



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 353 311**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05747945 .3**

(96) Fecha de presentación : **11.05.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1745287**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

(54) Título: **Diagnóstico de enfermedades o afecciones inflamatorias para la medición de componentes del complemento sobre la superficie de glóbulos blancos.**

(30) Prioridad: **11.05.2004 US 570406 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2011

(73) Titular/es: **University of Pittsburgh - Of the
Commonwealth System of Higher Education
200 Gardner Steel Conference Center
Thackeray & O'Hara Streets
Pittsburgh, Pennsylvania 15260, US**

(72) Inventor/es: **Ahearn, Joseph M.;
Manzi, Susan M. y
Liu, Chau-Ching**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos para diagnosticar enfermedades o afecciones inflamatorias determinando los niveles de componentes de la vía del complemento sobre la superficie de glóbulos blancos.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere al diagnóstico y/o el control de pacientes con afecciones y enfermedades inflamatorias inmunológicas, por ejemplo, lupus sistémico eritematoso (SLE). La inflamación es una característica de casi todas las enfermedades o afecciones del sistema inmune y todas las enfermedades o afecciones infecciosas. Muchas afecciones y enfermedades inflamatorias crónicas, es decir, enfermedades o afecciones del sistema inmune y enfermedades o afecciones infecciosas, causan daño a múltiples sistemas orgánicos y son difíciles de diagnosticar. Como los síntomas de muchas afecciones y enfermedades inflamatorias inmunológicas solapan existe una gran necesidad de métodos de diagnóstico para diagnosticar y controlar de forma rápida y fiable enfermedades y afecciones del sistema inmune específicas. La presente invención resuelve esta y otras necesidades.

La presente invención proporciona un método para diagnosticar o controlar el lupus sistémico eritematoso (SLE) que comprende:

- (a) determinar, en una muestra sanguínea del individuo el nivel del componente C4d de la vía del complemento sobre la superficie de un linfocito T o un linfocito B en la muestra, y
- (b) comparar dichas determinaciones con, respectivamente, el nivel del componente C4d de la vía del complemento sobre la superficie de un linfocito T o linfocito B de control, donde un aumento en el nivel del componente C4d del complemento indica que el individuo tiene lupus sistémico eritematoso (SLE).

30

El diagnóstico de SLE también puede conseguirse determinando el nivel de C4d sobre un linfocito T o un linfocito B en combinación con al menos otro componente más de la vía del complemento. En una realización, se determinan los niveles de los componentes C4d y C3d del complemento para diagnosticar o controlar el SLE. Los niveles de C4d pueden determinarse como

35

anteriormente. Los niveles de C3d pueden determinarse usando, por ejemplo, anticuerpos específicos para C3d. Los anticuerpos pueden marcarse para la detección y por ejemplo, pueden usarse anticuerpos policlonales o monoclonales.

5 En otra realización, el linfocito T o linfocito B se aísla usando un anticuerpo específico para el linfocito, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8 o CD19.

 En un aspecto adicional, la invención proporciona un programa informático que, cuando se ejecuta en un ordenador, realiza un método de
10 acuerdo con la invención, comprendiendo dicho programa informático:

- (a) un código para recibir datos que corresponden a una determinación de un componente C4d del complemento depositado sobre la superficie de un linfocito T o un linfocito B;
- 15 (b) un código para recuperar un valor de referencia para el nivel del componente C4d del complemento depositado sobre la superficie de un linfocito T o un linfocito B de los individuos;
- (c) un código para comparar los datos en (a) con el valor de referencia en (b).

20

También se proporciona un medio legible en ordenador para almacenar un programa informático de acuerdo con el anterior.

Marquart et al., Clin. Exp. Immunol. 101, 60-65 (1995) describe la deposición aumentada de C3dg sobre linfocitos B en SLE.

25 Manzi et al., Lupus 13, 298-303 (2004) describe ensayos para detectar C4d sobre eritrocitos para el diagnóstico y control de la actividad de enfermedad en SLE.

 Katyal et al., Current Science 81(8), 907-914 (2001) describe que el receptor 1 del complemento se expresa en monocitos y linfocitos B y T, entre
30 otros tipos celulares.

van den Elsen et al., J. Mol. Biol. 332, 1103-1115 (2002) muestra la estructura cristalina por rayos X del fragmento C4d de C4 humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 demuestra que el componente C4d de la vía del complemento se deposita específicamente sobre linfocitos T de sangre periférica de pacientes con SLE. La deposición de C4d sobre linfocitos T de sangre periférica se determinó por un ensayo de citometría de flujo de 2 colores. Los linfocitos T se identificaron usando un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC específico para CD3 (un marcador superficial para linfocitos T), y el C4d depositado sobre estas células se determinó usando un anticuerpo monoclonal anti-C4d seguido de un anticuerpo secundario conjugado con PE. Los datos mostrados son la fluorescencia media específica de C4d (SMF) de linfocitos T de sangre periférica obtenida de pacientes con SLE (n=87, diamantes), pacientes con otras enfermedades autoinmunes (n=31, cuadrados), o controles sanos (n=19, triángulos). Se determinó empíricamente un punto de corte de fluorescencia media específica para distinguir individuos con linfocitos T C4d-positivos (SMF > 58) de aquellos con linfocitos T C4d-negativos (SMF < 58). Las frecuencias de individuos con linfocitos T C4d-positivos entre los grupos se compararon usando el ensayo Chi-cuadrado, y los valores p para cada par comparado se muestran por encima de la línea horizontal. El valor medio de la fluorescencia específica de C4d sobre los linfocitos T entre los grupos se comparó usando el ensayo T de Student y los valores p respectivos se muestran por debajo de la línea horizontal.

La Figura 2 demuestra que el componente C3d de la vía del complemento se deposita específicamente sobre linfocitos T de sangre periférica de pacientes con SLE. La deposición de C3d sobre linfocitos T de sangre periférica se determinó por un ensayo de citometría de flujo de 2 colores. Los linfocitos T se identificaron usando un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC específico para CD3 (un marcador superficial para linfocitos T), y el C3d depositado sobre estas células se determinó usando un anticuerpo monoclonal anti-C4d seguido de un anticuerpo secundario conjugado con PE. Los datos mostrados son la fluorescencia media específica de C3d de linfocitos T de sangre periférica obtenida de pacientes con SLE (n=87, diamantes), pacientes con otras enfermedades autoinmunes (n=31, cuadrados), o controles sanos (n=19, triángulos). Se determinó empíricamente un punto de corte de fluorescencia media específica para distinguir individuos con linfocitos T C3d-positivos (SMFC > 3) de aquellos con linfocitos T C3d-

negativos (SMFC < 3). Las frecuencias de individuos con linfocitos T C4d-positivos entre los grupos se compararon usando el ensayo Chi-cuadrado, y los valores p para cada par comparado se muestran por encima de la línea horizontal. El valor medio de fluorescencia específica de C3d sobre linfocitos T entre los grupos se comparó usando el ensayo T de Student y los valores p respectivos se muestran por debajo de la línea horizontal.

La Figura 3 demuestra que los ligandos C4d y C3d del complemento se depositan específicamente sobre linfocitos T de sangre periférica de pacientes con SLE. La deposición de C3d y C4d sobre linfocitos T de sangre periférica se determinó por un ensayo de citometría de flujo de 2 colores. Los linfocitos T se identificaron usando un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC específico para CD3 (un marcador superficial para linfocitos T), y el C3d/C4d depositado sobre estas células se determinó usando un anticuerpo monoclonal anti-C3d (o anti-C4d), seguido de un anticuerpo secundario conjugado con PE. Los datos mostrados son fluorescencia media específica de C3d y C4d de linfocitos T de sangre periférica obtenida de pacientes con SLE (n=87), pacientes con otras enfermedades autoinmunes (n=31), o controles sanos (n=19). Se determinaron empíricamente los puntos de corte de fluorescencia media específica para distinguir individuos con linfocitos T C3d-positivos (SMFC > 3) o individuos con linfocitos T C4d-positivos (SMFI > 58) de aquellos con linfocitos T C3d-negativos o C4d-negativos. El valor medio de fluorescencia específica de C3d sobre linfocitos T entre los grupos se comparó usando el ensayo T de Student y los valores p respectivos p son <0,0001 (no mostrados).

La Figura 4 proporciona niveles de C4d sobre la superficie de linfocitos T, linfocitos B, y monocitos. Se determinó C4d sobre diferentes tipos celulares por un ensayo de citometría de flujo de 3 colores usando anticuerpos monoclonales específicos para marcadores superficiales específicos de células y C4d o inmunoglobulinas de control de isotipo. Los niveles de C4d se calcularon como la intensidad de fluorescencia media específica (SMFI)= intensidad de fluorescencia media anti-C4d - intensidad de fluorescencia media de Ig de isotipo. ^aLas células T se identificaron sensibilizando electrónicamente células teñidas positivamente por un anticuerpo monoclonal anti-CD3. ^bLas células B se identificaron sensibilizando electrónicamente células teñidas positivamente por un anticuerpo monoclonal anti-CD 19. ^cLos monocitos se identificaron por dispersión directa y lateral y tinción negativa por anti-Cd3.

^dPacientes con otras enfermedades inflamatorias tales como miopatías inflamatorias, síndrome de Sjogren, vasculitis, fenómeno de Raynaud, y enfermedad cardiovascular. ^eEnsayo t de Student; pacientes con SLE frente a pacientes con otras enfermedades. ^fEnsayo t de; pacientes con SLE frente a

5 controles sanos.

La Figura 5 proporciona niveles de C3d sobre la superficie de linfocitos T, linfocitos B, y monocitos. Se determinó C3d sobre diferentes tipos celulares por un ensayo de citometría de flujo de 3 colores usando anticuerpos monoclonales específicos para marcadores superficiales específicos de células

10 y C3d o inmunoglobulinas de control de isotipo. Los niveles de C4d se calcularon como la intensidad de fluorescencia media específica (SMFI)= intensidad de fluorescencia media anti-C4d - intensidad de fluorescencia media de Ig de isotipo. ^aLas células T se identificaron por sensibilización electrónica de células teñidas positivamente por un anticuerpo monoclonal anti-CD3. ^bLas

15 células B se identificaron por sensibilización electrónica de células teñidas positivamente por un anticuerpo monoclonal anti-CD19. ^cLos monocitos se identificaron por dispersión directa y lateral y tinción negativa por anti-Cd3. ^dPacientes con otras enfermedades inflamatorias tales como miopatías inflamatorias, síndrome de Sjogren, vasculitis, fenómeno de Raynaud, y

20 enfermedad cardiovascular. ^eEnsayo t de Student t; pacientes con SLE frente a pacientes con otras enfermedades. ^fEnsayo t de Student; pacientes con SLE frente a controles sanos.

