

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 935**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/564** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09004778 .8**  
96 Fecha de presentación: **26.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2073008**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.06.2009**

54 Título: **Métodos de inmunoensayo mejorados**

30 Prioridad:  
**27.05.2005 GB 0510943**  
**27.05.2005 US 685422 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.07.2012**

73 Titular/es:  
**ONCIMMUNE LIMITED**  
**Clinical Sciences Building City Hospital Hucknall**  
**Road**  
**Nottingham NG5 1PB, GB**

72 Inventor/es:  
**Robertson, John Forsyth Russell;**  
**Barnes, Tony;**  
**Murray, Andrea y**  
**Chapman, Caroline**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 384 935 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

Métodos de inmunoensayo mejorados

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general al campo de los ensayos de diagnóstico o pronóstico y, en particular, se refiere a la optimización de ensayos para la detección de anticuerpos en una muestra que comprende fluido corporal de paciente, en los que dichos anticuerpos se usan como marcadores biológicos de una susceptibilidad a patología o enfermedad.

**Antecedentes de la invención**

Muchos ensayos de diagnóstico, pronóstico y/o control dependen de la detección de un marcador biológico de una susceptibilidad a patología o enfermedad particular. Dichos marcadores biológicos son comúnmente proteínas o polipéptidos que son característicos de una enfermedad particular o están asociados con la susceptibilidad a enfermedad.

En los últimos años se ha hecho evidente que los anticuerpos, y en particular los autoanticuerpos, también pueden servir como marcadores biológicos de enfermedad o susceptibilidad a enfermedad. Los autoanticuerpos son anticuerpos de origen natural dirigidos contra un antígeno que el sistema inmune de un individuo reconoce como extraño aun cuando ese antígeno se originó en realidad en el individuo. Pueden estar presentes en la circulación como autoanticuerpos libres circulantes o en forma de inmunocomplejos circulantes que consisten en autoanticuerpos unidos a su proteína marcadora diana. Las diferencias entre una proteína de tipo silvestre expresada por células "normales" y una forma alterada de la proteína producida por una célula enferma o durante un proceso patológico pueden conducir, en algunos casos, a que la proteína alterada se reconozca por el sistema inmune de un individuo como "no propia" y de este modo genere una respuesta inmune en ese individuo. Ésta puede ser una respuesta inmune humoral (es decir, mediada por células B) que conduzca a la producción de autoanticuerpos inmunológicamente específicos para la proteína alterada.

El documento WO 99/58978 describe métodos para su uso en la detección/diagnóstico del cáncer que están basados en la evaluación de la respuesta inmune de un individuo contra dos o más marcadores tumorales diferentes. Estos métodos implican generalmente poner en contacto una muestra de fluido corporal tomada del individuo con un panel de dos o más antígenos marcadores tumorales diferentes, cada uno derivado de una proteína marcadora tumoral separada, y detectar la formación de complejos de los antígenos marcadores tumorales unidos a autoanticuerpos circulantes inmunológicamente específicos para las proteínas marcadoras tumorales. La presencia de dichos autoanticuerpos circulantes se toma como un indicio de la presencia de cáncer.

Rasmussen et al., (Journal of immunological methods, vol. 127, nº 1 páginas 139 a 145, 1990) describe un ELISA dirigido contra una única concentración de un antígeno autólogo. Más específicamente, se refiere a un ELISA para la detección de anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos.

Los ensayos que miden la respuesta inmune del individuo respecto a la presencia de proteína marcadora tumoral en términos de la producción de autoanticuerpos proporcionan una alternativa a la medición o detección directa de proteína marcadora tumoral en fluidos corporales. Dichos ensayos constituyen esencialmente una detección indirecta de la presencia de proteína marcadora tumoral. Debido a la naturaleza de la respuesta inmune, es probable que puedan generarse autoanticuerpos por una cantidad muy pequeña de proteína marcadora tumoral circulante y, por consiguiente, los métodos indirectos que dependen de la detección de la respuesta inmune contra marcadores tumorales serán más sensibles que los métodos para la medición directa de marcadores tumorales en fluidos corporales. Por lo tanto, los métodos de ensayo basados en la detección de autoanticuerpos pueden ser de un valor particular pronto en el proceso patológico, y posiblemente también en relación con la exploración de pacientes asintomáticos, por ejemplo en la exploración para identificar individuos "en riesgo" de desarrollar una enfermedad entre una población de individuos asintomáticos, para identificar individuos que han desarrollado una enfermedad entre una población de individuos asintomáticos. Además, el método basado en la detección de autoanticuerpos puede ser de un valor particular pronto en el proceso patológico, y posiblemente también puede usarse para identificar individuos que han desarrollado una enfermedad entre una población de individuos sintomáticos. Además, pueden ser útiles para la detección temprana de una enfermedad recurrente. Los métodos de ensayo también pueden ser de valor en terapias de selección o control para una enfermedad.

