 °C. El tiempo varía normalmente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 minutos. Bio-C3b se usa sin purificación y puede almacenarse a -80 °C hasta que se necesita.

- 5 La modificación de C3b con un análogo de biotina puede llevarse a cabo con kits disponibles comercialmente. Los kits representativos incluyen EZ-LINK (Pierce); LIGHTNING- LINK® (Innova Biosciences Ltd.); y TSA™ Plus Biotin Kits (PerkinElmer).

Bio-C3b recubierto sobre una fase sólida

- 10 En una realización, se inmovilizará bio-C3b sobre una fase sólida recubierta con BBP. La fase sólida puede ser cualquier superficie comúnmente usada en inmunoensayos, sobre los que se ha recubierto BBP. La fase sólida puede incluir esferas, una placa de micropocillos o un biosensor.

- 15 Se conocen bien en la técnica procedimientos de recubrimiento de BBP y generalmente implican o adsorción pasiva o acoplamiento covalente. Véase SPHERO™ Technical Note, STN-1 Rev C. 041106, "Particle Coating Procedures"; patentes de los Estados Unidos n.º 6.270.983 y 5.061.640. En general, un BBP, tal como estreptavidina, se adsorberá de manera permanente sobre poliestireno o puede acoplarse covalentemente a una superficie del portador.

- 20 Se encuentran disponibles comercialmente esferas y microplacas recubiertas con BBP. Se comercializan esferas recubiertas representativas con el nombre comercial de nanopartículas SPHERO™ (Spherotech), DYNAMICROSPHERES® (Life Technologies) y NANOLINR™ (SOLULINK™). Se comercializan microplacas recubiertas representativas con el nombre comercial STREPTAVIDIN GOLD™ (Meso Scale Design), SIG- MASCREE™ (Sigma-Aldrich) y FLASHPLATE® PLUS (PerkinElmer).

- 25 Durante la unión de bio-C3b a BBP, las esferas recubiertas de BBP se alojan en un tubo de microcentrifugación, que permite el intercambio del tampón sedimentando las esferas por centrifugación y resuspendiéndolas en un tampón de lavado.

- 30 La unión de bio-C3b a las esferas recubiertas de BBP implica generalmente, en primer lugar, lavar las esferas para retirar los contaminantes de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces, con una solución de tampón-detergente ("tampón de lavado"), tal como PBS 0,1 M, pH 7,4, Tween-20 al 0,5 % o Tris 10 mM, pH = 8, Tween-20 al 0,5 %.

- 35 Después, se incuban las esferas con bio-C3b. Las esferas se encuentran a una concentración de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml o de aproximadamente 500 µg/ml a aproximadamente 80 µg/ml. En una realización particular, la concentración de las esferas es de aproximadamente 200 µg/ml. El bio-C3b se encuentra a una concentración de aproximadamente 30 a aproximadamente 5000 nM, normalmente de aproximadamente 300 nM, en Tris 10 mM, pH 8,0. Normalmente se emplean temperaturas moderadas y constantes, por lo general, es suficiente la temperatura ambiente. El tiempo de incubación es de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos. Después de la reacción de unión, las esferas se lavan de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces, normalmente 3 veces, con un volumen adecuado de tampón de lavado. Los pmol de bio-C3b unido a las microesferas dependerá del tamaño de las microesferas.

- 45 Para recubrir las microplacas con bio-C3b, los pocillos se lavan de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces con un volumen adecuado de un tampón de lavado. Puede añadirse directamente a cada pocillo bio-C3b a una concentración de aproximadamente 15 nM en Tris 10 mM, pH 8,0 y se incuban a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos. Después, se lavan los pocillos de la microplaca de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces, normalmente 3 veces, con un volumen adecuado de tampón de lavado.

- 50 Normalmente, una microplaca de 96 pocillos tendrá de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 25 pmol, normalmente aproximadamente 0,4 pmol, de bio-C3b inmovilizado sobre la superficie de cada pocillo.

En general, las esferas o las placas de bio-C3b se usan inmediatamente.

- 55 Medición de la actividad proteasa de C5 convertasa

Generalmente, se añade a la superficie recubierta con bio-C3b una solución, denominada "solución de convertasa", que comprende los factores D y B y un catión divalente, para formar la C5 convertasa.

- 60 Normalmente, la solución de convertasa incluye factor D a una concentración de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 nM. Como alternativa, la concentración de factor D es de aproximadamente 10 nM.

- 65 En general, la concentración de factor B es de aproximadamente 1 a aproximadamente 1500 nM. En una realización, el factor B se encuentra a una concentración de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 nM. En otra realización, la concentración de factor B es de aproximadamente 400 nM para las esferas de bio-C3b y de 50 nM para bio-C3b sobre microplacas.

En general, el catión divalente es Ni^{+2} o Mg^{+2} , normalmente Ni^{+2} . En una realización, el catión divalente se encuentra a una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 μM . En otra realización, la concentración de catión divalente es de aproximadamente 200 μM .

Opcionalmente, la solución de convertasa puede incluir properdina a una concentración de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 750 nM, normalmente de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM. En una realización, la concentración de properdina es de aproximadamente 400 nM.

Opcionalmente, la solución de convertasa también puede comprender factor C3 a una concentración de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 750 nM. En una realización, el factor C3 se encuentra a una concentración de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM. En otra realización, se encuentra a aproximadamente 200 nM.

La C5 convertasa puede formarse añadiendo solución de convertasa a las esferas o a las microplacas recubiertas con bio-C3b. La microplaca o las esferas se incuban a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C, normalmente aproximadamente 37 °C, durante de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 minutos con agitación moderada de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 RPM, normalmente aproximadamente 700 RPM.

Normalmente, la convertasa se forma durante la incubación y después se lavan las esferas o los pocillos de la microplaca de una a dos veces con un volumen adecuado de un tampón de lavado.

En general, se escindirá el C5 transferido a la solución de convertasa por la convertasa para formar C5a y C5b. La solución de convertasa con C5 se cita en el presente documento como la "solución de reacción". Esta solución se denomina "solución de reacción". En general, C5 se encuentra a una concentración de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 500 nM, en una realización, de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 250 nM y en otra realización, de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 nM de C5. En una realización, la solución de reacción incluye un catión divalente, tal como Mg^{+2} o Ni^{+2} , normalmente Ni^{+2} , a aproximadamente 200 μM .

En una realización, la incubación en la solución de reacción es a una temperatura de aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 5 a 90 minutos, normalmente aproximadamente 30 minutos. Durante la incubación, se somete a la muestra a agitación moderada, tal como de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 RPM, normalmente aproximadamente 700 RPM.

La formación de C5a se detiene normalmente mediante la adición de EDTA a la solución de reacción, uniendo el catión divalente. La concentración final de EDTA dependerá de la cantidad de catión divalente en la mezcla de reacción y puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia sin experimentación innecesaria. Normalmente, la concentración de EDTA es de aproximadamente 110 mM a aproximadamente 160 mM de EDTA. Como alternativa, el EDTA, se encontrará a una concentración de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 145 mM. En una realización, las concentraciones serán de aproximadamente 135 a aproximadamente 140 mM.

Puede evaluarse la actividad convertasa midiendo la cantidad de C5a formada por la C5 convertasa a lo largo de un periodo de tiempo dado, generalmente usando un inmunoensayo. Los inmunoensayos útiles incluyen ensayos ELISA o similares a ELISA.

Los ensayos ELISA, independientemente del sistema de detección empleado, incluyen generalmente la inmovilización de un antígeno o anticuerpo a una fase sólida, así como el uso de un reactivo de detección adecuado. Las condiciones óptimas para llevar a cabo el ELISA pueden establecerse fácilmente por los expertos habituales en la materia.

Frecuentemente, en un ELISA, se inmoviliza un antígeno a una fase sólida y después se compleja con un anticuerpo que está unido a una enzima. La detección puede lograrse evaluando la actividad de la enzima conjugada mediante incubación con un sustrato para producir un producto medible. Los ELISA implican normalmente indicadores y sustratos cromogénicos que producen algún tipo de cambio de color observable para indicar la presencia de antígeno o analito. Las técnicas ELISA usan indicadores fluorogénicos, electroquimioluminiscentes y de PCR cuantitativa para crear señales cuantificables. Estos nuevos indicadores pueden tener varias ventajas, incluyendo mayores sensibilidades y multiplexación. En términos técnicos, los nuevos ensayos de este tipo no son estrictamente ELISA, ya que no están "acoplados a enzimas", sino que están ligados a algún indicador no enzimático. Sin embargo, dado que los principios generales en estos ensayos son en gran medida similares, normalmente se agrupan en la misma categoría que los ELISA.

C5a es un fragmento soluble de C5. Los métodos para medir C5a con un inmunoensayo son generalmente los mismos, independientemente de que la C5 convertasa se forme sobre una microplaca o con esferas.

En una realización, el anticuerpo tiene una alta afinidad por el fragmento C5a y una baja afinidad por el componente de C5 precursor. De manera óptima, el anticuerpo es un anticuerpo para un neoeptopo. Los anticuerpos para

neopítopos se unen generalmente a epítopos únicos que se forman sobre los fragmentos de proteína como resultado de la escisión de una proteína precursora. Por ejemplo, un anticuerpo para neoepítopo puede reconocer un extremo N o C-terminal recientemente creado de los fragmentos en el fragmento C5a pero no logra reconocer la misma secuencia de aminoácidos presente en el componente C5 precursor. En general, el neoepítopo de un producto de escisión no está presente o no se encuentra disponible en la proteína precursora. En una realización, el anticuerpo para el neoepítopo tiene un valor de K_d de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-12} para el fragmento de escisión C5a y una K_d de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-5} para el componente de C5 precursor.

En una realización, un anticuerpo específico para neoepítopo útil para inmovilizar a C5a es BNJ383 (véase la publicación PCT WO2011/137395).

El método de detección para el ELISA puede ser colorimétrico, fluorescente, luminiscente o de ECL. Normalmente, el método de detección es ECL y el ensayo es MSD. Con frecuencia, el método de detección ECL usa un anticuerpo de ratón dirigido al fragmento de complemento y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón modificado con un marcador SULFO-TAG™ para detectar la cantidad de C5a inmovilizado por medio de BNJ383.

Normalmente, la medición de la cantidad de C5a implica recubrir los pocillos de una microplaca con un anticuerpo anti-neoepítopo de C5a mediante incubación del anticuerpo anti-C5a en una solución de tampón/detergente, tal como tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,4. Después, se sella la microplaca y se incuba a aproximadamente 37 °C durante de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 minutos, normalmente durante aproximadamente 60 minutos. Después de la incubación, normalmente se lavan los pocillos de la microplaca con un tampón de lavado para retirar el material no unido de manera específica. Después, normalmente se bloquean los pocillos de la microplaca con un tampón de bloqueo, tal como PBS, Tween-20 al 0,5 %, BSA al 0,25 % o PBS/Tween al 0,05 %, caseína al 1 %, durante de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 minutos, normalmente aproximadamente 60 minutos. El tampón de bloqueo también puede ser un tampón de bloqueo disponible comercialmente, tal como el Bloqueador A de Meso Scale Discovery ("MSD"), que es un cóctel patentado de proteínas en un tampón a base de PBS. Normalmente, se transfiere un volumen adecuado de la solución de reacción que tiene el fragmento C5a y EDTA a los pocillos de la microplaca recubierta con BNJ383. La solución de reacción se incuba durante aproximadamente 15 minutos con agitación a temperatura ambiente. Después de la incubación, la solución de reacción residual se retira y se lavan los pocillos de la microplaca de aproximadamente 1 a 3 veces, normalmente 2 veces, con un tampón de lavado.

En una realización, se mide el C5a unido a BNJ383 con un anticuerpo de ratón anti-C5a que se une a C5a en diferentes sitios y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón modificado con SULFO-TAG™, para que se una al anticuerpo de ratón y generar una señal de ECL. En general, se añaden los anticuerpos a los pocillos de la microplaca en tampón de bloqueo A de MSD al 1 %. Después, se incuba la microplaca en la oscuridad durante aproximadamente 30 minutos, tras lo cual se lava la placa con PBS, Tween-20 al 0,5 %. Se añade a cada pocillo un tampón a base de Tris que contiene tripopilamina como correactivo para la generación de luz en el ECL ("tampón de lectura"). Frecuentemente, el tampón de lectura es un tampón comercialmente disponible, tal como el tampón de lectura T de MSD. La señal de ECL de la microplaca puede leerse usando un lector de placas comercial para determinar la cantidad de C5a. En general, puede cuantificarse la cantidad de C5a a escala de microgramos o micromolar mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, tal como comparando la señal de ECL de la muestra con una curva patrón.

Método para medir la actividad de C3 convertasa

A menos que se especifique otra cosa, las concentraciones, volúmenes y tiempos y condiciones de reacción son iguales a los descritos anteriormente para la C5 convertasa.

La medición de la actividad de C3 convertasa es similar al método para medir la actividad de C5 convertasa. En general, se añade una solución de convertasa que incluye los factores D y B, así como un catión divalente, a las esferas o los pocillos de la microplaca, con bio-C3b inmovilizado sobre la superficie. Después, se incuban las esferas o la microplaca con agitación moderada para formar la C3 convertasa, tras lo cual se lavan de una a dos veces con tampón de lavado.

Normalmente, la solución de convertasa incluye factor D a una concentración de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 nM. En una realización, la concentración de factor D es de aproximadamente 10 nM.

En general, la concentración de factor B es de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1500 nM. En una realización, el factor B se encuentra a una concentración de aproximadamente 25 nM a aproximadamente 500 nM. En otra realización, la concentración de factor B es de aproximadamente 400 nM para las esferas de bio-C3b y de 50 nM para bio-C3b sobre microplacas.

En general, el catión divalente es Ni^{+2} o Mg^{+2} , normalmente Ni^{+2} . En una realización, el catión divalente se encuentra a una concentración de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 5000 μM . En otra realización, la concentración de catión divalente es de aproximadamente 200 μM .

Opcionalmente, la solución de convertasa puede incluir properdina a una concentración de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 750 nM, normalmente, a una concentración de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM. En una realización particular, la concentración de properdina es de aproximadamente 400 nM.

5 Opcionalmente, la solución de convertasa también puede comprender factor C3 a una concentración de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 750 nM. En otra realización, el factor C3 se encuentra a una concentración de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM. Normalmente, el factor C3 se encuentra a aproximadamente 200 nM.

10 En general, se incuban posteriormente las esferas o la microplaca en una solución de reacción con Tris 10 mM, pH 8,0 que incluye C3. Normalmente, el C3 se encuentra a una concentración de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 750 nM. En una realización, la concentración de C3 es de aproximadamente 25 nM a aproximadamente 500 nM. En otra realización, la concentración de C3 es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 300 nM. Normalmente, la solución también tiene un catión divalente. En general, la incubación es a aproximadamente 37 °C con agitación moderada de 500 a aproximadamente 1000, normalmente aproximadamente 700 RPM. La escisión de C3 se lleva a cabo generalmente durante de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 minutos.

15 La reacción de escisión de C3 se detiene generalmente añadiendo EDTA. La concentración final de EDTA dependerá de la cantidad de catión divalente en la mezcla de reacción y puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia.