La Figura 6, deposición de C4d sobre células T de sangre periférica, representa los datos de la figura 1 usando una escala logarítmica sobre el eje Y

25 que proporciona un dibujo más claro de las diferencias entre los controles sanos y las patologías.

La Figura 7, deposición de C3d sobre células T de sangre periférica, representa los datos de la figura 2 usando una escala logarítmica sobre el eje Y que proporciona un dibujo más claro de las diferencias entre los controles

30 sanos y las patologías.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Introducción

Esta descripción proporciona métodos para diagnosticar y controlar

35 enfermedades o afecciones inflamatorias determinando el nivel de al menos un

componente del complemento sobre la superficie de un glóbulo blanco. Previamente, se determinaban los niveles de componente C4d del complemento y CR1 sobre eritrocitos y se usaban para diagnosticar el lupus sistémico eritematoso (SLE) en individuos. Véase, por ejemplo, el documento
5 WO03/022223 publicado el 20 de marzo de 2003.

Esta descripción es la primera que describe el diagnóstico y control de enfermedades o afecciones inflamatorias determinando el nivel de al menos un componente de la vía del complemento sobre la superficie de un glóbulo blanco.

10 En el diagnóstico de la existencia, o existencia previa, de una enfermedad o afección inflamatoria, se determina el nivel de al menos un componente de la vía del complemento depositado sobre las superficies de glóbulos blancos en una muestra. Esta determinación después se compara con las cantidades del mismo componente de la vía del complemento hallado sobre
15 las superficies de glóbulos blancos de individuos que no tienen la enfermedad o afección inflamatoria.

En el control de la actividad de la enfermedad de un paciente con una enfermedad o afección inflamatoria, se hace una determinación de al menos un componente de la vía del complemento en una muestra sanguínea del
20 paciente, y después se compara con determinaciones de las cantidades del mismo componente de la vía del complemento sobre las superficies de glóbulos blancos en una muestra obtenida del mismo paciente en el pasado. También puede hacerse una comparación con las cantidades del mismo componente de la vía del complemento halladas sobre las superficies de
25 glóbulos blancos de individuos que no tienen la enfermedad o afección inflamatoria.

Los métodos de esta descripción pueden usarse para diagnosticar y/o controlar el SLE determinando el nivel del componente C4d de la vía del complemento y, opcionalmente el componente C3d del complemento sobre
30 linfocitos. Como el SLE es un problema grave de salud, existe la necesidad de un diagnóstico relativamente preciso y temprano de esta afección. Asimismo, la capacidad de controlar la actividad de esta enfermedad es de gran importancia. Los métodos de esta descripción también pueden usarse para diagnosticar y/o controlar el SLE determinando el nivel de C4d y el nivel del componente C3d
35 de la vía del complemento sobre linfocitos.

Definiciones

Como se usa en este documento, una "enfermedad o afección inflamatoria" se refiere a cualquier enfermedad o afección inmune que causa inflamación aumentada en un individuo. Una enfermedad o afección inflamatoria también se refiere a cualquier enfermedad o afección infecciosa que causa inflamación aumentada en un individuo. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inflamatoria es una "enfermedad o afección inflamatoria crónica". Una enfermedad o afección inflamatoria crónica es una afección inflamatoria que no se resuelve después de un periodo de semanas, meses o más. Las afecciones inflamatorias crónicas pueden seguir a una afección inflamatoria aguda, o para algunas enfermedades o afecciones pueden suceder en ausencia de una enfermedad o afección inflamatoria aguda. Una enfermedad o afección inflamatoria incluye las siguientes: SLE, artritis reumatoide, vasculitis (y sus formas específicas tales como granulomatosis de Wegener), esclerodermia, miositis, enfermedad del suero, rechazo de transplantes, anemia falciforme, gota, complicaciones del embarazo tales como pre-eclampsia, esclerosis múltiple, enfermedad cardiovascular, enfermedad infecciosa tal como infección por el virus de la hepatitis C, etc. Cada una de estas enfermedades o afecciones también puede describir como enfermedades o afecciones inflamatorias crónicas.

Como se usa en este documento un "glóbulo blanco" se refiere a células sanguíneas en circulación que no son eritrocitos o reticulocitos, por ejemplo, linfocitos, por ejemplo, células T y B, células NK, eosinófilos, basófilos, granulocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, megacariocitos, células plasmáticas, células endoteliales en la circulación, y células madre.

Como se usa en este documento un "glóbulo blanco de control" se refiere a un glóbulo blanco definido anteriormente que se aísla de un individuo que no tiene una enfermedad o afección inflamatoria. Cuando se está controlando una enfermedad o afección inflamatoria en un paciente, un glóbulo blanco de control también puede referirse a un glóbulo blanco aislado del mismo paciente en un momento anterior, por ejemplo, semanas, meses, o años antes.

Como se usa en este documento la "vía o sistema del complemento" se refiere a una red compleja de más de 30 proteína funcionalmente unidas que interaccionan de un modo muy regulado para proporcionar muchas de las

funciones efectoras de la inmunidad humoral y la inflamación, sirviendo de este modo como el mecanismo de defensa principal contra infecciones bacterianas y fúngicas. Este sistema de proteínas actúa contra la invasión de organismos foráneos mediante tres vías distintas: la vía clásica (en presencia de anticuerpos) o la vía alternativa (en ausencia de anticuerpos) y la vía de lectina. Una vez activadas, las proteínas dentro de cada vía forman una cascada que implica auto-ensamblaje secuencial en complejos multimoleculares que realizan diversas funciones destinadas a erradicar los antígenos foráneos que iniciaron la respuesta. Para una revisión de la vía del complemento, véase, por ejemplo, Sim y Tsiftoglou, *Biochem. Soc. Trans.* 32:21-27 (2004).

La vía clásica se desencadena habitualmente por un anticuerpo unido a una partícula foránea. Consta de varios componentes que son específicos de la vía clásica y se denominan C1, C4, C2. Secuencialmente, la unión de C1q a un complejo antígeno-anticuerpo provoca la activación de C1r y C1s (ambas son proteasas de serina), y C1s activado escinde C4 y C2 en, respectivamente, C4a y C4b y C2a y C2b. Los fragmentos C4b y C2a se ensamblan para formar C4b2a, que escinde la proteína C3 en C3a y C3b, que completa la activación de la vía clásica. Los fragmentos C4b y C3b se someten a degradación adicional por el Factor I. Este factor escinde C4b para generar C4d y también escinde C3b, para generar iC3b seguido de C3d. Por tanto, la activación de la vía clásica del complemento puede conducir a la deposición de varios fragmentos, tales como C4d, iC3b, y C3d, sobre complejos inmunes u otras superficies diana. Dichas dianas incluyen células que circulan en la sangre, por ejemplo, linfocitos y otros glóbulos blancos, eritrocitos y plaquetas.

Como se usa en este documento un "componente de la vía del complemento" incluye las proteínas C1, C4, C2, C3 y fragmentos de las mismas, por ejemplo, C1q, C1r, C1s, C4a, C4b, C2a, C2b, C4b2a, C3a, C3b, C4c, C4d, iC3b, C3d, C3i, C3dg. También se incluyen C5, C5b, C6, C7, C8, C9, C1inh, MASP2, CR1, DAF, MCP, CD59, C3aR, C5aR, C1qR, CR2, CR3, y CR4, así como otros componentes de la vía del complemento, receptores y ligandos no enumerados específicamente en este documento.

Como se usa en este documento, "lupus sistémico eritematoso", "SLE", o "lupus" es la enfermedad autoinmune original que provoca implicación multiorgánica. Esta respuesta contra lo propio está caracterizada por autoanticuerpos dirigidos contra una diversidad de componentes celulares

nucleares y citoplasmáticos. Estos autoanticuerpos se unen a sus respectivos antígenos, formando complejos inmunes que circulan y finalmente se depositan en los tejidos. Esta deposición del complejo inmune y la activación consecuente del sistema del complemento causa inflamación crónica y daño tisular.

5 El diagnóstico y el control de la actividad de la enfermedad son problemáticos en pacientes con SLE. El diagnóstico es problemático a causa del amplio espectro de enfermedades que varían de síntomas sutiles o vagos a fallo multiorgánico amenazante de la vida. Además, otras enfermedades inflamatorias con implicación de múltiples sistemas pueden confundirse con
10 lupus, o viceversa. Se desarrollaron criterios para el propósito de clasificación de la enfermedad en 1971 (Cohen, AS, *et al.*, 1971, *Bull. Rheum. Dis.* 21:643-648) y se revisaron en 1982 (Tan, EM, *et al.*, 1982, *Arth. Rheum.* 25:1271-1277) y 1997 (Hochberg, MC. 1997, *Arth. Rheum.* 40:1725). Estos criterios pretenden asegurar que sean comparables pacientes de diferentes
15 localizaciones geográficas. De los once criterios, la presencia de cuatro o más, en serie o simultáneamente, es suficiente para la clasificación de un paciente como que tiene SLE. Aunque estos criterios sirven como recordatorios útiles de las características que distinguen el SLE de otras enfermedades autoinmunes relacionadas, son inevitablemente falibles. La determinación de la presencia o
20 ausencia de los criterios a menudo depende de la interpretación y juicio de los médicos. El rango de manifestaciones clínicas en SLE es mucho mayor que el descrito por los once criterios y cada manifestación puede variar en el nivel de actividad y gravedad de un paciente a otro. Además, los síntomas de SLE a menudo evolucionan durante el transcurso de la enfermedad. No hay un
25 ensayo definitivo para SLE hasta la fecha y, por tanto, a menudo se diagnostica mal. Esta descripción, sin embargo, proporciona métodos eficaces y precisos para el diagnóstico de SLE y otras enfermedades y afecciones inflamatorias.