Los anticuerpos y autoanticuerpos también pueden servir como marcadores biológicos de otras patologías o susceptibilidades a enfermedad, de las cuales no son sino ejemplos la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), cirrosis biliar primaria (PBC), tiroiditis autoinmune (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto), gastritis autoinmune (por ejemplo, anemia perniciosa), adrenalitis autoinmune (por ejemplo, enfermedad de Addison), hipoparatiroidismo autoinmune, diabetes autoinmune (por ejemplo, diabetes Tipo 1), miastenia grave.

Los presentes inventores han reconocido que cuando se usan de modo diagnóstico o pronóstico ensayos basados en la detección de anticuerpos para evaluar la patología, la progresión de la enfermedad o la susceptibilidad a enfermedad de un individuo dentro de una población, pueden surgir dificultades para concebir una metodología de ensayo normalizada apropiada para toda la población de sujetos a explorar, ya que las cantidades absolutas de anticuerpo presente varían radicalmente de un individuo a otro. Esto puede producir una alta incidencia de resultados falsos negativos, por ejemplo entre individuos que tengan una baja cantidad de anticuerpo. De forma similar, existe la dificultad de puntuar resultados positivos verdaderos, ya que la variación en las cantidades absolutas de anticuerpo de un individuo a otro significa que es difícil establecer un umbral para un resultado de ensayo positivo que sea apropiado para todos los individuos dentro de la población explorada.

Los presentes inventores han determinado ahora que el rendimiento y, más específicamente, la utilidad y fiabilidad clínica de ensayos basados en la detección de anticuerpos, particularmente autoanticuerpos, como marcadores biológicos de enfermedad pueden mejorarse espectacularmente por inclusión de una etapa de titulación de antígeno. Por ensayo de la muestra sospechosa de contener anticuerpos contra una serie de cantidades diferentes de antígeno y construcción de una curva de titulación es posible identificar de forma fiable resultados de exploración positivos verdaderos, independientemente de la cantidad absoluta de anticuerpo presente en la muestra. Una estrategia de este tipo es contraria a métodos de la técnica anterior que titulan antígeno simplemente para construir una curva de calibración para permitir la identificación de la concentración de antígeno más apropiada para usar para detectar anticuerpos en muestras de pacientes reales. En estos métodos sólo se propone una medición de un único punto para el diagnóstico real. Por lo tanto, estos métodos no permitirán variaciones en las cantidades del anticuerpo a detectar de un individuo a otro, dando como resultado la incidencia de falsos positivos y falsos negativos que se analiza. Los presentes inventores han descubierto que el método de titulación de antígeno de la invención analizado en la presente memoria tiene mayor especificidad y sensibilidad que medir la reactividad de autoanticuerpos a una única concentración de antígeno, o métodos en los que se titula la muestra de suero más que el antígeno.

### Sumario de la invención

La invención proporciona un método de detección de un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en el que dicho anticuerpo está dirigido contra una sustancia extraña introducida en dicho sujeto mamífero, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,
- (b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno a cada concentración de antígeno diferente usada, y
- (c) representar o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno usada en la etapa (a), en el que la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el ensayo está indicada por una curva generalmente sigmoidea o en forma de S.

En todos los aspectos de la invención el sujeto mamífero es preferentemente un ser humano.

En todos los aspectos de la invención, el método se lleva a cabo preferentemente *in vitro* en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal obtenido o preparado a partir del sujeto mamífero.

Una característica particular de la invención en todos sus aspectos es que el criterio para determinar si el anticuerpo pertinente está o no está presente en la muestra de ensayo se basa en la cantidad de unión específica observada a cada concentración de antígeno diferente ensayada, en otras palabras, los valores colectivos, más que en sólo una lectura a una única concentración. Por lo tanto, la determinación de la presencia o ausencia de susceptibilidad a patología o enfermedad, o de anticuerpos contra una sustancia extraña en una muestra de paciente puede deducirse basándose directamente en estos valores colectivos.

Preferentemente, el juicio se realiza basándose en la proyección de una curva generalmente sigmoidea o en forma de S cuando se representa la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno. Como será evidente a partir de los Ejemplos en la presente memoria, los inventores han observado que los métodos de titulación de antígeno de la invención tienen mayor especificidad y sensibilidad que los métodos de diagnóstico o detección basados en una única lectura, y reducen la incidencia de la determinación de falsos positivos y falsos negativos.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Medición de autoanticuerpos en suero usando una curva de titulación de antígeno. El suero de un paciente con cáncer 17766(C) se une fuertemente al antígeno de ensayo con una curva sigmoidea característica (—◆—), pero no se une al control negativo, VOL (—■—). En comparación, el suero de un individuo

normal, 18052(N) no se une al antígeno de ensayo (-Δ-) o al control negativo (—◄—).

5      Figura 2: Comparación de los niveles de autoanticuerpo p53 en individuos normales y pacientes con cáncer de mama primario (PBC) según se miden usando el ensayo de titulación de antígeno. Los niveles de autoanticuerpo se expresan como la  $DO_{650}$  debida a la unión al antígeno de ensayo (p53) menos la debida a la unión al control negativo. El punto de corte normal (-----) se calculó como la media más 2 desviaciones típicas de la población normal.