Medición de la cantidad de C3a con un inmunoensayo

25 La cantidad de C3a producido se mide generalmente con un inmunoensayo que usa un anticuerpo anti-C3a que tiene una alta afinidad por C3a y una baja afinidad por C3. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-neoepítipo de C3a. Se proporciona un anticuerpo representativo para C3 disponible comercialmente de HYCULT BIOTECH (clon 2991, n.º de catálogo HM2074).

30 Puede lograrse la cuantificación de la cantidad de C3a producido durante la reacción de escisión recubriendo los pocillos de una microplaca con el anticuerpo anti-C3a. Normalmente, la solución de reacción que contiene el fragmento C3a y EDTA se transfiere a los pocillos recubiertos y se incuba durante aproximadamente 15 minutos con agitación a temperatura ambiente. Después de la incubación, normalmente se retira la solución residual y se lavan los pocillos de la microplaca de aproximadamente 1 a 3 veces, normalmente 2 veces, con tampón de lavado.

35 En una realización, el método de detección es ECL y el reactivo de detección es un anticuerpo de ratón anti-C3a y un anticuerpo secundario anti-ratón modificado con SULFO-TAG™. Se añade a los pocillos de la microplaca un tampón de lectura que comprende tripropilamina y puede leerse la microplaca usando un lector de placas comercial para medir la señal de ECL y determinar la cantidad de C3a unido al anticuerpo anti-C3a.

40 En general, la cantidad de C3a inmovilizado sobre la superficie sólida puede cuantificarse a escala de miligramos o molar comparando la señal de ECL de las muestras con una curva patrón.

Medición de la actividad proteasa del factor D

45 La Fig. 3 es una representación esquemática que ilustra un método para medir la actividad proteasa de factor D usando factor B como sustrato. Normalmente, se añade una solución que incluye bio-C3b, factor B, factor D y Ni^{+2} a un pocillo de la microplaca recubierto con BBP para formar un complejo de bio-C3b:Bb que recubre el pocillo. En general, la solución se incuba en los pocillos de la microplaca durante de aproximadamente 10 a aproximadamente 120 minutos, normalmente aproximadamente 30 minutos, con agitación suave.

50 En general, la solución comprende de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 60 pmol de bio-C3b a una concentración de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 5000 nM, normalmente aproximadamente 300 nM. El factor B se encuentra normalmente a una concentración de aproximadamente 6 nM a aproximadamente 1500 nM, normalmente de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 500 nM. La solución también incluye factor D a una concentración desde aproximadamente 0,3 nM a aproximadamente 20 nM, normalmente aproximadamente 10 nM. La concentración de NiCl_2 es de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 5000 μM . En una realización específica, la concentración es de aproximadamente 200 μM de NiCl_2 .

60 Opcionalmente, la solución de convertasa puede incluir properdina a una concentración de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 750 nM, normalmente, a una concentración de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM. En una realización particular, la concentración de properdina es de aproximadamente 400 nM.

65 Opcionalmente, la solución de convertasa también puede comprender factor C3 a una concentración de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 750 nM. En una realización, el factor C3 se encuentra a una

concentración de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM. En otra realización, la concentración de factor C3 es a aproximadamente 200 nM.

Como se muestra en la Fig. 3, el bio-C3b se une a la BBP, seguido de la unión del factor B al bio-C3b. El factor D escinde al factor B en los fragmentos Ba y Bb y el Ba soluble se disocia del complejo bio-C3b-Bb inmovilizado. Normalmente, Ba se retira lavando los pocillos de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces, normalmente 3 veces, con un tampón de lavado.

La cantidad de Bb producida puede medirse con un ensayo MSD de tipo ELISA usando un anticuerpo anti-Bb que tiene una alta afinidad por Bb y una baja afinidad por el factor B. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-neoepítipo de Bb. Se encuentran disponibles comercialmente anticuerpos anti-Bb. Los ejemplos incluyen QUIDEL (A227), ABD SEROTEC (MCA2650) y HYCULT BIOTECH (HM2256). Como alternativa, pueden generarse anticuerpos dirigidos contra el fragmento Bb del factor B usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Véase la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 12/675220 y la publicación n.º 2010/0239573, publicada el 23 de septiembre de 2010.

El método de detección para el ELISA puede ser colorimétrico, fluorescente, luminiscente o mediante ECL. En una realización particular, el método de detección es ECL usando un anticuerpo modificado con SULFO-TAG™, en un formato de MSD.

Como se muestra en la Fig. 3, se añaden a cada pocillo un anticuerpo anti-Bb de ratón y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón modificado con SULFO-TAG™. El tampón puede ser tampón de bloqueo A de MSD al 1 %. En general, se sella la microplaca y se incuba a aproximadamente 37 °C durante de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 minutos, normalmente aproximadamente 60 minutos. Después de la incubación, generalmente se desecha la solución y pueden lavarse los pocillos de la microplaca con PBS, Tween-20 al 0,5 %. Normalmente, la microplaca se lee usando un lector de placas comercial para detectar la señal de ECL. En general, la cantidad de Bb inmovilizada sobre la superficie de cada pocillo puede cuantificarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, tal como generando una curva patrón.

Uso de un biosensor para detectar cambios en la actividad de factor D

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para usar un biosensor para medir la velocidad de proteólisis por el factor D del factor B. En general, el biosensor utiliza interferometría de biocapas (BLI).

Los biosensores usan tecnologías sin marcadores para medir interacciones biomoleculares. En general, el biosensor detecta los eventos de unión y disociación en su superficie y genera una señal en respuesta a la unión. Normalmente, el biosensor puede detectar la adición o pérdida de masa, cambios en la capacidad calórica, reflectividad, espesor, color u otras características indicativas de un evento de unión.

Los métodos divulgados en el presente documento utilizan biosensores de BLI. Los biosensores de BLI usan una técnica analítica óptica que analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada a partir de dos superficies: una capa de proteína inmovilizada sobre la punta del biosensor y una capa de referencia interna. Cualquier cambio en el número de moléculas inmovilizadas sobre la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia que puede medirse en tiempo real. Véase la patente de los Estados Unidos n.º 7.319.525.

La unión entre un ligando inmovilizado sobre la superficie de la punta del biosensor y un analito en solución produce un aumento en el espesor óptico en la punta del biosensor, que da como resultado un desplazamiento en la longitud de onda, $\Delta\lambda$ (nm), que es una medición directa del cambio en el espesor de la capa biológica. Las interacciones pueden medirse en tiempo real, proporcionando la capacidad de monitorizar la especificidad de unión, las velocidades de asociación y disociación o la concentración.

Solo las moléculas que se unen o que se disocian del biosensor pueden desplazar el patrón de interferencia y generar un perfil de respuesta. Las moléculas no unidas, los cambios en el índice refractivo del medio circundante o los cambios en el caudal no afectan al patrón de interferencia.

En general, los biosensores de BLI recubiertos con estreptavidina se unirán a bio-C3b. Se encuentran disponibles comercialmente biosensores de BLI recubiertos con estreptavidina ajustados a un formato de 96 pocillos con el nombre comercial DIP AND READ™ (FORTEBIO). Véase la patente de los Estados Unidos n.º 7.319.525. Los biosensores recubiertos de estreptavidina se encuentran disponibles comercialmente y se comercializan con el nombre comercial de Streptavidin (SA) Biosensors (FORTEBIO, n.º de catálogo 8-5019).

En la Fig. 4 se representa esquemáticamente una realización. Generalmente, se incuba una solución de bio-C3b, factor B y Ni^{+2} con un biosensor recubierto con BBP, formando un complejo de 269 kDa en la superficie del biosensor.

Opcionalmente, bio-C3b se encuentra a una concentración de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 30 µg/ml por pocillo, normalmente de 10 µg/ml. El factor B puede encontrarse a una concentración de aproximadamente 0,1 µM

a aproximadamente 3 μ M. En una realización particular, el factor D se encuentra a una concentración de aproximadamente 0,6 μ M. La solución normalmente se tampona con PBS que contiene BSA al 0,1 % (pt/vol) y Tween 20 al 0,02 % (vol/vol). (Tampón de cinética de FORTEBIO). El tampón también puede contener NiCl_2 a de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mM, normalmente a aproximadamente 1 mM.

La BBP puede ser avidina, estreptavidina o neutravidina. Normalmente, la BBP es estreptavidina.

Opcionalmente, la solución puede incluir properdina a una concentración de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 750 nM, normalmente, a una concentración de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM. En una realización específica, la concentración de properdina es de aproximadamente 400 nM.

Opcionalmente, la solución también puede comprender factor C3 a una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 750 nM. El factor C3 puede encontrarse a una concentración de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 500 nM. En una realización, se encuentra a aproximadamente 200 nM.

Los biosensores generalmente se incuban durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos, normalmente aproximadamente 6 minutos. El biosensor registra un cambio de longitud de onda positivo en respuesta a la formación del complejo de factor B/bio-C3b sobre la estreptavidina.

Como se muestra en la Fig. 4, el factor D añadido escinde al factor B en sus fragmentos Ba y Bb. En una realización, el factor D se encuentra a una concentración de aproximadamente 0,3 nM a aproximadamente 20 nM. En otra realización, el factor D se encuentra a una concentración de aproximadamente 10 nM.

La Fig. 4 muestra la disociación del fragmento Ba de 33 kDa del complejo de bio-C3b-Bb. El biosensor se lava con tampón de cinética, a lo largo de un periodo de 2 minutos para retirar el fragmento Ba soluble. El biosensor registrará un cambio de longitud de onda negativo en respuesta a la pérdida del fragmento 33 Ba.

La formación del complejo Bb:bio-C3b puede detectarse con un anticuerpo anti-Bb de ratón para un neoepítipo, que tiene una elevada afinidad por Bb, pero una afinidad relativamente baja por el factor B y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón. Normalmente, los anticuerpos se cargan sobre el biosensor a una concentración de aproximadamente 25 nM a aproximadamente 75 nM, normalmente de 55 nM en tampón de cinética. El biosensor se incuba de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos, normalmente aproximadamente 2 minutos. El biosensor de BLI registra generalmente un cambio de longitud de onda positivo en respuesta a la unión del complejo de anticuerpo de 300 kDa.

Los datos generados mediante el ensayo de unión a biosensor BLI pueden usarse para calcular los coeficientes cinéticos y los valores de CI_{50} usando programas informáticos disponibles comercialmente.

Los expertos en la materia reconocerán que la AP es un sistema de múltiples componentes que puede estudiarse usando el método de la presente divulgación y que el presente método facilitará el descubrimiento de moduladores de la vía. En general, el componente que se va a examinar será el componente limitante en el ensayo. Por lo tanto, las cantidades de los otros componentes de la AP deben estar presentes a una concentración adecuada para asegurar que la reacción observada es característica de y se determina mediante el componente que se va a examinar. Por ejemplo, en una determinación de la velocidad de un componente ensayado, todos los demás componentes que participan en la reacción han de estar presentes a concentraciones, que no limitan la velocidad de reacción, de tal forma que la concentración del componente ensayado es "limitante de la velocidad".

Kits

La presente divulgación, proporciona kits o conjuntos necesarios para medir la actividad proteasa de los componentes de complemento, tales como C3 convertasa, C5 convertasa o factor D, usando los métodos descritos en el presente documento.

Una realización de la presente divulgación, proporciona un kit para medir la actividad proteasa de C5 convertasa. En una realización, un kit incluye:

- a. bio-C3b
- b. factor B y factor D;
- c. una fase sólida recubierta con BBP;
- d. C5; y,
- e. un anticuerpo que se une a C5a con una elevada afinidad y, a C5 con una baja afinidad.

Una realización alternativa de la presente divulgación proporciona un kit para medir la actividad de C3 convertasa. En una realización, un kit incluye:

- a. bio-C3b

- b. factor B y factor D;
- c. una fase sólida recubierta con BBP;
- d. C3 y;
- e. un anticuerpo que se une a C3a con una elevada afinidad y, a C3 con una baja afinidad.

Una realización alternativa de la presente divulgación proporciona un kit para medir la actividad proteasa del factor D, usando los métodos descritos en el presente documento. En una realización, cada kit o conjunto incluye

- a. bio-C3b
- b. factor B;
- c. una fase sólida recubierta con BBP;
- d. factor D y;
- e. un anticuerpo que se une a Bb con alta afinidad y a factor B con una baja afinidad.

Otra realización de la presente divulgación proporciona un kit para detectar la actividad proteasa del factor D, usando un biosensor. En una realización, cada kit o conjunto incluye

- a. bio-C3b,
- b. y factor B;
- c. un biosensor de BBP;
- d. factor D y;
- e. un anticuerpo que se une a Bb con alta afinidad y a factor B con una baja afinidad.

Cada uno de los kits de la presente divulgación también puede incluir properdina.

En una realización, la homogeneidad de cada uno de los componentes de la vía es mayor de aproximadamente el 90 %. En otra realización, la homogeneidad de cada uno de los componentes de la vía es mayor de aproximadamente el 95 %. En una realización específica, la homogeneidad de cada uno de los componentes de la vía es mayor de aproximadamente el 99 %.

Normalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Normalmente, el anticuerpo es un anticuerpo para neoepítipo que tiene una alta afinidad por la proteína del fragmento de escisión y una baja afinidad por el componente de complemento precursor. De manera óptima, el anticuerpo tiene un valor de Kd de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-12} por el fragmento y un valor de Kd de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-5} por el componente de AP.

La superficie sólida puede ser un pocillo en una microplaca. El sustrato sólido también puede ser esferas.

En algunas realizaciones, el biosensor es un biosensor de BLI.

Ejemplos

Para comprender mejor la divulgación, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen una finalidad tan solo ilustrativa y no han de interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la divulgación.

Las proteínas de la AP, incluyendo el factor B, factor D, C3 y C5 se adquirieron de Comptech (Tyler TX).

Todas las microplacas usadas en los ejemplos se encontraban en un formato de microplaca de 96 pocillos. Las esferas recubiertas de estreptavidina se adquirieron de Spherotech (n.º de catálogo SVP- 03-10).

Ejemplo 1

El ejemplo 1 ilustra un método para medir la actividad de C5 convertasa con esferas recubiertas de estreptavidina. Los resultados demuestran que la unión de bio-C3b a estreptavidina era un requisito previo para la formación de C5 convertasa. Los resultados se compararon con muestras de esferas recubiertas de estreptavidina incubadas: (i) con bio-C3b; (ii) en ausencia de C3b (iii) con C3b biotinilado. El método se ilustra esquemáticamente en la Fig. 2 (a).

Biotinilación de C3b

Se produjo bio-C3b haciendo reaccionar C3b con NHS-(PEG)₄-biotina (ThermoFisher), un análogo de biotina que reacciona de manera no específica con la cadena lateral de amina primaria de la lisina. La reacción se llevó a cabo en PBS, pH 7,2 a temperatura ambiente durante 30 minutos, con una relación de la NHS-(PEG)₄-biotina a C3b de 5:1. Después de la biotinilación, se almacenó el bio-C3b a -80 °C.

Unión de bio-C3b a esferas

La unión de bio-C3b a la estreptavidina en perlas recubiertas con estreptavidina produjo una señal robusta indicativa de la formación de C5a. Se usaron esferas recubiertas con C3b (sin biotina) o esferas recubiertas de biotina como dos controles separados.