El SLE progresa en una serie de brotes, o periodos de enfermedad aguda, seguidos de remisiones. Los síntomas de un brote, que varían
30 considerablemente entre pacientes e incluso dentro del mismo paciente, incluyen malestar, fiebre, dolor articular simétrico, y fotosensibilidad (desarrollo de erupciones después de una breve exposición al sol). Otros síntomas de SLE incluyen pérdida del cabello, úlceras de membranas mucosas e inflamación del revestimiento de corazón y los pulmones que conduce a dolor de pecho. Los
35 glóbulos rojos, las plaquetas y los glóbulos blancos pueden ser el objetivo en el

lupus, provocando anemia y problemas de hemorragia. De forma más grave, la deposición de complejos inmunes y la inflamación crónica en los vasos sanguíneos puede conducir a implicación renal y ocasionalmente fallo que requiere diálisis o trasplante de riñón. Como el vaso sanguíneo es una diana principal de la respuesta autoinmune en SLE, no son raras apoplejías prematuras y cardiopatías. Con el tiempo, sin embargo, estos brotes pueden conducir a daño orgánico irreversible.

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región flanqueante de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une y reconoce específicamente un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu, así como los genes de la región variable de inmunoglobulina innumerables. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de las inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente, la región de unión a antígeno de un anticuerpo será la más crítica en la especificidad y la afinidad de unión.

Una unidad estructura de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o en forma de varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental*

Immunology (Paul ed., 3ª ed. 1993). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un especialista en la técnica apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* de forma química o usando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el
5 término anticuerpo, como se usa en este documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos, o los sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o los identificados usando bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*,
10 *Nature* 348:552-554(1990)).

Para la preparación de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, monoclonales, o policlonales, pueden usarse muchas técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pág. 77-
15 96 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); y Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986)). Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de interés pueden clonarse a partir de una célula, por ejemplo,
20 los genes que codifican un anticuerpo monoclonal pueden clonarse a partir de un hibridoma y usarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. También pueden crearse bibliotecas génicas que codifiquen cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales a partir de hibridoma o células plasmáticas. Combinaciones aleatorias de los productos génicos de cadena
25 pesada y ligera generan una gran combinación de anticuerpos con diferente especificidad antigénica (véase, por ejemplo, Kuby, *Immunology* (3ª ed. 1997)). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos recombinantes (patente de Estados Unidos 4.946.778, patente de Estados Unidos Nº 4.816.567) pueden adaptarse para producir anticuerpos
30 contra polipéptidos de esta invención. También, pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros animales, para expresar anticuerpos humanizados o humanos (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*,
35 *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild *et*

al., *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); y Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)). Como alternativa, puede usarse la tecnología de presentación en fagos para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992)). Los anticuerpos también pueden hacerse biespecíficos, es decir, capaces de reconocer dos antígenos diferentes (véase, por ejemplo, el documento WO 93/08829, Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); y Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo, dos anticuerpos unidos covalentemente, o inmunotoxinas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.676.980, el documento WO 91/00360; el documento WO 92/200373; y el documento EP 03089).

En una realización, el anticuerpo se conjuga con un resto "efector". El resto efector puede ser cualquiera de varias moléculas, incluyendo restos de marcaje tales como marcadores radiactivos o marcadores fluorescentes para su uso en ensayos de diagnóstico.

La expresión "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando hace referencia a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, a menudo en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo. La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones requiere un anticuerpo que se seleccione por su especificidad por una proteína particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales creados contra un componente de la vía del complemento o contra un marcador de un glóbulo blanco, variantes polimórficas, aleles, ortólogos, y variantes modificadas de forma conservativa, o variantes de corte y ajuste, o partes de los mismos, para obtener solamente aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con el componente de la vía del complemento o el marcador de un glóbulo blanco y no con otras proteínas. Esta selección puede conseguirse extrayendo los anticuerpos que

reaccionan de forma cruzada con otras moléculas. Puede usarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica).

Un "antígeno" es una molécula que se reconoce y se une por un anticuerpo, por ejemplo, péptidos, hidratos de carbono, moléculas orgánicas, o moléculas más complejas tales como glucolípidos y glucoproteínas. La parte del antígeno que es la diana de la unión por el anticuerpo es un determinante antigénico y un pequeño grupo funcional que corresponde con un único determinante antigénico se llama un hapteno.

Un "marcador" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ^{32}P , ^{125}I , colorantes fluorescentes, reactivos electro-densos, enzimas (por ejemplo, que se usan habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas para que estén disponibles antiseros o anticuerpos monoclonales (por ejemplo, un anticuerpo específico para un componente de la vía del complemento o un marcador de un glóbulo blanco puede hacerse detectable, por ejemplo, incorporando un radiomarcador o marcador fluorescente en el anticuerpo, y usarse para detectar el componente de la vía del complemento o el marcador de un glóbulo blanco específicamente reactivo con el anticuerpo marcado). También puede usarse un anticuerpo secundario marcado para detectar un anticuerpo específico para un componente de la vía del complemento o un marcador de un glóbulo blanco.

El término "contactar" o "poner en contacto" se usa en este documento de forma intercambiable con los siguientes: combinado con, añadido a, mezclado con, pasado sobre, incubado con, rebosado, etc.

El término "inmunoensayo" es un ensayo que usa un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específica de un anticuerpo particular para aislar, marcar, y/o cuantificar el antígeno.

En ambos casos, cuando se habla de "determinación o determinar" y

"cantidad", se entiende que incluyen tanto una cantidad o cuantía de material. Cuando se mide más de un componente de la vía del complemento, por ejemplo, C4d y C3d "determinación o determinar" y "cantidad", significan además, o como alternativa, una proporción de un primer componente del complemento a un segundo componente de la vía del complemento, por ejemplo, una proporción de C4d a C3d.

Determinación del nivel de un componente de la vía del complemento sobre un glóbulo blanco.

La invención implica realizar ensayos sobre glóbulos blancos obtenidos de pacientes para determinar determine niveles de componentes de la vía del complemento. Los niveles de los componentes del complemento después se usan para diagnosticar o controlar una enfermedad o afección inflamatoria en un individuo.

Se obtienen muestras de sangre del paciente y se tratan con EDTA (tetra-acetato de etilendiamina) para inhibir la activación del complemento. Las muestras se mantienen a temperatura ambiente o en condiciones frías. Los ensayos de procesan preferiblemente en 24 horas.

En algunas realizaciones, los glóbulos blancos se aíslan de otros componentes de la muestra sanguínea. Por ejemplo, los glóbulos blancos (la capa leuco-plaquetaria) pueden aislarse del plasma y de los glóbulos rojos por centrifugación. Cada tipo de glóbulo blanco puede aislarse a través del uso de anticuerpos contra marcadores de superficie celular conocidos que son específicos para ese tipo celular, por ejemplo, un linfocito. Los anticuerpos contra marcadores de superficie celular de glóbulos blancos son conocidos para los especialistas en la técnica y están disponibles en el mercado, por ejemplo, de BD Immunocytometry Systems. Por ejemplo, los marcadores de superficie celular CD3, CD4, CD8, y CD19 son específicos para linfocitos y están disponibles anticuerpos monoclonales específicos para CD3, CD4, CD8, y CD19 en BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA.

El aislamiento de glóbulos blancos puede hacerse uniendo un anticuerpo específico para un marcador de superficie celular a un soporte sólido, después poniendo en contacto una muestra que contiene los glóbulos blancos con el anticuerpo unido. Las células contaminantes se eliminan por lavado permitiendo que se recojan los glóbulos blancos aislados.

En algunas realizaciones, se usa FACS para aislar un glóbulo blanco, por ejemplo, un linfocito. El término "FACS" se refiere a clasificación celular activada por fluorescencia, una técnica usada para separar células de acuerdo con su contenido de moléculas particulares de interés. La molécula de interés
5 puede ser específica para un tipo de célula o para un estado celular particular. La molécula de interés puede marcarse de forma fluorescente directamente uniendo un colorante fluorescente, o uniendo una segunda molécula, que se ha marcado de forma fluorescente, por ejemplo, un anticuerpo, lectina o aptámero que se ha marcado de forma fluorescente y que se une específicamente a la
10 molécula de interés. Por tanto, pueden usarse marcadores específicos de glóbulos blancos para aislar glóbulos blancos de otras células en una muestra sanguínea.

El aislamiento de glóbulos blancos también se refiere a técnicas de sensibilización usadas para ensayar una población celular particular durante
15 análisis de citometría de flujo. Se usa un marcador marcado específico para una población de glóbulos blancos de interés para analizar esas células a partir de una población. Después se usa un segundo marcador marcado para determinar el nivel de un componente de la vía del complemento sobre la superficie del glóbulo blanco.

La determinación del nivel de un componente de la vía del complemento
20 puede hacerse por varios métodos incluyendo citometría de flujo, ELISA usando lisados de glóbulos blancos, y radioinmunoensayo. En una realización de esta invención, la determinación de los niveles de un componente de la vía del complemento se hace usando métodos de citometría de flujo, con
25 mediciones tomadas por inmunofluorescencia directa o indirecta usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el componente de la vía del complemento. Se determina el canal de fluorescencia media (MFC) para el componente de la vía del complemento del glóbulo blanco. La determinación de componentes del complemento, por ejemplo, C4d, CR1 y, sobre la
30 superficie de glóbulos rojos o plaquetas se describe en el documento WO03/022223, publicado el 20 de marzo de 2003 y en el documento USSN 60/463.447, presentado el 16 de abril de 2003.

En una realización, los niveles del componente C4d de la vía del complemento o el componente C3d del complemento se determinan sobre la
35 superficie de linfocitos para diagnosticar o controlar el progreso del SLE en

individuos. Los linfocitos se aíslan o detectan usando anticuerpos específicos para linfocitos, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8, o CD19. En algunas realizaciones, se determinan los niveles del componente C4d de la vía del complemento y el componente C3d de la vía del complemento. La determinación de los niveles de C4d y C3d puede hacerse por varios métodos incluyendo citometría de flujo, ELISA usando lisados de linfocitos, y radioinmunoensayo. En una realización de esta invención, la determinación de los niveles de C4d y C3d se ha usando métodos de citometría de flujo, con mediciones tomadas por inmunofluorescencia directa o indirecta usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para C4d o C3d. Se determina el canal de fluorescencia media (MFC) para C4d o C3d de linfocitos. Puede usarse el mismo tipo de ensayo para el diagnóstico o para el control de la actividad de la enfermedad en pacientes que se sabe que tienen SLE.

15 Kits

Se describen kits para realizar los ensayos tanto para diagnosticar una enfermedad inflamatoria como para controlar la actividad de la enfermedad inflamatoria pero no se reivindican. Dichos kits usarán cualquiera de los diversos reactivos necesarios para realizar los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, usando los ensayos de inmunofluorescencia, los kits generalmente comprenderán un conjugado de un anticuerpo monoclonal específico para el componente de la vía del complemento (por ejemplo, anticuerpos anti-C4d o C3d) con un resto fluorescente, y preferiblemente también un conjugado de una anticuerpo monoclonal específico para un glóbulo blanco de interés (por ejemplo, linfocitos usando, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8, y CD19) con un resto fluorescente diferente. Además, los kits pueden comprender material instructivo para el usuario y otros materiales que pueden ser necesarios para realizar ensayos de este tipo, por ejemplo, tampones, anticuerpos radiomarcados, reactivos colorimétricos, etc.

Los anticuerpos para su uso en estos métodos y kits son conocidos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales específicos para CD3, CD4, CD8, y CD19 están disponibles en Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA. Los anticuerpos anti-C4d y anti-C3d están disponibles en Quidel Corp. en San Diego, California y se describen en líneas generales en Rogers, J., N. Cooper, *et al.* *PNAS* 89:10016-10020, (1992); Schwab, C. *et al.* *Brain*.

Res. 707(2):196 (1996); Gemmell, C. J. *Biomed. Mater. Res.* 37:474-480, (1997); y, Stoltzner, S.E., *et al. Am. J. Path.* 156:489-499, (2000).

Métodos de diagnóstico

5 El diagnóstico de un paciente con SLE se realiza comparando la determinación de C4d (y opcionalmente C3d) con un valor o intervalo de valores basal para las cantidades de C4d (y opcionalmente C3d) típicamente presentes sobre las superficies de linfocitos T o linfocitos B en individuos normales.

10 Por ejemplo, el diagnóstico de un paciente con SLE se realiza comparando la determinación de C4d y, opcionalmente C3d con un valor o intervalo de valores basal para las cantidades de C4d y C3d típicamente presentes sobre las superficies de linfocitos en individuos normales. En individuos normales, ocasionalmente pueden detectarse niveles bajos de C4d
15 pero C3d no está presente. Cuando se usa medición por citometría de flujo con inmunofluorescencia indirecta, el MFC de C4d y C3d sobre linfocitos de individuos sanos varía de 1,25 a 58,63 (media 17,02) y de -3,42 a 2,67 (media 0,52), respectivamente. (Tablas 1 y 3). El MFC de linfocitos C4d y C3d en pacientes que tenían SLE era mayor que el de los individuos sanos y variaba
20 de -2,62 a 1057,19 (media 201,06) y de -3,95 a 318,18 (media 62,42), respectivamente (Tablas 2 y 3).

Control de pacientes

Una característica particular de los métodos de esta invención es indicar
25 o reflejar la actividad inflamatoria que ha existido en el paciente durante las varias semanas o incluso varios meses precedentes. Es posible, usando este procedimiento, identificar la existencia de un brote de una enfermedad o afección inflamatoria, tal como SLE, durante unas pocas semanas previas o incluso posiblemente los varios meses previos debido a la presencia de
30 componentes de la vía del complemento depositados sobre la superficie de glóbulos blancos, por ejemplo, C4d y C3d depositados sobre la superficie de linfocitos.

Automatización y software informático

35 Las determinaciones de los componentes de la vía del complemento, por

ejemplo, C4d y, opcionalmente C3d, y los métodos de diagnóstico y control de la actividad de la enfermedad descritos anteriormente pueden realizarse manualmente, pero a menudo se realizan convenientemente usando un sistema y/o equipo automatizado, en el que se analiza la muestra sanguínea de forma automática para hacer la determinación o determinaciones necesarias, y la comparación con el valor basal o de referencia se realiza automáticamente, usando el software informático apropiado para ese propósito.

También se describe un método para diagnosticar o controlar el SLE en un individuo, que comprende (a) determinar automáticamente, en una muestra sanguínea del individuo, que contiene linfocitos, los componentes del complemento C4d y, opcionalmente C3d depositados sobre las superficies de los linfocitos de la muestra, y (b) comparar automáticamente dichas determinaciones con valores de referencia para los componentes C4d y C3d sobre las superficies de linfocitos.

15

(1): un medio legible en ordenador, que comprende:

un código para recibir datos que corresponden a una determinación de los componentes C4d y, opcionalmente C3d del complemento depositados sobre las superficies de linfocitos; un código para recuperar un valor de referencia para los componentes C4d y, opcionalmente C3d del complemento depositados sobre las superficies de linfocitos de individuos; y un código para comparar los datos en (a) con el valor de referencia de (b).

El software informático, o medio legible en ordenador para su uso en los métodos de esta invención incluyen:

(1): un medio legible en ordenador, que comprende:
un código para recibir datos que corresponden a una determinación de los componentes C4d y, opcionalmente C3d del complemento depositados sobre las superficies de linfocitos; un código para recuperar un valor de referencia para los componentes C4d y, opcionalmente C3d del complemento depositados sobre las superficies de linfocitos de individuos; y un código para comparar los datos en (a) con el valor de referencia de (b).

En realizaciones de la invención, pueden almacenarse uno o más

valores de referencia en una memoria asociada con un ordenador digital. Después de obtener los datos que corresponden a determinaciones de componentes de la vía del complemento (por ejemplo, a partir de un instrumento analítico apropiado), el ordenador digital puede comparar los datos del componente de la vía del complemento con uno o más valores de referencia apropiados. Después de que tenga lugar esta comparación, el ordenador digital puede determinar automáticamente si los datos que corresponden a la determinación del componente de la vía del complemento están asociados con una enfermedad o afección inflamatoria de interés.

En algunas realizaciones de la invención, pueden almacenarse uno o más valores de referencia en una memoria asociada con un ordenador digital. Después de obtener los datos que corresponden a determinaciones de C4d y C3d del complemento (por ejemplo, a partir de un instrumento analítico apropiado), el ordenador digital puede comparar los datos de C4d y C3d con uno o más valores de referencia apropiados. Después de que tenga lugar esta comparación, el ordenador digital puede determinar automáticamente si los datos que corresponden a la determinación de C4d y C3d del complemento están asociados con SLE.

Por consiguiente, algunas realizaciones de la invención pueden estar incorporadas por un código informático que se ejecuta por un ordenador digital. El ordenador digital puede ser un ordenador de ensamblaje micro, mini o grande que usa cualquier sistema operativo convencional o especializado tal como un sistema operativo basado en Windows™. El código puede almacenarse en cualquier medio legible en ordenador adecuado. Los ejemplos de medios legibles en ordenador incluyen discos, cintas, pinchos, chips magnéticos, electrónicos, u ópticos, etc. El código también pueden escribirlo los especialistas en la técnica y en cualquier lenguaje de programación informática incluyendo, C, C++, etc.

EJEMPLOS Y DATOS EXPERIMENTALES

A continuación se proporcionan ejemplos a modo de ilustración solamente y no a modo de limitación. Los especialistas en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplo 1: Ensayos de C4d y C3d de Linfocitos en Controles Sanos: Negativos

Se estudiaron diecinueve individuos sanos. Como se muestra en la Tabla 1, no se detectó C3d o se detectó escasamente sobre linfocitos de cada uno de los diecinueve individuos sanos. Se tomaron muestras de 3 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA de cada individuo y se usaron como fuente de linfocitos y otros glóbulos blancos. Los linfocitos se lavaron y se resuspendieron en tampón en FACS. Se midieron los niveles de C4d, C3d, y CD3 por inmunofluorescencia indirecta de dos colores usando anticuerpos monoclonales específicos para C4d, C3d, y CD3, respectivamente. Los niveles de C4d y C3d se cuantificaron por citometría de flujo usando un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson). Los linfocitos se identificaron por dispersión directa y lateral y fluorescencia CD3, y se determinó el canal de fluorescencia media (MFC) para C4d y C3d.

Más particularmente, se centrifugó sangre extraída en un Vacutainer™ que contenía EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a 200 xg. Se recogió cuidadosamente la capa leuco-plaquetaria que contenía glóbulos blancos (WBC), se transfirió a un tubo reciente, y se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de eliminar los eritrocitos contaminantes por lisis hipotónica, se lavaron los leucocitos restantes con PBS y se marcaron de forma inmunofluorescente usando diferentes combinaciones de anticuerpos específicos para un análisis de citometría de flujo de dos colores. Los anticuerpos usados en el estudio inicial incluían: 1) anticuerpos específicos para marcadores de linaje celular, por ejemplo, anti-CD3, anti-CD4, y anti-CD8 para linfocitos T, anti-CD19 para linfocitos B, y anti-CD 14 para monocitos (BD PharMingen, San Diego, CA), y 2) anticuerpos reactivos para C4d o C3d del complemento (Quidel, San Diego, CA), o la IgG de ratón de control de isotipo MOPC21. Las células teñidas después se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCalibur™ y el software CellQuest™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Los linfocitos se sensibilizaron electrónicamente por propiedades de dispersión directa y expresión de CD3 (o CD4, CD8, CD 19), marcadores específicos para subconjuntos de linfocitos. La unión no específica de inmunoglobulinas a linfocitos se determinó realizando ensayos idénticos en paralelo usando el anticuerpo de control de isotipo MOPC21 (obtenido de la ATCC). La unión específica de anti-C4d y anti-C3d se determinó restando el MFC obtenido con

MOPC21 del MFC obtenido con anti-C4d y anti-C3d respectivamente.