La unión de bio-C3b a estreptavidina se llevó a cabo en un tubo de microcentrifugación de 2,0 ml. En primer lugar, se lavaron doscientos cuarenta µg de perlas de SpheroTech recubiertas de estreptavidina con un diámetro de 0,3 µm, mediante centrifugación con 300 µl de Tris 10 mM, pH 8 y después se resuspendieron en 200 µl de Tris 10 mM, pH 8. Las esferas se incubaron con bio-C3b o C3b a una concentración de 320 nM. Las esferas se suspendieron mediante agitación suave a 1350 RPM durante 20 minutos a temperatura ambiente y se recogieron por centrifugación a 16 RCF durante 10 minutos. El sobrenadante residual se retiró y después se lavaron las perlas para retirar el bio-C3b residual no unido.

C5 convertasa

La C5 convertasa se formó sobre las esferas incubando las esferas de bio-C3b con una solución de convertasa que incluía componentes de la AP, un catión divalente y tampón. La solución de convertasa consistía en factor D, (10 nM), factor B (400 nM) y NiCl₂ (200 µM) en Tris 10 mM, pH 8,0. Las esferas se suspendieron mediante agitación suave a 1350 RPM durante 20 minutos a 37 °C. Las esferas se centrifugaron a 16 x g (RCF) durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las esferas en 1,2 ml de Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM a una concentración final de 200 µg/ml.

Escisión de C5 en C5a y C5b

Se logró la formación de C5a incubando C5 y las esferas en una solución de reacción que incluía un catión divalente. La solución de reacción se preparó transfiriendo a una placa de micropocillos: (i) 2 µg de esferas con convertasa C5 en 10 µl de la solución de convertasa; (ii) 20 µl de una solución de NiCl₂ 500 µM; y (iii) 20 µl de una solución de C5 250 nM (5 pmol). Se selló la microplaca y se incubó a 37 °C durante 30 minutos con agitación suave a 700 RPM. Después de la incubación, se detuvo la reacción añadiendo 10 µl de EDTA 500 mM en Tris 10 mM, pH = 8,0. (Volumen total = 60 µl)

Medición de C5a con un ELISA

Se midió la cantidad de C5a en la solución de reacción con un ensayo de MSD, similar a un ELISA. El anticuerpo anti-neoepítipo de C5a, BNJ383, capturó C5a soluble, uniéndolo a un pocillo en una microplaca. BNJ383 tiene una alta afinidad por C5a pero una baja afinidad por C5. El reactivo de detección fue un anticuerpo de ratón anti-C5a que se une al C5a capturado sobre la placa y un anticuerpo secundario anti-ratón modificado con SULFO-TAG™ que se unió al anticuerpo de ratón y se generó una señal de ECL.

Se añadieron a dos pocillos de una microplaca de 96 pocillos de alta unión (MSD, n.º de catálogo L15XB-3) BNJ383 (0,3 pmol), 2 µg/ml en 25 µl de un tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,4. Se selló la microplaca y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Después de la incubación, se retiró la solución residual y se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %. Los pocillos se bloquearon con 150 µl de bloqueador A de MSD al 1 %, en PBS, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después, se retiró la solución residual y los pocillos se lavaron 3 veces con 300 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %. Se añadió a los pocillos la solución de reacción (60 µl) con el fragmento C5a soluble, que se incubó durante 15 minutos con agitación suave (500 rpm) a temperatura ambiente.

Se retiró la solución de reacción residual y se lavaron los pocillos 3 veces con 300 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %. A los pocillos lavados se le añadieron 2 µg/ml de anticuerpo anti-C5a (HYCULT BIOTECH 2942, n.º de catálogo HM2078) y 0,5 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-ratón modificado con SULFO-TAG™ (MSD, n.º de catálogo R32AC-5) en 25 µl de solución de bloqueador A de MSD al 1 %.

Los pocillos se sellaron con un sello de película y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. Después de la incubación, se lavaron los pocillos 3 veces con 300 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %. Se añadieron a los pocillos ciento cincuenta µl de tampón de lectura de MSD 2X que contenía tripropilamina como transportador de electrones usando una técnica de pipeteado negativa. La microplaca se leyó en un dispositivo de obtención de imágenes de MSD para medir la señal de ECL generada por el SULFO-TAG™ fijado al anticuerpo secundario de cabra.

La Fig. 5 es un diagrama de barras de los resultados, que muestra que la actividad de C5 convertasa era dependiente del acoplamiento de bio-C3b a las esferas recubiertas con estreptavidina. El eje Y muestra la señal de ECL, que indica la formación de C5a resultante de la escisión del componente C5 por la C5 convertasa. El eje X muestra las condiciones de ensayo para cada muestra. Las esferas recubiertas con estreptavidina incubadas con bio-C3b tuvieron una señal de ECL de aproximadamente 14.000. Por el contrario, las muestras incubadas en ausencia de C3b o en presencia de C3b no biotinilado tuvieron una señal de ECL de aproximadamente 1000. La señal de ECL de 14.000 indicó la formación del fragmento C5a por C5 convertasa, mientras que el ECL de aproximadamente 1000 indicó la ausencia de C5a y que no se había formado C5 convertasa.

Ejemplo 2

C5 convertasa sobre microplacas recubiertas con estreptavidina

5 El ejemplo 2 ilustra el método para preparar C5 convertasa sobre microplacas.

En este ejemplo, se incubaron pocillos individuales recubiertos con estreptavidina con diferentes cantidades de bio-C3b, en el intervalo de 0,4 pmol a 25 pmol. Los resultados mostraron que la cantidad de C5a producida era dependiente de la cantidad de bio-C3b inmovilizada en los pocillos. El método se ilustra esquemáticamente en la Fig. 2 (b).

10 *Unión de bio-C3b a pocillos de la microplaca*

La unión de bio-C3b a estreptavidina en una microplaca recubierta con estreptavidina produjo una microplaca recubierta con bio-C3b.

15 Los pocillos de una microplaca recubierta con estreptavidina se lavaron 3 veces con 300 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %. Se añadieron las cantidades a continuación de bio-C3b a pocillos individuales en 25 µl de Tris 10 mM, pH 8,0: 0,4 pmol; 0,8 pmol; 1,6 pmol; 3,1 pmol; 6,3 pmol; 12,5 pmol; o 25 pmol. Se selló la microplaca y se incubó con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se lavaron los pocillos dos veces con 200 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %.

20 *C5 convertasa*

25 La C5 convertasa se formó sobre los pocillos de la microplaca incubando los pocillos recubiertos de bio-C3b con una solución de convertasa que incluía componentes de la AP, un catión divalente y tampón. La solución de convertasa se preparó con factor D (10 nM), factor B (50 nM) y NiCl₂ (200 µM) en Tris 10 mM, pH 8,0. Se añadieron µl de la solución de convertasa a los pocillos lavados y se selló y agitó la microplaca a 700 RPM a 37 °C durante 15 minutos. Los pocillos se lavaron dos veces con 200 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %.

30 *Escisión de C5 en C5a y C5b*

35 La formación de C5a se logró mediante incubación de C5 en los pocillos con una solución de reacción que incluía un catión divalente. La solución de reacción se preparó transfiriendo 20 µl de una solución de C5 100 nM en Tris 10 mM, pH 8,0, a los pocillos y añadiendo 20 µl de NiCl₂. La microplaca se selló y se incubó a 37 °C con agitación a 700 RPM. La reacción se detuvo con 15 µl de una solución de EDTA a pH 8,0. La concentración final de EDTA fue de 137 mM. (Volumen total = 55 µl.)

Medición de C5a con MSD (un ensayo de tipo ELISA)

40 Se midió la cantidad de C5a en la solución de reacción con un ensayo MSD. El anticuerpo anti-neoepítipo de C5a, BNJ383, fijado a una microplaca de pocillos, capturó C5a soluble. El reactivo de detección fue un anticuerpo de ratón anti-C5a que se une al C5a capturado sobre la placa y un anticuerpo secundario anti-ratón modificado con SULFO-TAG™ que se unió al anticuerpo de ratón y se generó una señal de ECL.

45 Se recubrieron los pocillos de una microplaca de 96 pocillos con BNJ383 incubando 25 µl de una solución con el anticuerpo a una concentración de 2 µg/ml en tampón de recubrimiento de carbonato-bicarbonato a pH = 9,4. Se selló la microplaca y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Después de la incubación, se desechó la solución de anticuerpo residual y se lavaron los pocillos de la microplaca 3 veces con 300 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %. Después, se bloquearon los pocillos de la microplaca con 150 µl de bloqueador A de MSD al 1 %, en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución de bloqueo residual y se lavaron los pocillos de las microplacas 3 veces con 300 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %. Se añadieron cincuenta y cinco µl de la solución de reacción a cada pocillo bloqueado y se incubó 15 minutos con agitación a temperatura ambiente. Se retiró la solución de reacción residual y se lavaron los pocillos 3 veces con 200 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %. Se añadieron a cada pocillo veinticinco µl del reactivo de detección (2 µg/ml de Ab 2942 anti-C5 (HYCULT BIOTECH) y 0,5 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-ratón modificado con SULFO-TAG™ (MSD)). Los pocillos se sellaron con un sello de película y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. Después de la incubación, se lavaron los pocillos 3 veces con 300 µl de PBS, Tween-20 al 0,5 %, seguido de la adición de 150 µl de tampón de lectura. La señal de ECL se midió en un dispositivo de toma de imágenes MSD para determinar la cantidad de C5a producida.

60 La Fig. 6 es una gráfica, que demuestra que la cantidad de C5a producida era una función de la concentración (pmol) de bio-C3b inmovilizada en los pocillos de la microplaca. El eje Y muestra la señal de ECL del anticuerpo secundario que indica la cantidad de C5a. El eje X muestra la cantidad de bio-C3b en pmol. La señal de ECL aumentó a medida que aumentó la cantidad de bio-C3b inmovilizado de 0,4 pmol a 25 pmol. Las muestras incubadas con 0,4 pmol de bio-C3b tuvieron una señal de ECL de aproximadamente 6000. A 12,5 pmol, la señal de ECL alcanzó un máximo a aproximadamente 30.000. Las muestras incubadas en ausencia de bio-C3b tuvieron una señal relativa de aproximadamente 1.000.

Ejemplo 3:

El ejemplo 3 ilustra el método para medir la actividad del factor D con una placa recubierta de BBP. Este proceso incluye las etapas de: (i) unión del factor B a placas recubiertas de bio-C3b; (ii) escisión por factor D del factor B en los fragmentos Ba y Bb; y, (iii) medir el producto Bb con un ensayo de MSD. El método se ilustra esquemáticamente en la Fig. 3.

También se ejemplifica el efecto del inhibidor del factor D, anhídrido isatoico, en la producción del fragmento Bb. Los resultados mostrados en la Fig. 7, demuestran que la actividad del factor D se redujo a medida que aumentaban las concentraciones de anhídrido isatoico.

Formación de Bb en placas recubiertas con bio-C3b

Se llevó a cabo una etapa de bloqueo inicial para reducir la unión no específica. Se añadieron ciento cincuenta μ l de tampón de bloqueo A de MSD al 1 % a los pocillos de una microplaca recubierta con estreptavidina. La microplaca se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron los pocillos tres veces con 300 μ l de PBS, Tween-20 al 0,5 %.

La formación de Bb inmovilizado sobre una placa recubierta de bio-C3b se logró incubando bio-C3b (28 nM), factor R (75 nM), factor D (0,8 nM), NiCl_2 1 mM en 50 μ l de Tris 10 mM, pH 8,0. Las muestras se incubaron en presencia de anhídrido isatoico a concentraciones en el intervalo de 1 μ M a 1000 μ M. La microplaca se selló y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron una vez con PBS, Tween-20 al 0,5 %.

Medición de Bb con un ensayo MSD

Se midió la cantidad de unión del fragmento Bb a la superficie de la microplaca con un ELISA usando un anticuerpo de ratón anti-Bb y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón modificado con SULFO-TAGTM para generar una señal de ECL.

Se añadieron veinticinco microlitros de una solución de anticuerpo a los pocillos lavados, que comprendía 2 μ g/ml del anticuerpo anti-Bb (Quindel A227) y 0,5 μ g/ml de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón modificado con SULFO-TAGTM (MSD, R32AC-5) en tampón de bloqueo A de MSD al 1 %. La microplaca se selló con película y se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. Después de la incubación, se lavaron los pocillos 3 veces con 300 μ l de PBS, Tween-20 al 0,5 % y se añadieron 150 μ l de tampón de lectura a cada pocillo usando una técnica de pipeteado negativo. La señal de ECL se midió en un dispositivo de toma de imágenes MSD para determinar la cantidad de Bb producida por factor D.

La Fig. 7 es una gráfica de los resultados del ejemplo 3. El eje Y muestra la señal de ECL generada por el anticuerpo secundario. El eje X muestra la concentración de anhídrido isatoico. Los resultados muestran la inhibición del factor D dependiente de la concentración del ácido isatoico.

La señal de ECL indica la cantidad de fragmento Bb producida mediante la proteólisis por factor D. La señal se redujo de aproximadamente 120.000 a aproximadamente 2000 a medida que se tituló el anhídrido isatoico de 0,3 μ M a 1000 μ M. A una concentración de anhídrido isatoico de 0,3 μ M, el factor D estaba completamente activo y escindió al factor B en sus fragmentos Ba y Bb, lo que dio como resultado la generación de una señal de ECL de 120.000. A una concentración de anhídrido isatoico de 1000 μ M, El factor D se inhibió esencialmente por completo y fue incapaz de escindir al factor B. La señal de ECL fue menor de aproximadamente 2000.

Ejemplo 4

El ejemplo 4 ilustra el uso de un biosensor de BLI para detectar cambios en la actividad del factor D. Este ejemplo también demuestra el efecto inhibidor de DCIC en el factor D y la formación del fragmento Bb. El método se ilustra esquemáticamente en la Fig. 4.

Todas las mediciones se registraron en un sistema OCTET[®] RED configurado en el modo de cuantificación avanzada. Los biosensores fueron SA-Streptavidin DIP AND READTM configurados para un formato de microplaca de 96 pocillos (FORTEBIO). Todos los volúmenes de carga fueron de 200 μ l.

Como se muestra en la Fig. 4, la primera etapa fue formar el complejo de bio-C3b/factor B sobre la superficie del biosensor. Se incubaron ocho biosensores recubiertos de estreptavidina con bio-C3b (10 μ g/ml) y factor B (0,6 μ M) en tampón de cinética con NiCl_2 1 mM durante 6 minutos.

Para formar bio-C3b/Bb, se cargó cada biosensor con una mezcla de bio-C3b (10 μ g/ml), factor B (600 nM) y Ni^{2+} (1 mM) en tampón de cinética. Después, se incubó cada biosensor con factor D (30 nM) mezclado con DCIC a una de las 8 diferentes concentraciones, en el intervalo de 25 μ M a 400 μ M. El tiempo de incubación fue de 2 minutos.

La presencia de Bb en el biosensor se detectó cargando los biosensores con 55 nM de un anticuerpo anti-Bb (Quidel, A227) y 55 nM de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón en tampón de cinética. El tiempo de incubación fue de 2 minutos.

En la Fig. 8 se muestra un registro del biosensor. La unión y disociación de las proteínas del biosensor dio como resultado un desplazamiento de la longitud de onda. El eje Y muestra el desplazamiento de la longitud de onda, $\Delta\lambda$ (nm). El eje X es el tiempo medido en segundos.

Desde el tiempo 0 hasta aproximadamente 360 segundos (~6 minutos), se formó el complejo de bio-C3b/factor B de 269 kDa sobre el biosensor recubierto de estreptavidina. Esto se registró en el biosensor como un desplazamiento positivo de la longitud de onda de aproximadamente 2,9 nM. De aproximadamente 360 a aproximadamente 480 segundos (~2 minutos), el factor D escindió al factor B en los fragmentos Ba y Bb. La disociación del fragmento Ba de 33 kDa se registró como un desplazamiento negativo de la longitud de onda de aproximadamente 0,2 nM. Se lavaron los biosensores para retirar el Ba y el DCIC residual de aproximadamente 480 a 600 segundos (~2 minutos), dando como resultado un desplazamiento negativo de la longitud de onda adicional. La unión del complejo de anticuerpo primario y secundario de 300 kDa al fragmento Bb se registró como un desplazamiento positivo de la longitud de onda de aproximadamente 600 a 720 segundos (~2 minutos). El desplazamiento positivo de la longitud de onda varió de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 0,4 nm.

Las mayores concentraciones de DCIC, 178 μ M, 267 μ M y 400 μ M, se muestran en la Fig. 8 como los trazados púrpura, azul claro y naranja, respectivamente. A estas concentraciones, DCIC inhibió de manera máxima al factor D. Un desplazamiento de la longitud de onda relativamente modesto de aproximadamente 0,151 nm refleja la cantidad relativamente pequeña de anticuerpo unido al fragmento Bb. Por el contrario, a 23 μ M y 35 μ M, DCIC tuvo un efecto mínimo en la actividad del factor D y hubo una cantidad relativamente elevada de unión del anticuerpo, dando como resultado un desplazamiento positivo de la longitud de onda de aproximadamente 0,4 nm. A concentraciones de DCIC entre 400 μ M y 23 μ M, el biosensor registró un desplazamiento positivo de la longitud de onda entre 0,15 y 0,4 nm.

La Fig. 9 muestra el efecto de DCIC en la tasa de unión de anticuerpo, calculada a partir de los datos mostrados en la Fig. 8. El eje Y representa la tasa de unión y el eje X es la concentración de DCIC. Los datos se usaron para calcular la CI_{50} de DCIC en la tasa de unión del anticuerpo. La CI_{50} para DCIC fue de 19,8 μ g/ml.

Ejemplo 5

El ejemplo 5 demuestra que la tasa de actividad de C5 convertasa era dependiente de la concentración de su sustrato, C5. Se muestran resultados tanto para esferas recubiertas de estreptavidina como para microplacas recubiertas de estreptavidina.

La Fig. 10 (a) es una gráfica que muestra que sobre las esferas, la tasa de actividad de C5 convertasa era dependiente de la concentración de C5. El eje X muestra el tiempo en minutos y el eje Y muestra la señal de ECL del anticuerpo secundario con SULFO-TAG™. La señal de ECL indica la cantidad de C5a producido por C5 convertasa.

La concentración de C5 fue de 0, 50 y 100 nM. Las esferas con C5 convertasa se prepararon como en el ejemplo 1. Las concentraciones de los componentes de la AP fueron: esferas de bio-C3 (200 μ g/ml); factor B (400 nM); C5 (0, 50 y 100 nM); factor D (10 nM); y $NiCl_2$ (200 μ M).

A medida que aumentó la concentración de C5, aumentó la señal de ECL. Se muestran los resultados hasta 30 minutos.

La Fig. 10 (b) es una gráfica similar que muestra el efecto de la concentración de C5 en la actividad de C5 convertasa, cuando está unida a una microplaca. El eje X muestra el tiempo en minutos y el eje Y muestra la señal de ECL.

Se prepararon microplacas que tenían C5 convertasa inmovilizada sobre la superficie como en el ejemplo 2. La concentración de componentes de la AP fue: factor B (50 nM), C5 (0, 5, 10 y 35 nM), factor D (10 nM) y $NiCl_2$ (200 μ M).

A medida que se aumentó la concentración de C5, aumentó la señal de ECL. Se muestran los resultados hasta 60 minutos.

Ejemplo 6

El ejemplo 6 demuestra que OmCl, una proteína de unión a C5, inhibe la actividad de C5 convertasa sobre las esferas.

Se prepararon esferas que tenían C5 convertasa inmovilizada sobre la superficie como en el ejemplo 1. Se incubaron esferas de bio-C3b (200 μ g/ml); factor B (50 nM); C5 (100 nM) y factor D (10 nM) y $NiCl_2$ (200 μ M) durante 60 minutos en presencia de OmCl a 0, 25, 50, 100, 150 y 200 nM.

La Fig. 11 es una gráfica que muestra el efecto inhibitor de OmCl en la actividad de C5 convertasa. El eje Y muestra la señal de ECL del anticuerpo secundario de cabra marcado con SULFO-TAGTM. El eje X muestra la concentración de OmCl. La señal de ECL indica la cantidad de C5a producido por C5 convertasa. La gráfica muestra que a medida que aumentó OmCl de 0 a 200 nM, se redujo la cantidad de C5a producida por la convertasa.

OmCl es una proteína de unión a C5 que reduce el acceso de la C5 convertasa al sitio de escisión de C5. La gráfica muestra que a una concentración de 50 nM, OmCl esencialmente no tenía efecto en la actividad convertasa. La señal de ECL de 40.000 era prácticamente idéntica a la señal obtenida cuando la concentración de OmCl era de 0, lo que indica que se producía prácticamente la misma cantidad de C5a en presencia de OmCl 50 nM, que en presencia de OmCl.

Sin embargo, a una concentración de 100 nM, la señal de ECL se redujo 8 veces hasta 5000, lo que demuestra que OmCl reduce la producción de C5a.

Ejemplo 7

El ejemplo 7 demostró que la actividad C5 convertasa dependía de la concentración del factor B. Se representan resultados tanto para esferas como para microplacas.

La Fig. 12 (a) es una gráfica, que muestra el efecto del factor B en la actividad de C5 convertasa con esferas. El eje Y muestra la señal de ECL del anticuerpo secundario y, el eje X muestra el tiempo en minutos. La señal de ECL indica la cantidad de C5a producido por C5 convertasa. Las esferas con C5 convertasa unida se prepararon como en el ejemplo 1. Las esferas se encontraban a una concentración de 2 µM, factor B (0, 0,375 o 0,75 pmol), C5 (100 nM), factor D (10 nM) y NiCl₂ fue de 200 µM. La gráfica muestra que la señal de ECL era mayor a 0,75 pmol de factor B que a 0,375 pmol, demostrando que el aumento del factor B aumentó la actividad de C5 convertasa. Se muestran los resultados a los 30, 60 y 90 minutos.

La Fig. 12 (b) es una gráfica que muestra el efecto del factor B en la actividad de C5 convertasa usando microplacas. El eje Y muestra la señal de ECL del anticuerpo secundario y el eje X muestra la concentración de factor B. Las microplacas que tenían C5 convertasa inmovilizada sobre la superficie se prepararon como en el ejemplo 2. Se muestran resultados con bio-C3 (0, 14 y 28 nM), factor B (0, 10, 20, 37,5, 75 y 150 nM), C5 (100 nM) y factor D (10 nM). El tiempo de la reacción fue de 20 minutos.

La gráfica muestra que la concentración de factor B aumentó de 0 a 150 nM, indicando la señal de ECL que aumentó la formación de C5a. También muestra que la formación de C5a era dependiente de bio-C3b. En ausencia de bio-C3b, no hubo actividad convertasa; la actividad fue mayor a 28 nM, que a 14 nM de bio-C3b.

Ejemplo 8

El ejemplo 8 demuestra que la actividad de C5 convertasa es dependiente de la concentración de factor D.

Las esferas con C5 convertasa unida se prepararon como en el ejemplo 1. Los resultados se muestran para esferas de bio-C3b (200 µg/ml), factor B (400 nM), C5 (100 nM), factor D (0, 0,625 o 20 nM) y NiCl₂ (200 µM).

La Fig. 13 es una gráfica, que ilustra que a medida que se aumentó la concentración de factor D, aumentó la actividad de C5 convertasa. El eje Y muestra la señal de ECL del anticuerpo secundario. El eje X muestra el tiempo en minutos.

La señal de ECL indica la cantidad de C5a producido por C5 convertasa. La señal es mayor para las muestras con factor D a 20 nM que a 0,625 nM.

Ejemplo 9

El ejemplo 9 demuestra que la actividad C5 convertasa es dependiente de la concentración de las esferas recubiertas de bio-C3b-estreptavidina ("esferas de bio-C3").

Las esferas con C5 convertasa unida se prepararon como en el ejemplo 1.

La Fig. 14 es una gráfica, que ilustra que la actividad de C5 es dependiente de bio-C3b. El eje Y muestra la señal de ECL del anticuerpo secundario de cabra marcado con SULFO-TAGTM. El eje X muestra los mg de esferas de bio-C3b incubadas en la reacción.

A medida que se titularon las esferas de bio-C3b de 0 a 16 µg, aumentó la actividad de C5 convertasa en presencia de C5. Estos datos demuestran que la actividad de C5 convertasa es dependiente de la cantidad de esferas de bio-C3b en una reacción.

Ejemplo 10

El ejemplo 10 demuestra que la actividad de C5 convertasa es dependiente de la concentración de bio-C3b en las esferas.

5 Las esferas con C5 convertasa unida se prepararon como en el ejemplo 1.

Se incubaron esferas recubiertas de estreptavidina (0,5 ml/muestra, 200 µg/ml) con diversas concentraciones de bio-C3b. La concentración de bio-C3b en la reacción fue de 260 pmol/ml para 0,8x; 130 pmol/ml para 0,4x; 65 pmol/ml para 0,2x; y 32,5 pmol/ml para 0,1x, donde x es la capacidad total de unión a biotina de las esferas recubiertas de estreptavidina (X es 1620 pmol por miligramo). Se generó C5a incubando esferas con diversas cantidades de bio-C3b, factor B (50 nM), C5 (200 nM), factor D (10 nM) y NiCl₂ (200 µM). El tiempo de reacción fue de 60 minutos.

La detección de C5a fue con un ensayo de MSD. Se inmovilizó C5a sobre una microplaca con el anticuerpo anti-neoepítipo de C5a, BNJ383. Remítase al párrafo 00223.

15 La Fig. 15 es un diagrama de barras, que ilustra que la generación de C5a se reduce a medida que se tituló bio-C3b de 0,8x, a 0,1x. Los controles fueron la ausencia de bio-C3b y, C3b que no se había modificado con biotina. Estos datos demuestran que la producción de C5a (actividad de C5 convertasa) depende de la cantidad de bio-C3b inmovilizado sobre las esferas recubiertas de estreptavidina.

20 Ejemplo 11

El ejemplo 11 demuestra que la actividad de C5 convertasa es dependiente de la presencia de Ni²⁺. El ensayo se llevó a cabo en una microplaca de 96 pocillos. Los resultados se muestran en la Fig. 16. El eje Y muestra la señal de ECL generada a partir de un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón modificado con SULFO-TAGTM. El eje X muestra el tiempo en minutos.

La microplaca de noventa y seis pocillos con C5 convertasa inmovilizada sobre los pocillos recubiertos de estreptavidina se preparó como en el ejemplo 2. Había 0,4 pmol de bio-C3b por pocillo; el factor B estaba a 50 nM; C5 estaba a 10 nM, el factor D estaba a 10 nM y NiCl₂ estaba a 0 o 200 µM.

La detección de C5a fue con un ensayo de MSD. Se inmovilizó C5a sobre una microplaca con el anticuerpo anti-neoepítipo de C5a, BNJ383. Se midió la cantidad de C5a inmovilizado sobre la placa usando un anticuerpo de ratón anti-C5a y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón modificado con SULFO-TAGTM. (Remítase al párrafo 00223 para más detalles)

La Fig. 16 es una gráfica que muestra los resultados en presencia y ausencia de NiCl₂. El eje Y muestra la señal de ECL del anticuerpo secundario de cabra marcado con SULFO-TAGTM. El eje X muestra la relación de bio-C3b-tiempo en minutos. Los resultados demuestran que NiCl₂ es necesario para la actividad de C5 convertasa. En presencia de NiCl₂ aumentó la señal de ECL con el tiempo, alcanzando un máximo de 43.000 aproximadamente a los 60 minutos, mientras que en ausencia de NiCl₂ no se observó señal de ECL.

Otras realizaciones

45 La descripción anterior divulga únicamente realizaciones ejemplares de la divulgación. Ha de entenderse que aunque se han descrito varias realizaciones junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, aunque solo se han ilustrado y descrito ciertas realizaciones, serán evidentes para los expertos en la materia diversas modificaciones y cambios.

50

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la actividad proteasa de C3 convertasa que comprende las etapas de:

- a. unir covalentemente biotina a C3b para producir C3b biotinilado (bio-C3b);
- b. unir C3b biotinilado a una proteína de unión a biotina inmovilizada sobre una fase sólida;
- c. incubar el C3b biotinilado inmovilizado, factor D y factor B en un tampón para formar una C3 convertasa;
- d. transferir C3 al tampón para escindir C3 con la convertasa para formar C3a y C3b; y
- e. medir la cantidad de C3a con un inmunoensayo, en donde cada uno de los componentes individuales, bio-C3b, factor B, factor D y C3 son sustancialmente homogéneos.

2. Un método para medir la actividad proteasa de C5 convertasa que comprende las etapas de:

- a. unir covalentemente biotina a C3b para producir C3b biotinilado;
- b. unir C3b biotinilado a una proteína de unión a biotina inmovilizada sobre una fase sólida;
- c. incubar el C3b biotinilado inmovilizado, factor D y factor B en un tampón para formar C5 convertasa;
- d. transferir C5 al tampón y escindir C5 con la convertasa para formar C5a y C5b; y
- e. medir la cantidad del C5a con un inmunoensayo,

en donde cada uno de los componentes individuales, bio-C3b, factor B, factor D y C5 son sustancialmente homogéneos.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la proteína de unión a biotina se selecciona entre el grupo que consiste en avidina, estreptavidina y neutravidina, preferentemente estreptavidina.

4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el tampón comprende además properdina.

5. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la fase sólida es un pocillo en una microplaca recubierto con una proteína de unión a biotina o en donde la fase sólida comprende esferas recubiertas con una proteína de unión a biotina, opcionalmente en donde las esferas son microesferas o nanoesferas.

6. El método de la reivindicación 1, en donde el inmunoensayo comprende una etapa de detectar C3a con un anticuerpo que tiene una alta afinidad por C3a y una baja afinidad por C3.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo para neoepítipo o en donde el anticuerpo tiene una Kd de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-12} para C3a y una Kd de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-5} para C3.

8. El método de la reivindicación 2, en donde el inmunoensayo comprende una etapa de detectar C5a con un anticuerpo que tiene una alta afinidad por C5a y una baja afinidad por C5.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo para neoepítipo o en donde el anticuerpo tiene una Kd de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-12} para C5a y una Kd de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-5} para C5.