Ejemplo 2: Ensayos de C4d/C3d de Linfocitos para Distinguir Pacientes con SLE de Controles Sanos

5 Este ejemplo describe la realización de ensayos sobre pacientes para diagnosticar SLE, y para establecer valores o rangos de valores de referencia para los componentes C4d y C3d del complemento.

Para este propósito, se reclutaron 87 pacientes con SLE del consultorio de pacientes no hospitalizados. Se hizo una única determinación de C4d/C3d de linfocitos en 87 individuos que cumplieran los criterios ACR para el diagnóstico de SLE (Tabla 2) y en 19 controles sanos (Tabla 1). Se muestran los valores medios de C4d y C3d para pacientes con SLE y controles sanos en la Tabla 3. Mientras que el valor medio para C4d y C3d en individuos sanos era 17,02 y 0,52, respectivamente, el valor medio para C4d y C3d entre los 15 pacientes con SLE era de 201,06 y 62,42, respectivamente (ambos $p=0,0001$).

Tabla 1. Niveles de C4d y C3d sobre la Superficie de Linfocitos de Controles Sanos

20	Control Sano Nivel de C4d (SMFC)^a Nivel de C3d (SMFC)		
	2005	58,23	-2,18
	2007	2,36	-1,19
	2008	7,9	0,35
	2009	1,25	1,81
	2022	10,45	1,56
25	2003	12,95	2,67
	2034	2,95	0,45
	2021	20,12	-1,37
	2028	5,66	-1,21
	2006	3,34	ND ^b
30	2013	7,12	1,62
	2011	24,00	-3,42
	2037	4,91	-1,97
	2010	22,00	3,11
	2025	37,41	1,57

2026	34,55	2,57
2036	22,86	1,55
2029	20,91	1,31
2035	24,36	2,22

5

a: canal de fluorescencia media especifica

b: no realizado

Tabla 2. Niveles de C4d y C3d sobre la Superficie de Linfocitos de Pacientes con SLE

10

15

20

25

30

35

Paciente	SLE	Nivel de C4d (SMFC)	Nivel de C3d (SMFC)
1039		768,02	68,07
107		646,51	253,23
1078		12,71	1,53
1089		0,26	-3,8
1072		12,47	-2,61
1012		31,48	15,65
1019		30,84	-9,50
1037		0,04	-3,86
1047		355,46	222,75
1003		894,69	144,30
1006		ND	133,26
1079		14,80	16,17
1052		548,01	216,67
1038		300,77	348,40
1063		20,80	15,09
1095		3,63	33,13
1097		34,73	25,87
1092		46,44	20,25
1016		352,77	318,28
1093		-2,62	1,06
1094		15,49	6,52
1034		17,92	8,10
1066		540,76	74,75
1009		1183,30	65,33
1014		141,62	54,80

Tabla 2
(Continúa)

	Paciente	SLE Nivel de C4d (SMFC)	Nivel de C3d (SMFC)
5	1031	82,67	64,40
	1086	5,56	-1,29
	1098	16,01	0,29
	1099	8,79	7,15
	1015	1709,54	258,91
10	1100	19,99	18,49
	1101	118,94	19,61
	1102	191,47	29,13
	1053	107,76	42,44
	1059	108,89	106,60
15	1084	61,48	29,58
	1103	43,90	-1,74
	1104	119,49	4,61
	1105	910,93	202,49
	1107	44,64	0,00
20	1109	40,17	17,67
	1110	244,78	88,44
	1111	18,05	5,77
	1085	289,48	39,73
	1043	6,45	5,46
25	1056	-1,45	-1,75
	1106	66,56	12,77
	1114	241,22	25,51
	1017	166,47	43,17
	1021	201,31	111,77
30	1032	371,08	77,65
	1045	4,75	5,23
	1115	57,70	20,08
	1116	76,77	23,16
	1117	55,45	9,87
35	1118	48,58	-1,94

Tabla 2
(Continúa)

	Paciente	SLE Nivel de C4d (SMFC)	Nivel de C3d (SMFC)
5	1030	50,43	15,72
	1061	361,15	165,87
	1119	95,70	29,16
	1121	1057,19	263,21
	1122	600,58	262,34
10	1124	23,24	24,69
	1125	186,13	65,40
	1036	763,59	185,30
	1044	37,00	12,39
	1055	19,95	ND
15	1126	235,13	23,29
	1132	745,91	244,91
	1133	15,36	-1,62
	1136	31,47	12,88
	1137	314,99	258,50
20	1138	11,33	0,01
	1140	11,98	-0,62
	1013	115,8	100,20
	1082	339,3	49,31
	1048	5,07	-2,48
25	1060	5,96	3,59
	1141	5,85	-2,56
	1142	17,23	-3,95
	1143	1,84	0,60
	1080	49,98	32,36
30	1144	-1,76	-0,05
	1145	-0,63	-0,67
	1146	82,63	15,68
	1147	497,35	227,98
	1037	1,71	-1,42
35	1150	202,73	101,35

Ejemplo 3: Ensayo de C4d/C3d de Linfocitos para Distinguir Pacientes con SLE de Pacientes con otras Enfermedades

Estos estudios de pacientes con SLE frente a controles sanos estuvieron seguidos de estudios para comparar pacientes con SLE con pacientes diagnosticados con enfermedades diferentes a SLE (n=31; pacientes con artritis reumatoide, esclerodermia, o miositis inflamatoria). Se hizo una única determinación de C4d/C3d de linfocitos, usando el mismo ensayo (Tabla 4). Los valores medios de C4d y C3d para pacientes con SLE, comparaos con 10 pacientes con otras enfermedades se muestran en la Tabla 3. Mientras que el valor medio para C4d y C3d en pacientes con otras enfermedades eran 29,60 y 12,73, respectivamente, el valor medio para C4d y C3d entre los pacientes con SLE era 201,06 y 62,42, respectivamente (ambos $p < 0,0001$).

Tabla 3. Análisis de Niveles de C4d y C3d de Linfocitos

	Nivel de C4d (SMFC) ^a		Nivel de C3d (SMFC) ^b		intervalo
	media +/- SD	intervalo	media +/- SD		
SLE	201,06 +/- 313,56	-2,62 - 1057,19	62,42 +/- 89,25	-3,95 - 318,18	
Otras enfermedades	29,60 +/- 55,13	0 - 263,95	12,73 +/- 29,07	-4,95 - 141,82	
Control sano	17,02 +/- 14,86	1,25 - 58,23	0,52 +/- 1,94	-3,42 - 2,67	

*Los leucocitos teñidos con FITC-anti-CD3 y PE-anti-C4d o PE-anti-C3d se sometieron a análisis de citometría de flujo de 2 colores.

Los linfocitos T CD3+ se sensibilizaron electrónicamente y se analizaron para los niveles de C4d y C3d depositados sobre la superficie.

a: Intensidad de fluorescencia media específica (SMFC) de los niveles de C4d detectados sobre linfocitos T CD3+

b: SMFC de los niveles de C3d detectados sobre linfocitos T CD3+

Tabla 4. Niveles de C4d y C3d sobre la Superficie de Linfocitos de Pacientes con otras Enfermedades

	Otras Enfermedades	Nivel de C4d (SMFC)	Nivel de C3d (SMFC)
5	17001	2,88	0,24
	13010	71,03	10,62
	3042	10,11	4,91
	4001	8,17	-0,92
	5001	15,83	-0,12
10	6013	20,37	19,91
	6008	10,88	-4,95
	6014	19,17	4,38
	3022	12,92	-4,60
	4025	26,00	7,2
15	13032	25,41	56,25
	6017	43,70	26,23
	4033	11,97	3,44
	4028	173,06	7,98
	6011	9,11	2,20
20	18002	15,33	8,38
	4002	85,99	16,51
	8021	4,98	11,22
	15005	1,41	-1,71
	3029	10,33	0,00
25	3030	4,41	-3,04
	3031	263,95	141,82
	3032	0,00	-3,12
	3034	7,37	70,23
	3035	14,01	9,63
30	4026	0,42	-0,24
	6002 '	2,07	-0,52
	6008	10,93	2,76
	6015	3,98	0,70
	4030	21,01	3,12
35	15003	10,88	0,76

Ejemplo 4: Ensayo de C4d de Linfocitos para Distinguir Pacientes con SLE

El componente C4d de la vía del complemento se deposita específicamente sobre linfocitos T de sangre periférica de pacientes con SLE. La deposición de C4d sobre linfocitos T de sangre periférica se determinó por un ensayo de citometría de flujo de 2 colores. Los linfocitos T se identificaron usando un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC específico para CD3 (un marcador superficial para linfocitos T), y el C4d depositado sobre estas células se determinó usando un anticuerpo monoclonal anti-C4d seguido de un anticuerpo secundario conjugado con PE. Los resultados se muestran en la Figura 1. Los datos mostrados son la fluorescencia media específica (SMF) de C4d de linfocitos T de sangre periférica obtenida de pacientes con SLE (n=87), pacientes con otras enfermedades autoinmunes (n=31), o controles sanos (n=19). Se determinó empíricamente un punto de corte de fluorescencia media específica para distinguir individuos con linfocitos T C4d-positivos (SMF > 58) de aquellos con linfocitos T C4d-negativos (SMF < 58). Mientras que ninguno de los controles sanos tenía niveles de C4d por encima del punto de corte (0/19), casi la mitad de los pacientes con SLE tenían niveles de C4d por encima del punto de corte (42/87), y algunos de los pacientes con otras enfermedades autoinmunes tenían niveles de C4d por encima del punto de corte (4/31). Se compararon las frecuencias de individuos con linfocitos T C4d-positivos entre los grupos usando el ensayo Chi-cuadrado, y los valores p para cada par comparado se muestran por encima de la línea horizontal. El valor medio de la fluorescencia específica de C4d sobre linfocitos T entre los grupos se comparó usando el ensayo T de Student y los valores p respectivos se muestran por debajo de la línea horizontal. La Figura 6 presenta estos datos con una escala logarítmica sobre el eje X.

Ejemplo 5: Ensayo de C3d de Linfocitos para Distinguir Pacientes con SLE y otras enfermedades inflamatorias.