10. Un kit para medir la actividad proteasa de C3 convertasa de la vía alternativa usando componentes sustancialmente homogéneos de la vía de complemento alternativa, comprendiendo el kit:

- a. C3b biotinilado sustancialmente homogéneo;
- b. una fase sólida recubierta con una proteína de unión a biotina;
- c. factor B, factor D y C3 sustancialmente homogéneos; y,
- d. un anticuerpo anti-C3a.

11. El kit de reivindicación 10, que además comprende properdina.

12. El kit de reivindicación 10, en donde la fase sólida es un pocillo en una microplaca recubierto con una proteína de unión a biotina o en donde la fase sólida comprende esferas recubiertas con una proteína de unión a biotina, opcionalmente en donde las esferas son microesferas o nanoesferas.

13. Un kit para medir la actividad proteasa de C5 convertasa de la vía alternativa usando componentes sustancialmente homogéneos de la vía de complemento alternativa, comprendiendo el kit:

- a. C3b biotinilado sustancialmente homogéneo;
- b. una fase sólida recubierta con una proteína de unión a biotina;
- c. factor B, factor D y C5 sustancialmente homogéneos; y,
- d. un anticuerpo anti-C5a.

14. El kit de reivindicación 13, que además comprende properdina.

15. El kit de reivindicación 13, en donde la fase sólida es un pocillo en una microplaca recubierto con una proteína de unión a biotina o en donde la fase sólida comprende esferas recubiertas con una proteína de unión a biotina, opcionalmente en donde las esferas son microesferas o nanoesferas.

5

Fig. 1

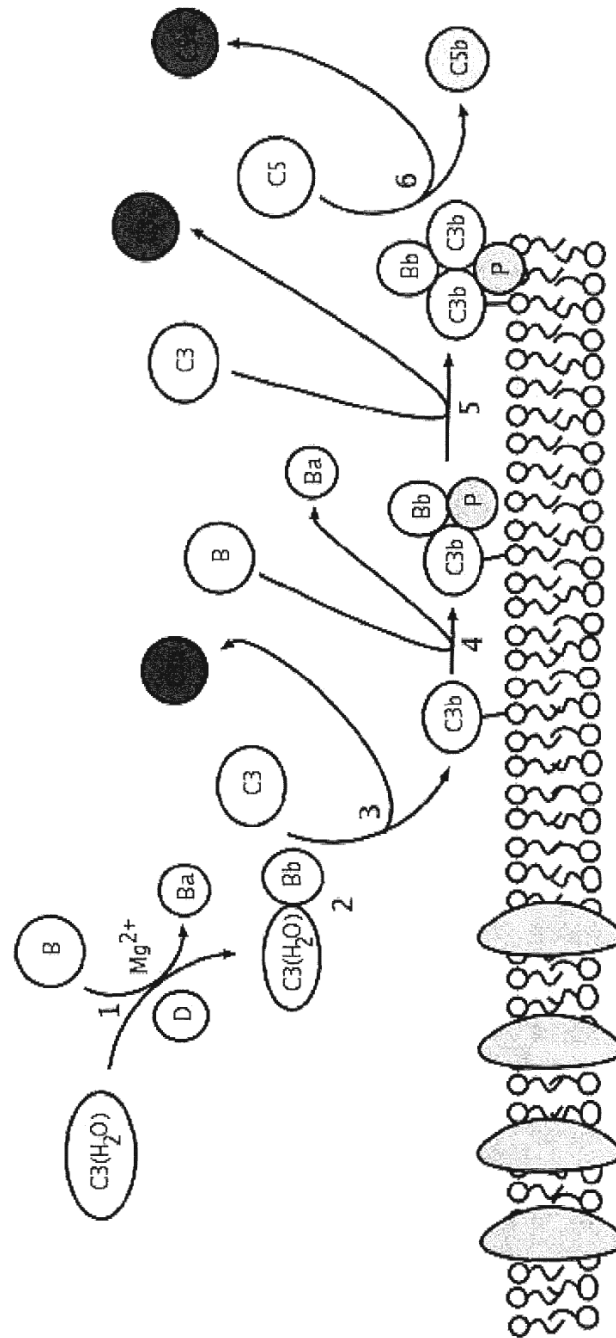


Fig. 2 (a)

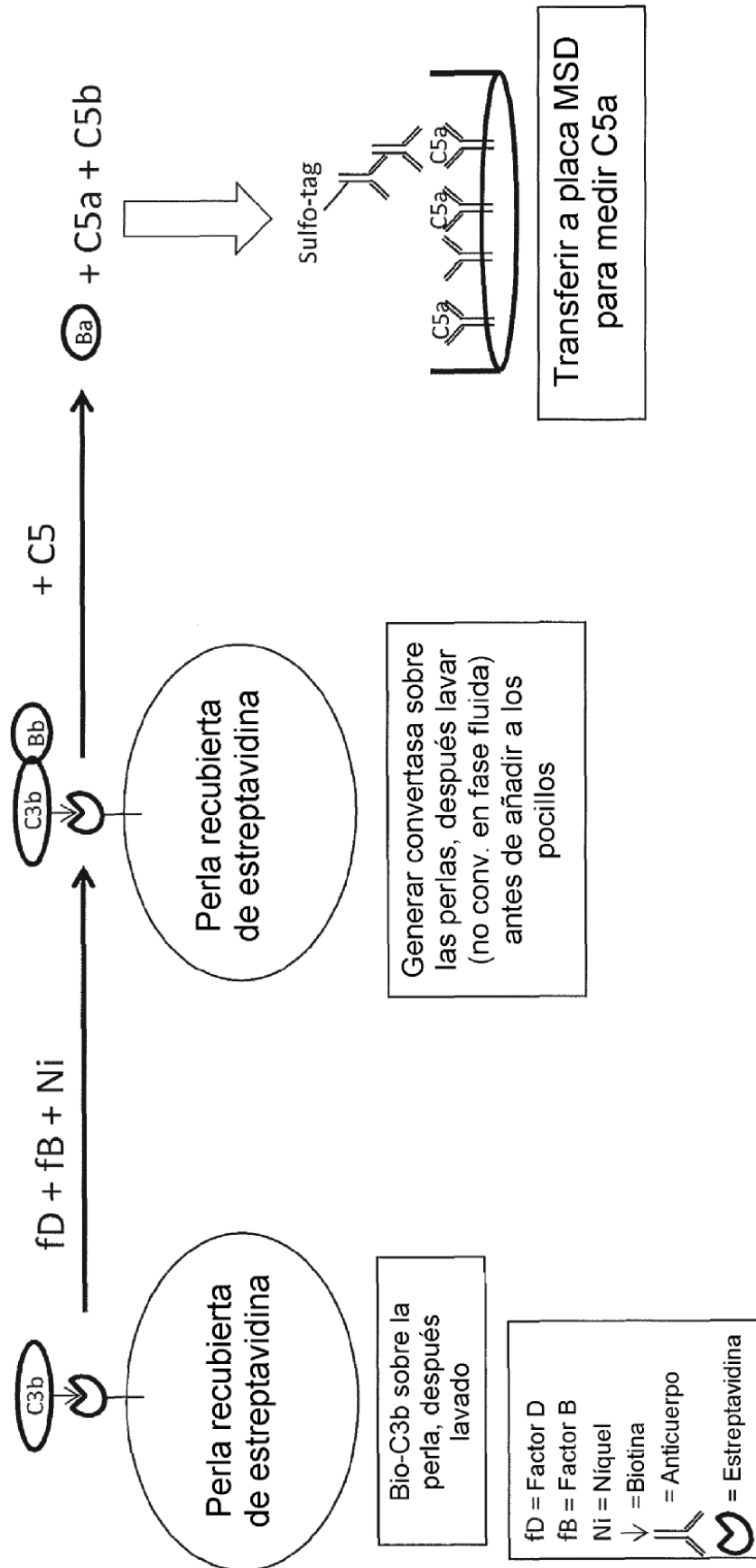


Fig. 2 (b)

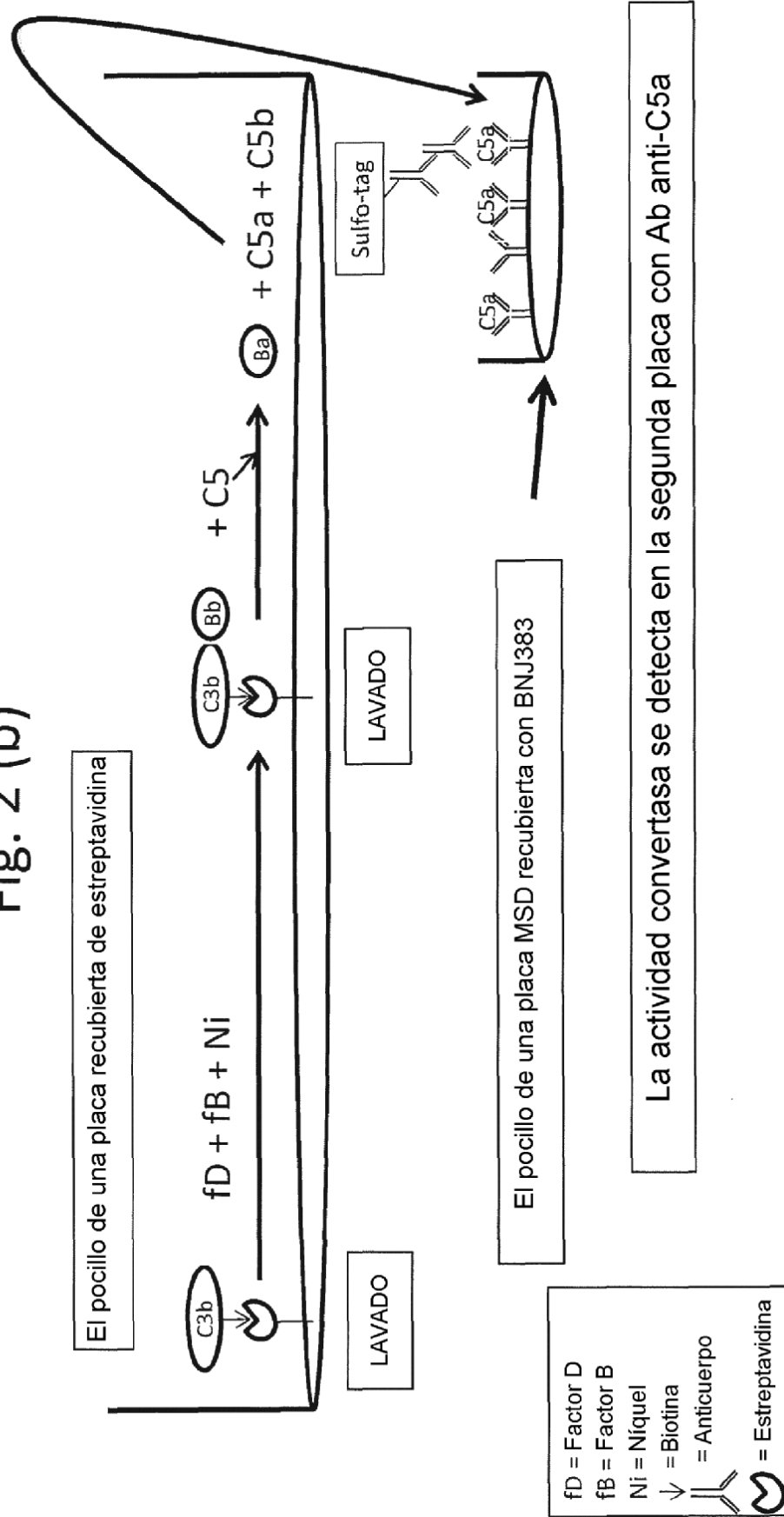


Fig. 3

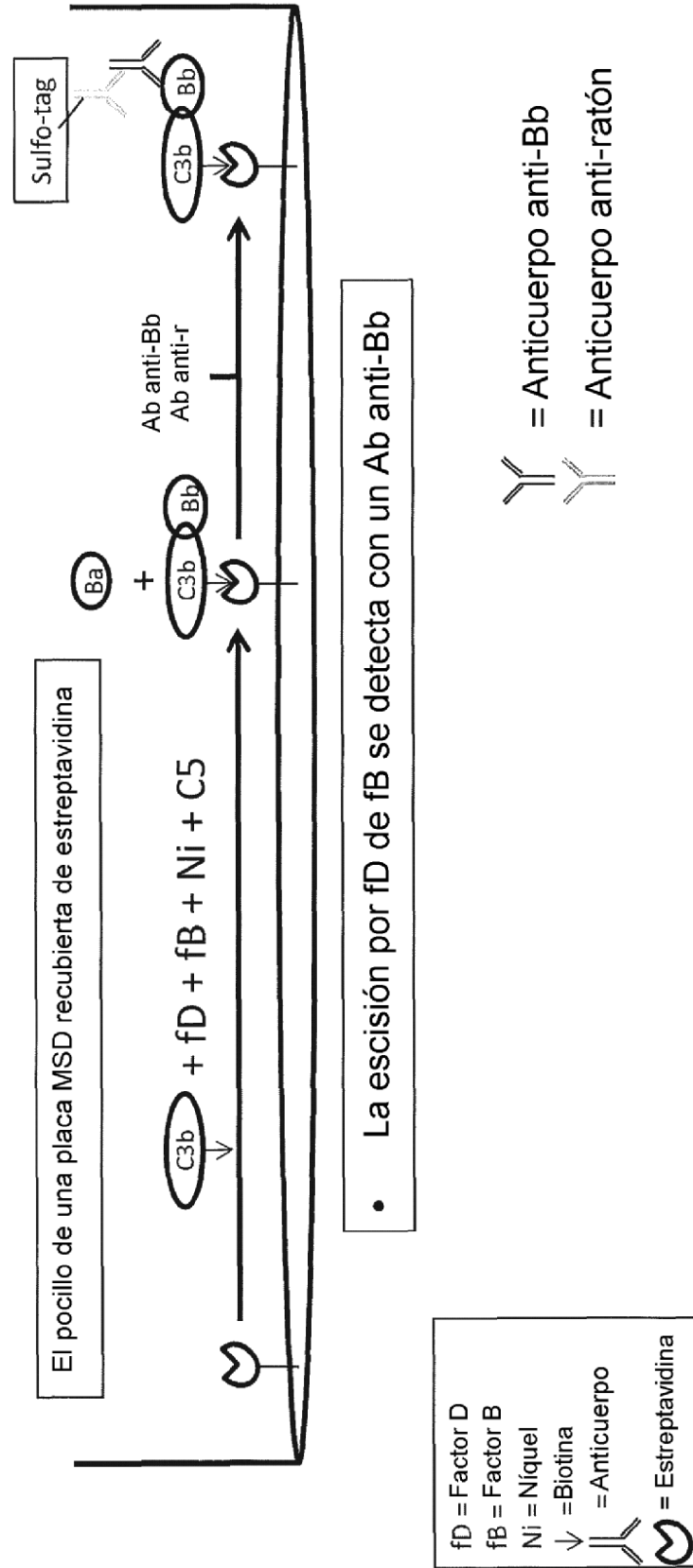


Fig. 4

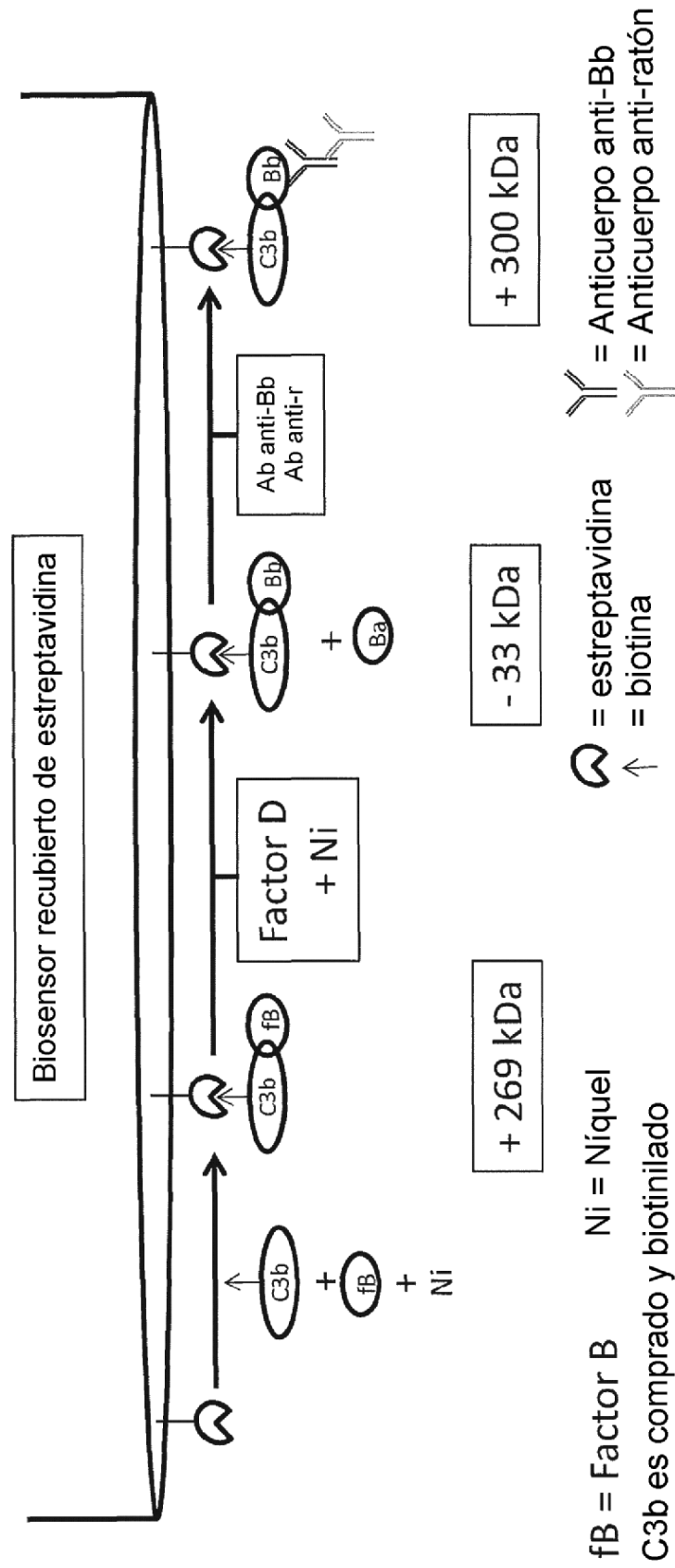


Fig. 5

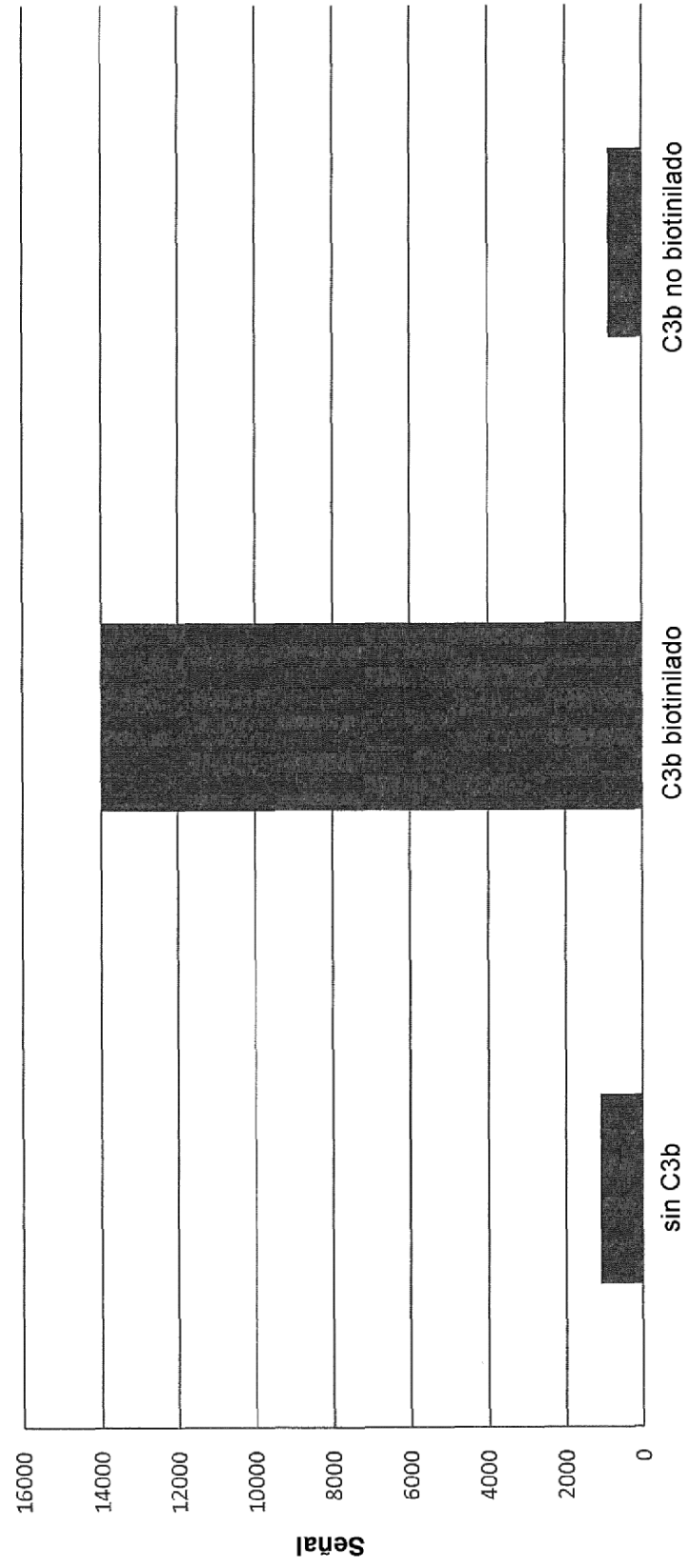


Fig. 6

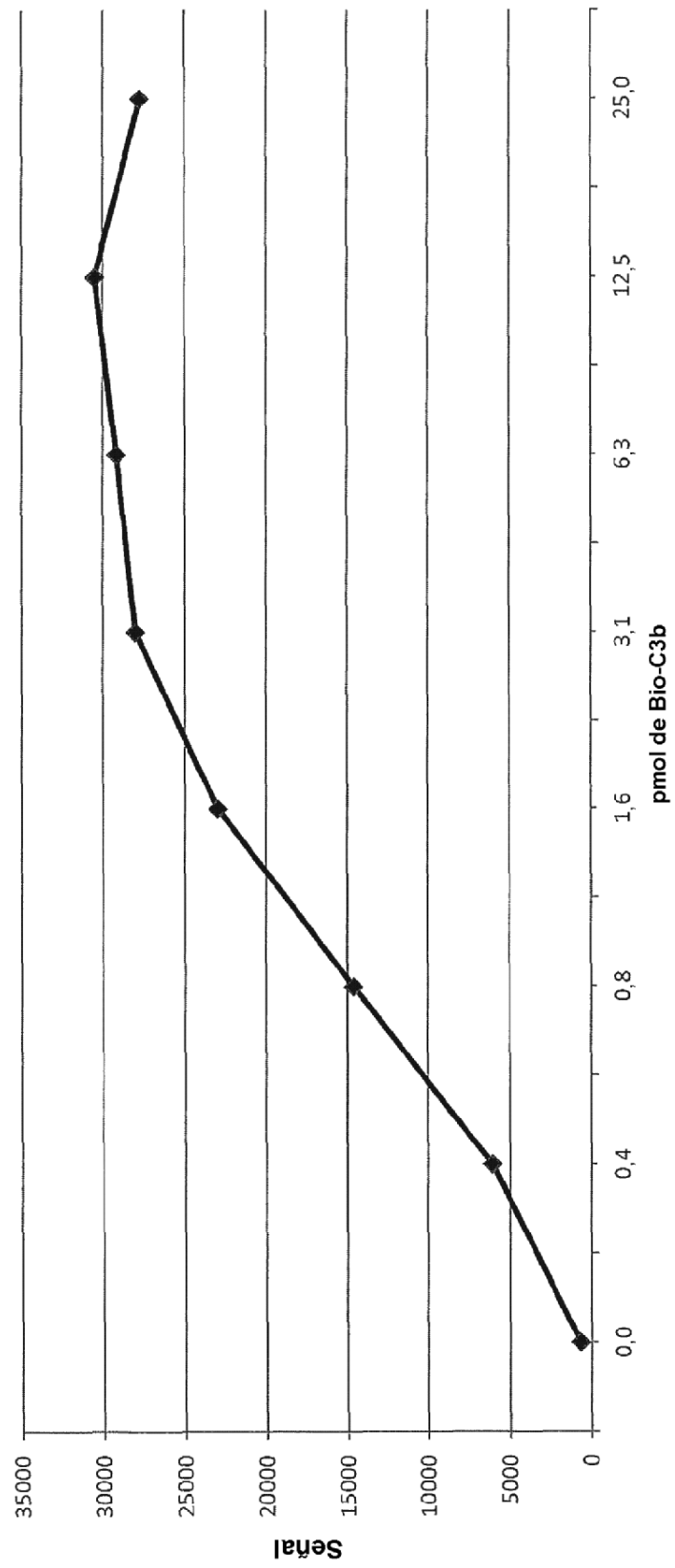
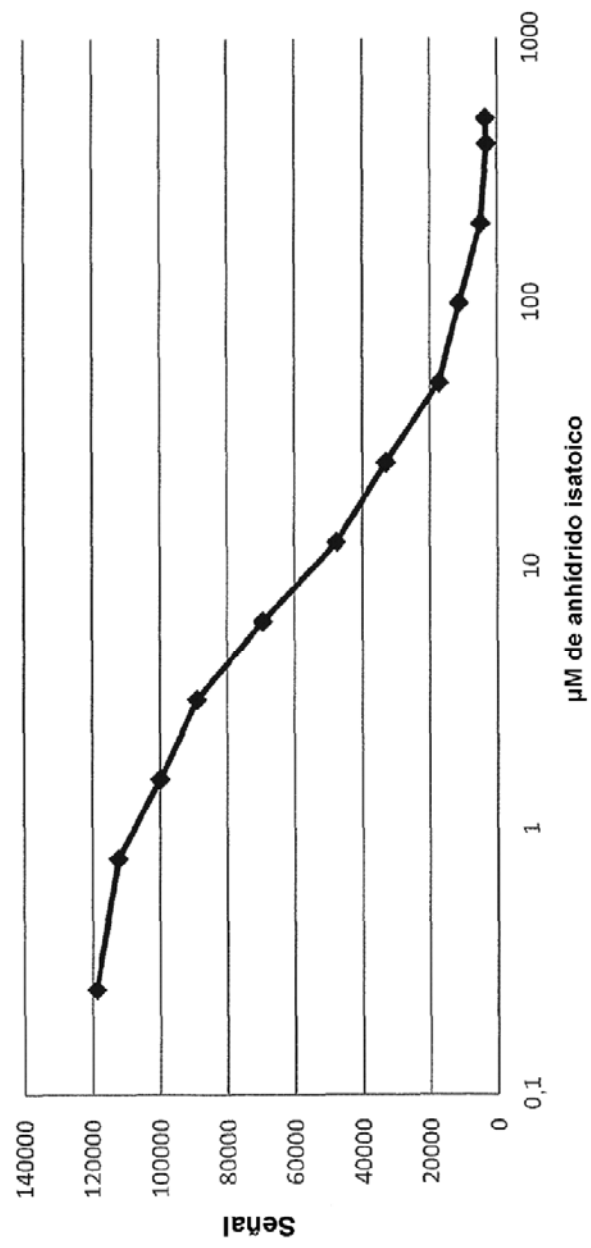