El componente C3d de la vía del complemento se deposita específicamente sobre linfocitos T de sangre periférica de pacientes con SLE y de pacientes con otras enfermedades inflamatorias. La deposición de C3d sobre linfocitos T de sangre periférica se determinó por un ensayo de citometría de flujo de 2 colores. Los linfocitos T se identificaron usando un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC específico para CD3 (un marcador superficial

para linfocitos T), y el C3d depositado sobre estas células se determinó usando un anticuerpo monoclonal anti-C4d seguido de un anticuerpo secundario conjugado con PE. Los resultados se muestran en la Figura 2. Los datos mostrados son fluorescencia media específica de C3d de linfocitos T de sangre periférica obtenida de pacientes con SLE (n=87), pacientes con otras enfermedades autoinmunes (n=31), o controles sanos (n=19). Se determinó empíricamente un punto de corte de fluorescencia media específica para distinguir individuos con linfocitos T C3d-positivos (SMFC > 3) de aquellos con linfocitos T C3d-negativos (SMFC < 3). Mientras que ninguno de los controles sanos tenía niveles de C3d por encima del punto de corte (0/19), casi el 75% de los pacientes con SLE tenía niveles de C3d por encima del punto de corte (65/87), y aproximadamente la mitad de los pacientes con otras enfermedades autoinmunes tenía niveles de C3d por encima del punto de corte (15/31). Las frecuencias de individuos con linfocitos T C4d-positivos entre los grupos se compararon usando el ensayo Chi-cuadrado, y los valores p para cada par se muestran por encima de la línea horizontal. El valor medio de fluorescencia específica de C3d sobre linfocitos T entre los grupos se comparó usando el ensayo T de Student y los valores p respectivos se muestran por debajo de la línea horizontal. La Figura 7 presenta estos datos con una escala logarítmica sobre el eje X.

Ejemplo 6: Sumario de ensayos que usan T-linfocitos y comparación con ensayos que usan linfocitos B o monocitos.

Los ligandos del complemento C4d y C3d se depositan específicamente sobre linfocitos T de sangre periférica de pacientes con SLE. La Figura 3 muestra la deposición de C3d y C4d sobre linfocitos T de sangre periférica que se determinó por un ensayo de citometría de flujo de 2 colores. Los linfocitos T se identificaron usando un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC específico para CD3 (un marcador superficial para linfocitos T), y el C3d/C4d depositado sobre estas células se determinó usando un anticuerpo monoclonal anti-C3d (o anti-C4d), seguido de un anticuerpo secundario conjugado con PE. Los datos mostrados son fluorescencia media específica de C3d y C4d de linfocitos T de sangre periférica obtenida de pacientes con SLE (n=87), pacientes con otras enfermedades autoinmunes (n=31), o controles sanos (n=19). Se determinaron empíricamente puntos de corte de fluorescencia

media específica para distinguir individuos con linfocitos T C3d-positivos (SMFC > 3) o individuos con linfocitos T C4d-positivos (SMFI > 58) de aquellos con linfocitos T C3d-negativos o C4d-negativos. El valor medio de fluorescencia específica de C3d sobre linfocitos T entre los grupos se comparó usando el
5 ensayo T de Student y los valores p respectivos son <0,0001 (no mostrados). Los niveles de C4d eran significativamente mayores en linfocitos T de pacientes con SLE, en comparación con pacientes con otras enfermedades o en comparación con controles sanos. Lo niveles de C3d también eran
10 significativamente mayores en linfocitos T de pacientes con SLE, en comparación con pacientes con otras enfermedades o en comparación con controles sanos.

Se determinaron los niveles de C4d sobre la superficie de linfocitos T, linfocitos B, y monocitos de pacientes con SLE, pacientes con otras enfermedades, y controles sanos. Se determinó C4d sobre diferentes tipos de
15 células por un ensayo de citometría de flujo de 3 colores usando anticuerpos monoclonales específicos para marcadores superficiales específicos de células y C4d o inmunoglobulinas de control de isotipo. Los niveles de C4d se calcularon como la intensidad de fluorescencia media específica (SMFI)= intensidad de fluorescencia media anti-C4d - intensidad de fluorescencia media
20 de Ig de isotipo. Las células T se identificaron por sensibilización electrónica de células teñidas positivamente por un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Las células B se identificaron por sensibilización electrónica de células teñidas positivamente por un anticuerpo monoclonal anti-CD 19. Los monocitos se identificaron por dispersión directa y lateral y tinción negativa por anti-Cd3.
25 Pacientes con otras enfermedades inflamatorias tales como miopatías inflamatorias, síndrome de Sjogren, vasculitis, fenómeno de Raynaud, y enfermedad cardiovascular. °Ensayo t de Student; pacientes con SLE frente a pacientes con otras enfermedades. [Los niveles de C4d eran significativamente mayores en linfocitos T, linfocitos B, y monocitos de pacientes con SLE, en
30 comparación con pacientes con otras enfermedades o en comparación con controles sanos].

Se determinaron los niveles de C3d sobre la superficie de linfocitos T, linfocitos B, y monocitos de pacientes con SLE, pacientes con otras enfermedades, y controles sanos. Se determinó C3d sobre diferentes tipos de
35 células por un ensayo de citometría de flujo de 3 colores usando anticuerpos

monoclonales específicos para marcadores superficiales específicos de células y C3d o inmunoglobulinas de control de isotipo. Los niveles de C4d se calcularon como la intensidad de fluorescencia media específica (SMFI)= intensidad de fluorescencia media anti-C4d - intensidad de fluorescencia media de Ig de isotipo. Las células T se identificaron por sensibilización electrónica de células teñidas positivamente por un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Las células B se identificaron por sensibilización electrónica de células teñidas positivamente por un anticuerpo monoclonal anti-CD19. Los monocitos se identificaron por dispersión directa y lateral y tinción negativa por anti-CD3.

5

10 Pacientes con otras enfermedades inflamatorias tales como miopatías inflamatorias, síndrome de Sjogren, vasculitis, fenómeno de Raynaud, y enfermedad cardiovascular. Los niveles de C3d también eran significativamente mayores en linfocitos T, linfocitos B, y monocitos de pacientes con SLE, en comparación con pacientes con otras enfermedades o

15 en comparación con controles sanos.

A partir de las figuras y los datos, puede observarse que la activación del complemento participa en un amplio intervalo de procesos inflamatorios e inmunes normales y anormales. Por lo tanto, patrones anormales de productos de activación del complemento y receptores del complemento sobre glóbulos

20 blancos son útiles en el diagnóstico y/o control de enfermedades inflamatorias e inmunes diferentes del lupus sistémico eritematoso. Los datos de las Figuras 1-4 apoyan esto. Aunque los niveles mayores de C3d y C4d en células T de sangre periférica tienen lugar en pacientes con SLE, se detectan niveles anormales de C3d en células T obtenidas de 15/31 (48,4%) pacientes con otras

25 enfermedades. Además, los niveles medios de C3d sobre células T obtenidas de pacientes con otras enfermedades son significativamente mayores que los niveles medios de C3d sobre células T obtenidas de controles sanos ($p=0,027$).

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar o controlar lupus sistémico eritematoso (SLE), que comprende:
 - 5 (a) determinar, en una muestra sanguínea del individuo, el nivel del componente C4d de la vía del complemento sobre la superficie de un linfocito T o un linfocito B en la muestra, y
 - (b) comparar dichas determinaciones con, respectivamente, el nivel del componente C4d de la vía del complemento sobre la superficie de un linfocito T o linfocito B de control, donde un aumento en el nivel de componente C4d del
10 complemento indica que el individuo tiene lupus sistémico eritematoso (SLE).
2. El método de la reivindicación 1, en el que los glóbulos blancos se aíslan usando un anticuerpo anti-CD3.
15
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el nivel del componente C4d del complemento se determina usando un anticuerpo específico para el componente C4d del complemento.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo contra C4d está marcado.
5. El método de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo contra C4d es un anticuerpo monoclonal.
25
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se determina el nivel de al menos otro componente del complemento.
7. El método de la reivindicación 6, en el que se determina el nivel del
30 componente C3d del complemento.
8. El método de la reivindicación 7, en el que se determina el nivel del componente C3d del complemento usando un anticuerpo específico para el componente C3d del complemento.
35

9. El método de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo contra C3d está marcado.
10. El método de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo contra C3d es un anticuerpo monoclonal.
11. El método de la reivindicación 1, que comprende:
- (a) determinar, en una muestra sanguínea del individuo, el nivel del componente C4d de la vía del complemento sobre la superficie de un linfocito T en la muestra, y
 - (b) comparar dichas determinaciones con, respectivamente, el nivel del componente C4d de la vía del complemento sobre la superficie de un linfocito T de control, donde un aumento en el nivel del componente C4d del complemento indica que el individuo tiene lupus sistémico eritematoso (SLE).
12. El método de la reivindicación 1, que comprende:
- (a) determinar, en una muestra sanguínea del individuo, el nivel del componente C4d de la vía del complemento sobre la superficie de un linfocito B en la muestra, y
 - (b) comparar dichas determinaciones con, respectivamente, el nivel del componente C4d de la vía del complemento sobre la superficie de un linfocito B de control, donde un aumento en el nivel del componente C4d del complemento indica que el individuo tiene lupus sistémico eritematoso (SLE).
13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha determinación y comparación se realiza por un programa informático, comprendiendo dicho programa informático:
- (a) un código para recibir datos que corresponden a una determinación de un componente C4d del complemento depositado sobre la superficie de un linfocito T o un linfocito B;
 - (b) un código para recuperar un valor de referencia para el nivel del componente C4d del complemento depositado sobre la superficie de un linfocito T o un linfocito B de individuos;
 - (c) un código para comparar los datos en (a) con el valor de referencia en (b).

14. Un programa informático que, cuando se ejecuta por un ordenador, realiza un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho programa informático:

5 (a) un código para recibir datos que corresponden a una determinación de un componente C4d del complemento depositado sobre la superficie de un linfocito T o un linfocito B;

(b) un código para recuperar un valor de referencia para el nivel del componente C4d del complemento depositado sobre la superficie de un
10 linfocito T o un linfocito B de individuos;

(c) un código para comparar los datos en (a) con el valor de referencia en (b).