Fig. 7



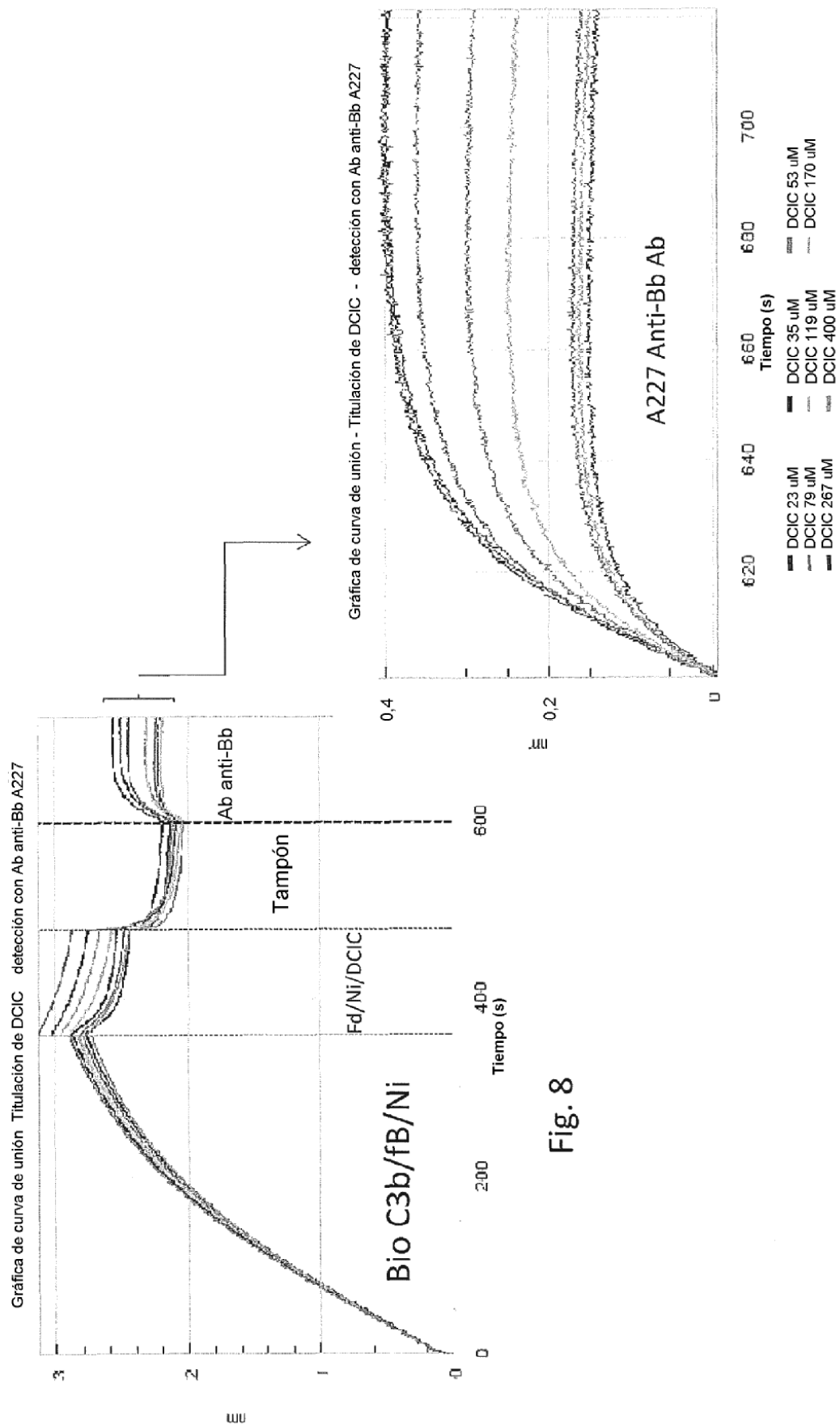


Fig. 8

Fig. 9

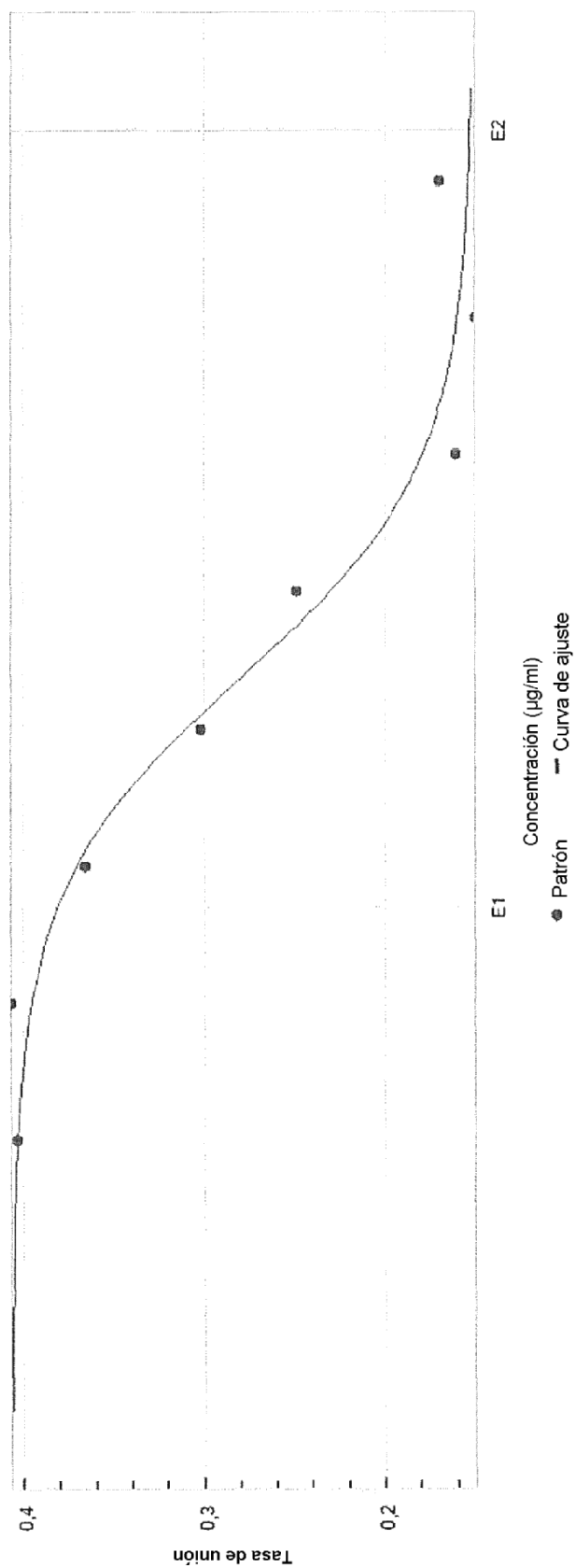


Fig. 10 (a)

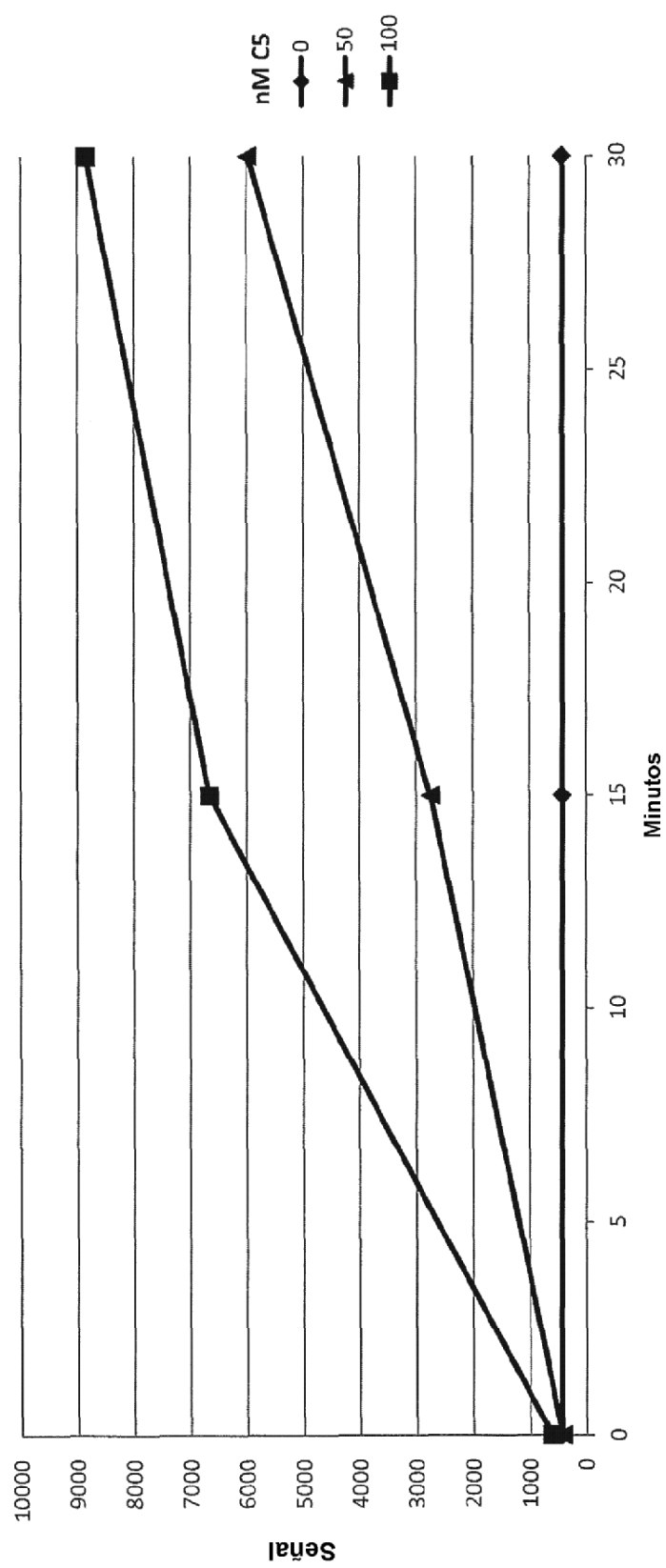


Fig. 10 (b)

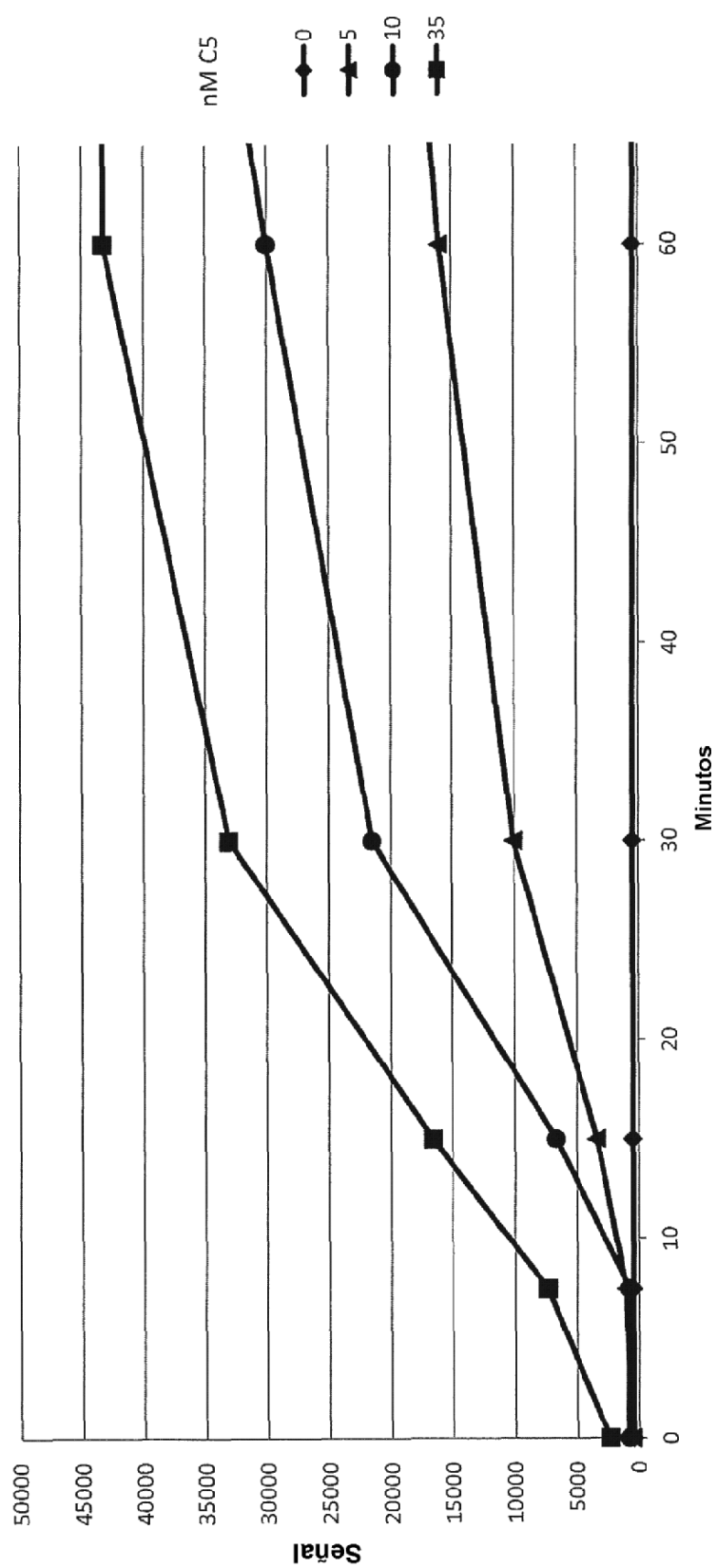


Fig. 11

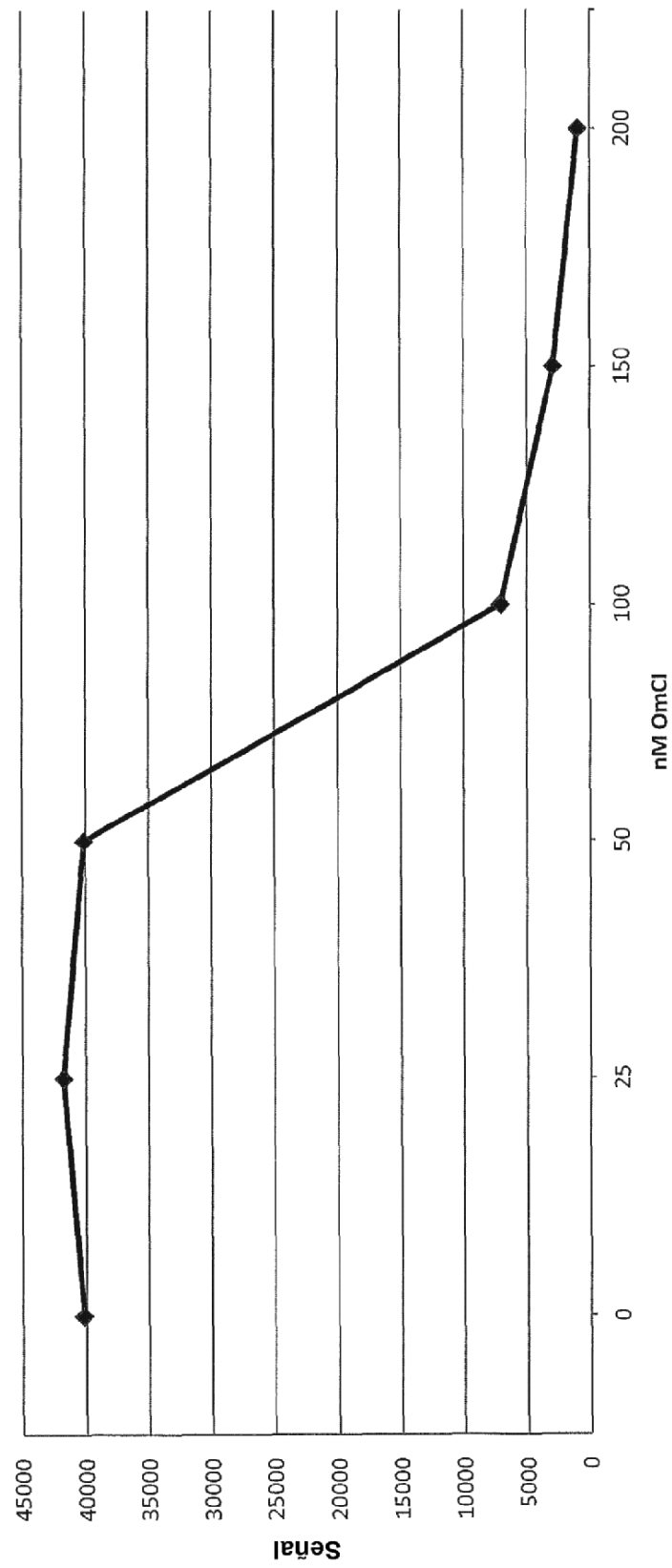


Fig. 12 (a)