15. Un medio legible en ordenador que almacena un programa informático
15 de acuerdo con la reivindicación 14.

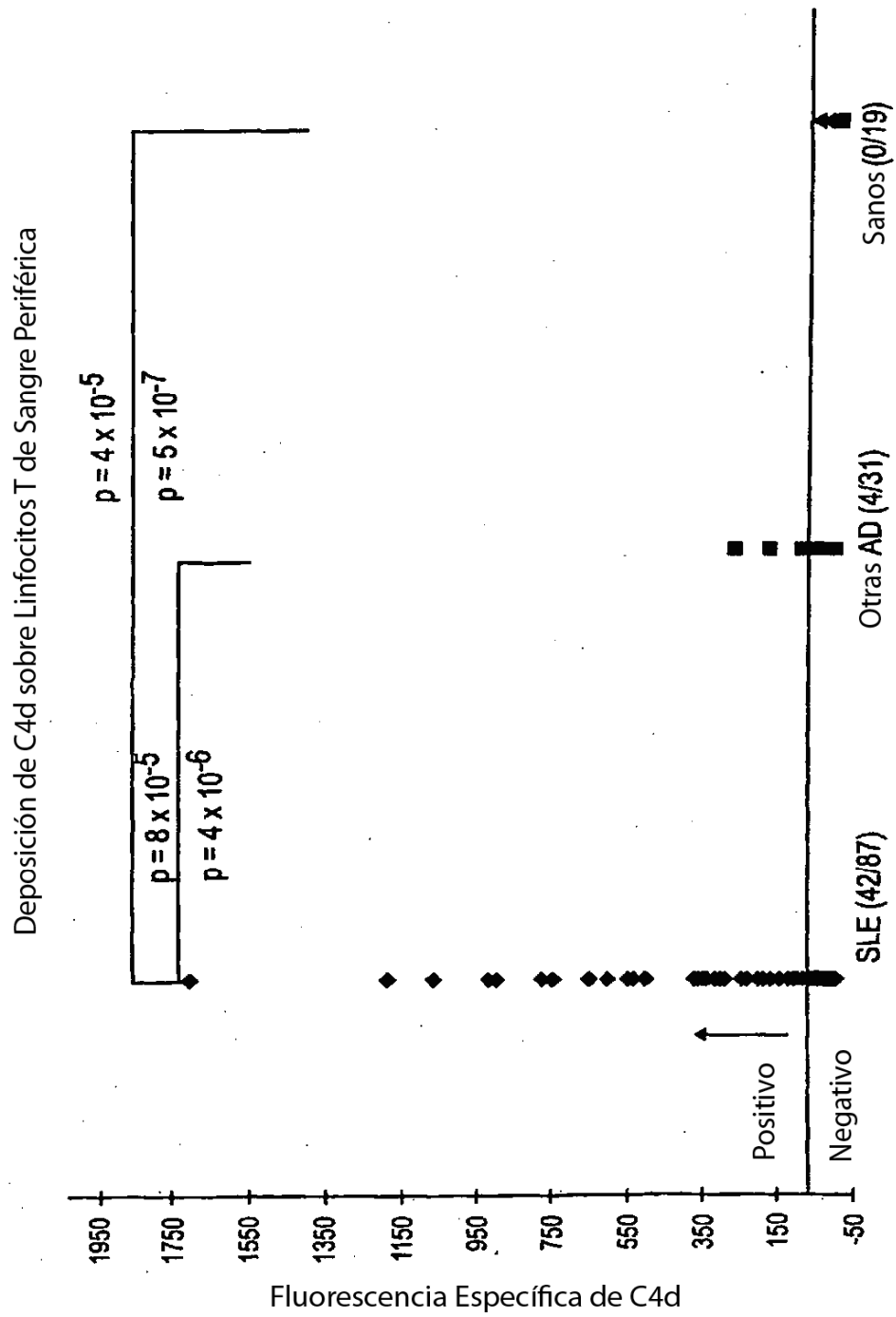
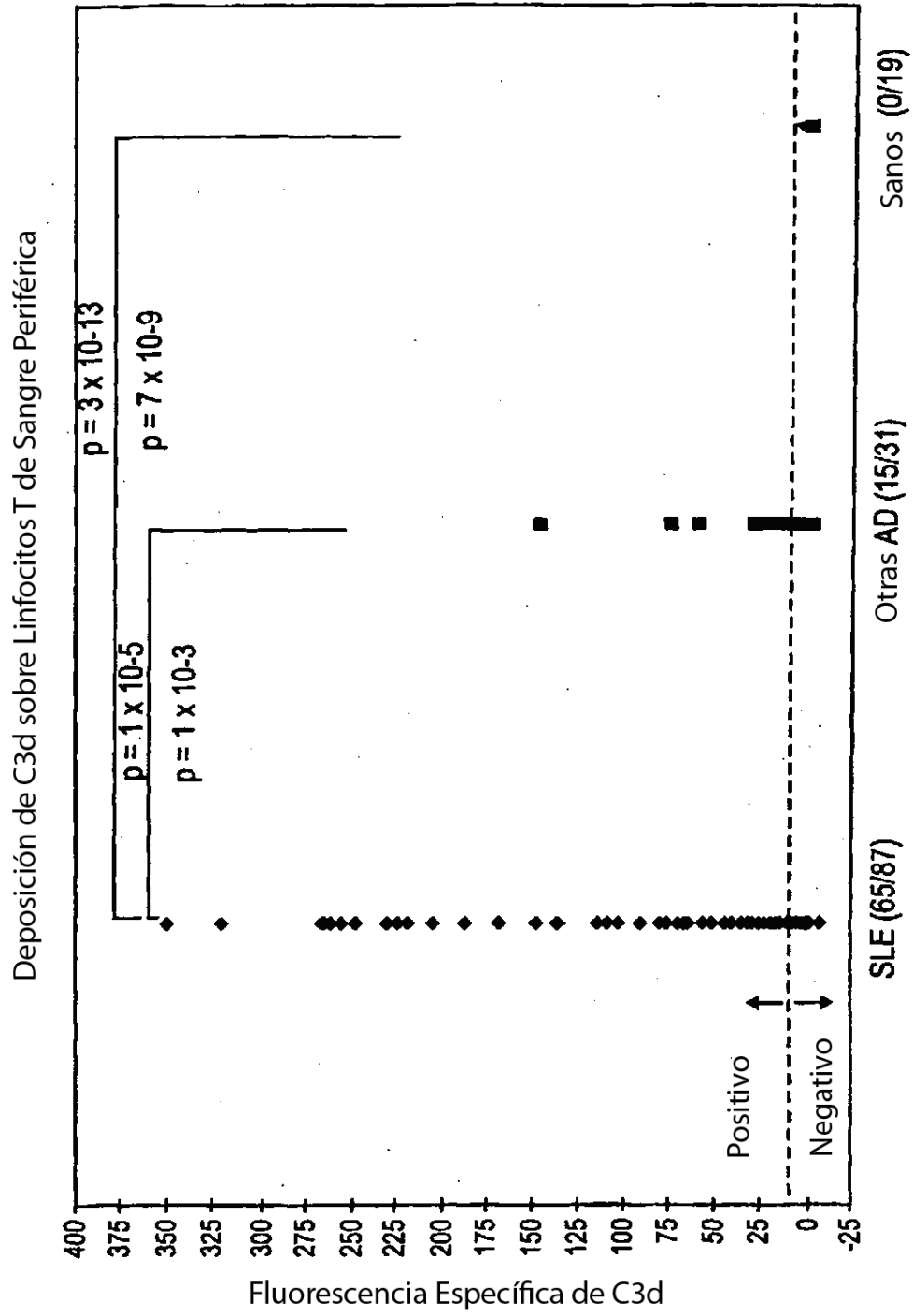