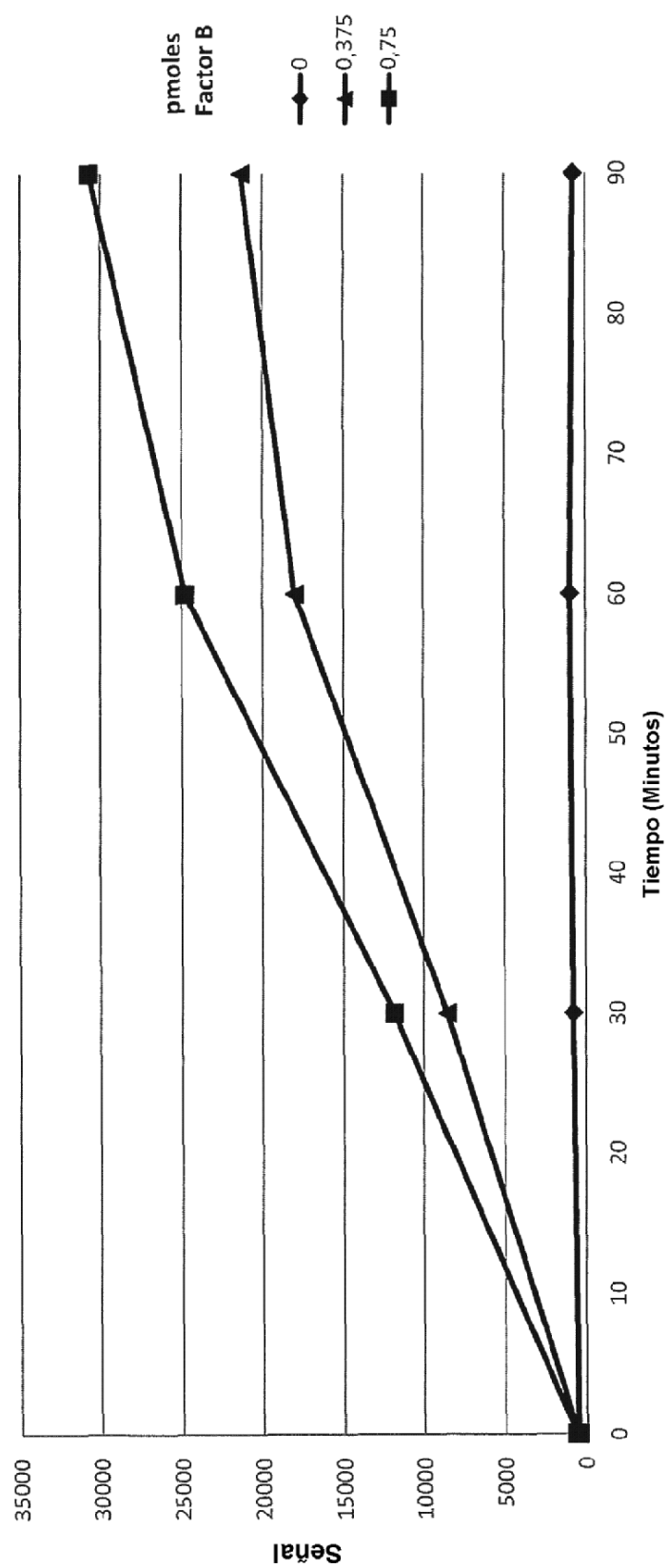


Fig. 12 (b)

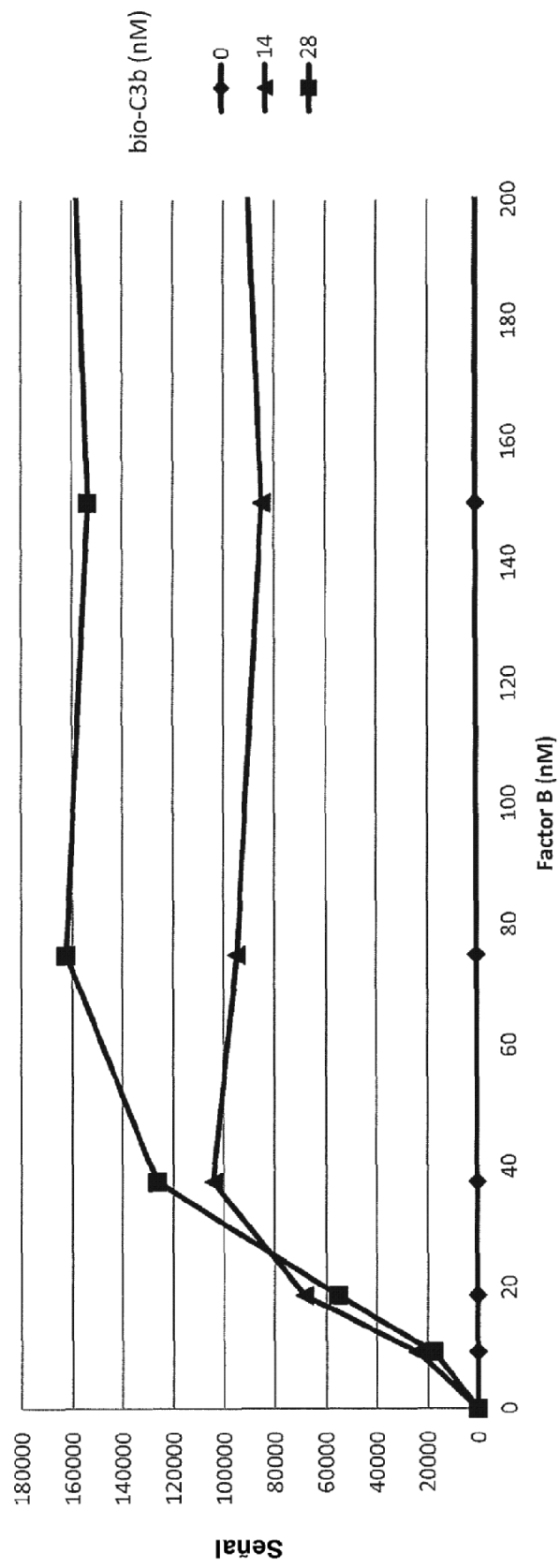


Fig. 13

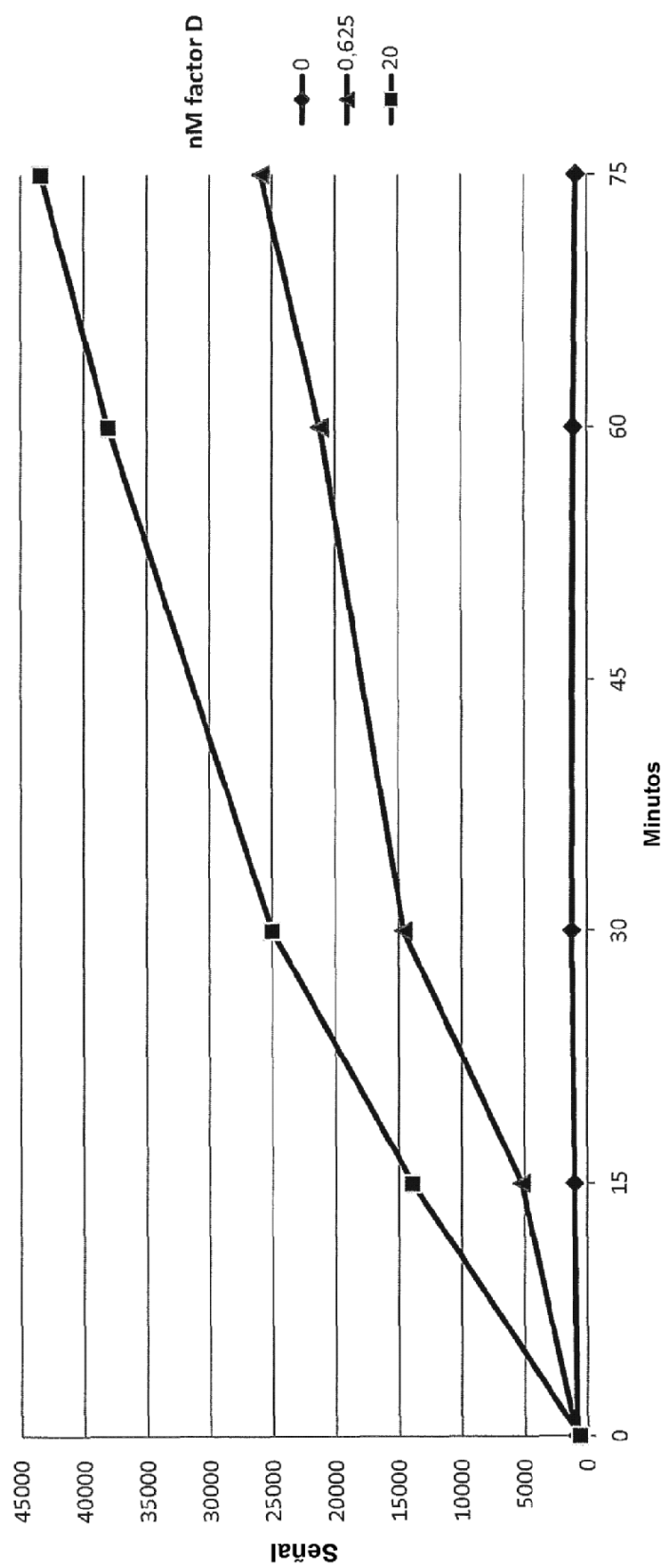


Fig. 14

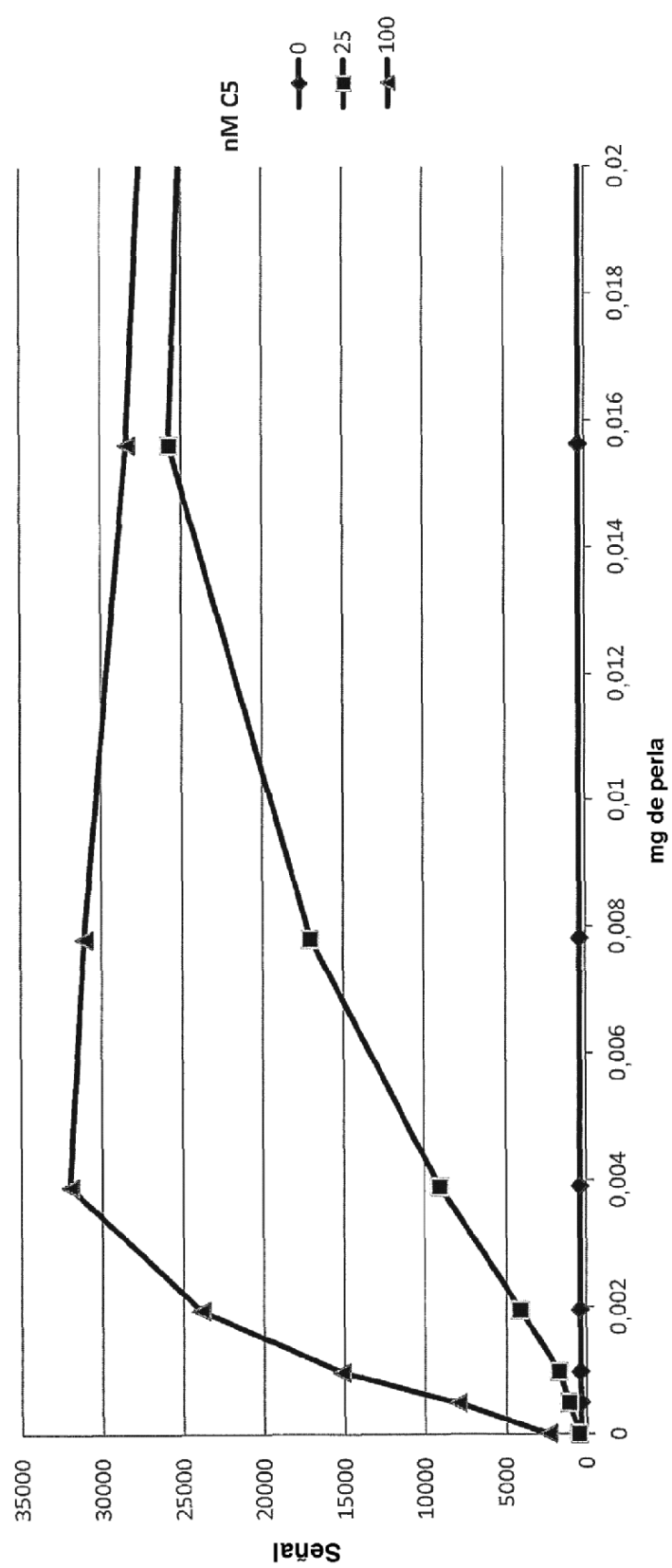


Fig. 15

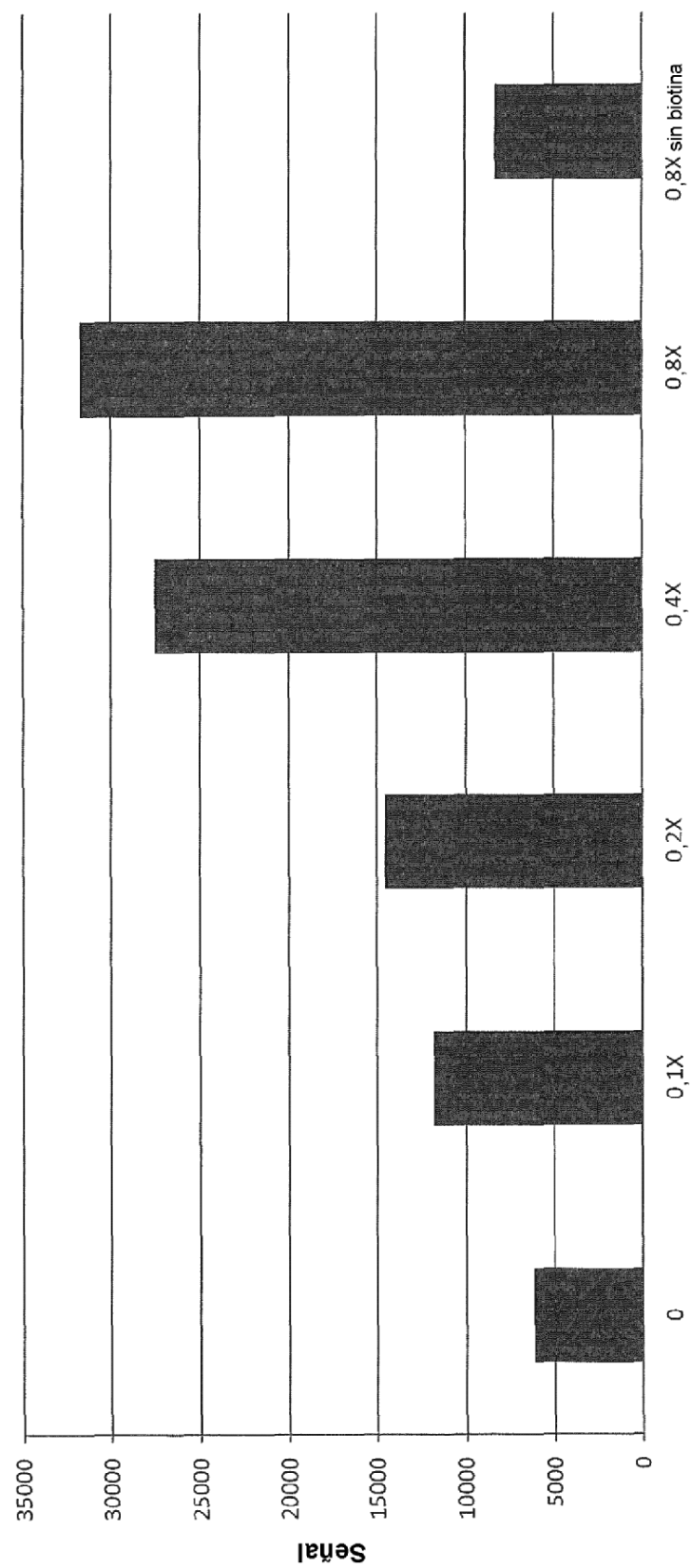


Fig. 16