FIG. 1

**FIG. 2**

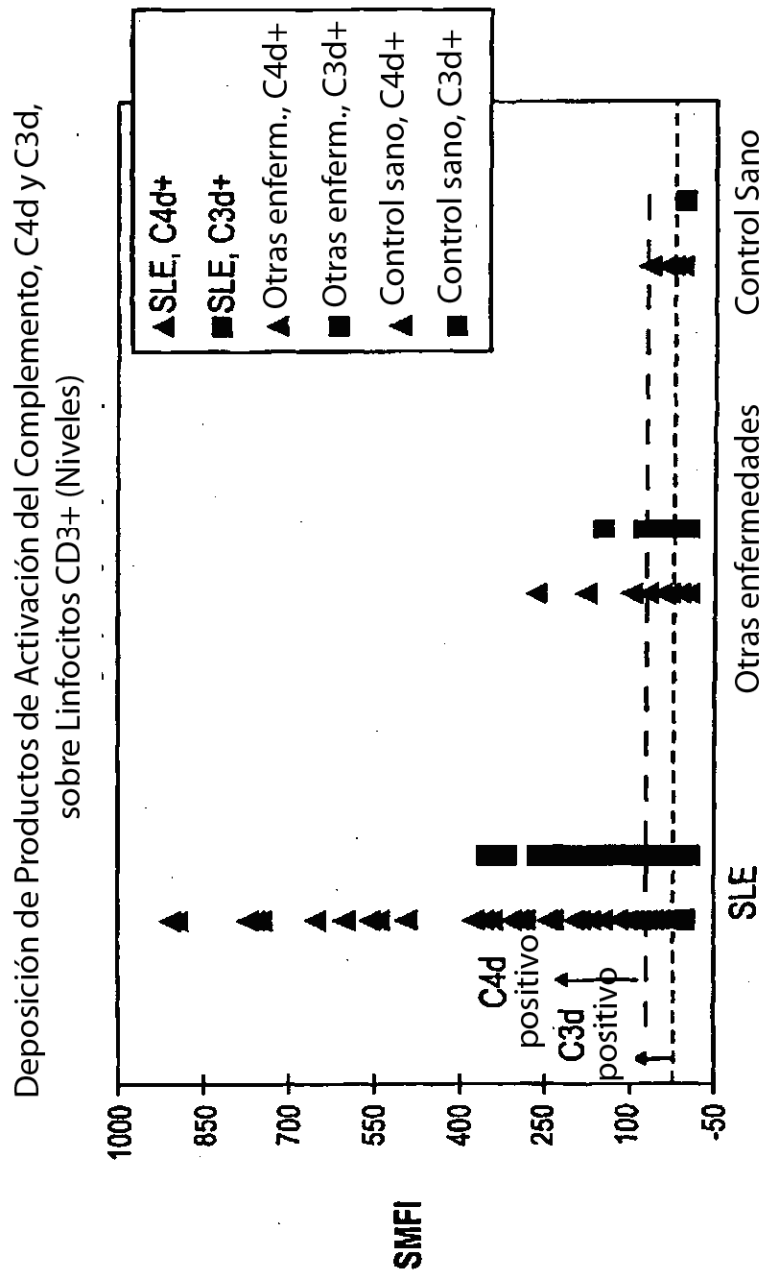


FIG. 3

	Célula T ^a -C4d Media +/- SD (intervalo)	valor p	Célula B ^b -C4d Media +/- SD (intervalo)	valor p	Monocito ^c -C4d Media +/- SD (intervalo)	valor p
SLE (n=125)	13,89 +/- 26,50 (0 - 154,0)		62,55 +/- 98,12 (0 - 66,30)		11,1 +/- 13,08 (0,58 - 60,31)	
Otras enferm. ^d (n=45)	1,44 +/- 1,53 (0 - 7,62)	<0,0001 ^e	11,27 +/- 9,98 (0 - 44,15)	<0,0001 ^e	3,83 +/- 2,81 (0 - 13,59)	<0,0001 ^e
Controles sanos (n=20)	1,40 +/- 0,91 (0,06 - 4,12)	<0,0001 ^f	7,67 +/- 5,10 (2,39 - 25,32)	<0,0001 ^f	3,86 +/- 2,40 (1,26 - 10,75)	<0,0001 ^f

FIG. 4

	Célula T-C4d Media +/- SD (intervalo)	valor p	Célula B-C4d Media +/- SD (intervalo)	valor p	Monocito-C4d Media +/- SD (intervalo)	valor p
SLE (n=125)	3,26 +/- 5,87 (0 - 52,70)		18,16 +/- 12,37 (0 - 70,27)		2,88 +/- 2,69 (0 - 27,33)	
Otras enferm. d (n=45)	0,94 +/- 1,07 (0 - 5,71)	<0,00003e	13,47 +/- 12,01 (0 - 56,38)	0,36e	1,96 +/- 1,34 (0 - 6,03)	<0,004e
Controles sanos (n=20)	0,78 +/- 0,45 (0 - 1,67)	<0,0001f	7,22 +/- 2,90 (3,91 - 15,35)	<0,0001f	2,4 +/- 1,39 (0,17 - 6,13)	<0,038f

FIG. 5

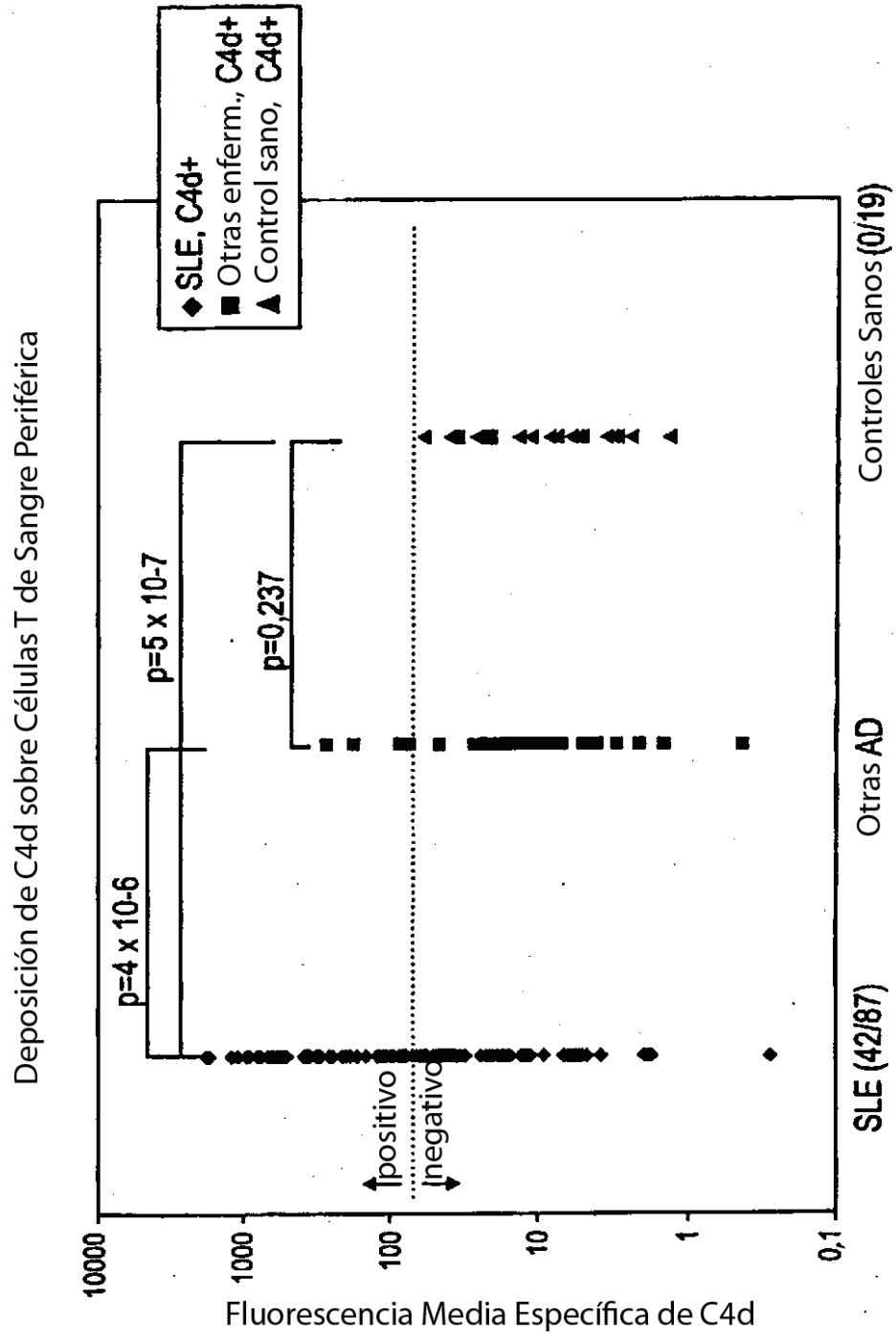


FIG. 6

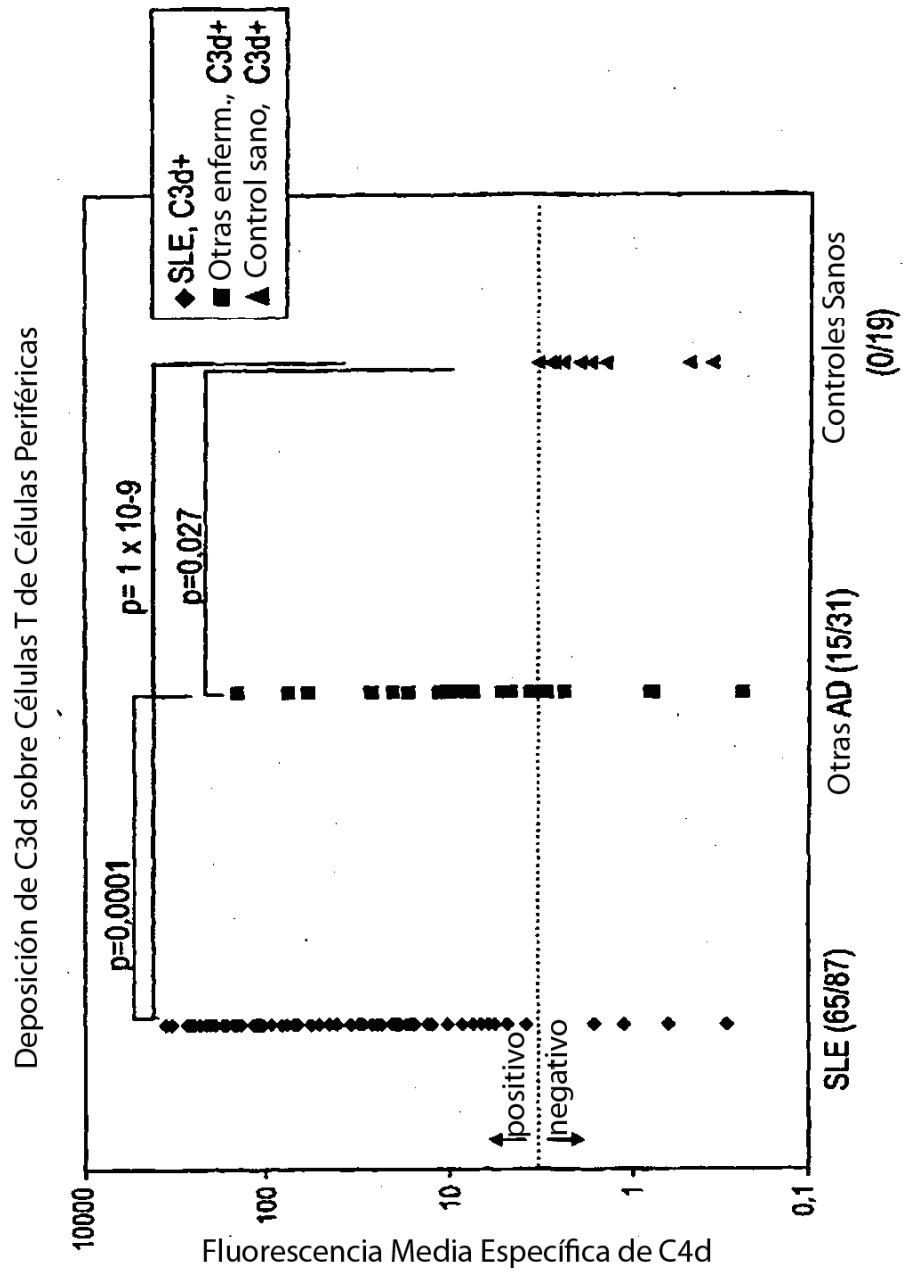


FIG. 7