10     La Figura 3 muestra una comparación de los niveles de autoanticuerpos de p53 y NY-ESO en individuos normales y pacientes con cáncer pulmonar, según se miden usando el ensayo de titulación de antígeno. Los niveles de autoanticuerpos se expresan como la  $DO_{650}$  debida a la unión al antígeno de ensayo (p53 o NY-ESO) menos la debida a la unión al control negativo. Los puntos de corte normales (-----) se calcularon como la media más 2 desviaciones típicas de la población normal.

15     La Figura 4 muestra una curva de titulación para la detección de autoanticuerpos contra p53 y NY-ESO en una muestra de líquido ascítico tomada de un paciente con cáncer de mama. Este paciente se ensayó pero se descubrió que no producía autoanticuerpos contra c-myc.

20     La Figura 5 muestra una curva de titulación para la detección de autoanticuerpos contra BRCA1, BRCA2 y HER2 en una muestra de suero de un paciente con cáncer de mama (carcinoma ductal *in situ*).

25     La Figura 6 muestra una curva de titulación para la detección de autoanticuerpos contra NY-ESO en una muestra de suero de un paciente con cáncer pulmonar. Este paciente se ensayó pero se descubrió que no producía autoanticuerpos contra p53 o c-myc.

30     La Figura 7 muestra una curva de titulación para la detección de autoanticuerpos contra NY-ESO y p53 en una muestra de suero de un paciente con cáncer pulmonar. Este paciente se ensayó pero se descubrió que no producía autoanticuerpos contra c-myc.

35     Las Figuras 8(a) y 8(b) ilustran los resultados en dos ensayos de titulación independientes para autoanticuerpos contra p53, c-myc y NY-ESO-1 en muestras de suero de un sujeto "normal" (es decir, un individuo sin pruebas de cáncer).

40     Las Figuras 9(a) y 9(b) muestran los resultados de dos ensayos de titulación independientes llevados a cabo en muestras de suero de un solo paciente con cáncer de mama invasivo usando una variedad de antígenos diferentes.

45     Las Figuras 10(a) y 10(b) ilustran los resultados de ensayos de titulación en los que se ensayaron muestras de suero de un sujeto humano clínicamente normal para determinar la presencia de autoanticuerpos usando antígenos biotinilados BRCA2, HER2, c-myc y NY-ESO-1, BRCA1 no biotinilado y productos de expresión de control del vector "vacío" VOL, que codifica la etiqueta de biotina pero ningún antígeno adicional.

50     La Figura 11 ilustra los resultados de análisis de autoanticuerpos de un paciente con cáncer de mama primario usando el ensayo de titulación de antígeno de la invención con respecto a los antígenos p53, c-myc y NY-ESO-1 y los productos de expresión de control del vector "vacío" VOL.

55     La Figura 12 ilustra los resultados de una repetición del ensayo mostrado en la Figura 11 pero con suero de un individuo normal.

60     La Figura 13 ilustra resultados adicionales obtenidos usando el ensayo de titulación de antígeno de la invención en un paciente con cáncer de mama primario pero que también muestra una respuesta de anticuerpos contra biotina.

65     La Figura 14 ilustra los resultados de la comparación experimental en muestras normales entre un ensayo de detección de autoanticuerpos cuando se titula el antígeno de acuerdo con la invención y un ensayo de detección de autoanticuerpos en el que la cantidad de antígeno permanece constante pero se titula el suero.

70     La Figura 15 ilustra los resultados de una comparación experimental en una muestra de un paciente con cáncer de mama primario entre un ensayo de detección de autoanticuerpos cuando se titula el antígeno de acuerdo con la invención y un ensayo de detección de autoanticuerpos cuando la cantidad de antígeno permanece constante pero se titula el suero.

**Descripción detallada de la invención**

75     La invención en general proporciona un método de inmunoensayo para detectar un anticuerpo que sirva como marcador biológico para una susceptibilidad a patología o enfermedad, caracterizado por que una muestra a ensayar

para determinar la presencia del anticuerpo se ensaya para determinar la unión específica frente a diferentes cantidades de antígeno específico por el anticuerpo, y una curva de titulación producida por la unión de antígeno/anticuerpo frente a la cantidad de antígeno ensayada.

5 Las características generales de los inmunoensayos, por ejemplo ELISA, radioinmunoensayos y similares, son bien conocidas por los expertos en la materia (véase Immunoassay, E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996). Los inmunoensayos para la detección de anticuerpos que tienen una especificidad inmunológica particular requieren en general el uso de un reactivo (antígeno) que presente una reactividad inmunológica específica con el anticuerpo bajo ensayo. Dependiendo del formato de ensayo, este antígeno puede  
10 inmovilizarse en un soporte sólido. Una muestra a ensayar para determinar la presencia del anticuerpo se pone en contacto con el antígeno y, si están presentes anticuerpos de la especificidad inmunológica necesaria en la muestra, reaccionarán inmunológicamente con el antígeno para formar complejos de antígeno/anticuerpo que después pueden detectarse o medirse cuantitativamente.

15 El método de la invención se caracteriza por que una muestra normalizada a ensayar para determinar la presencia del anticuerpo se ensaya frente a una pluralidad de cantidades diferentes de antígeno (también denominada en la presente memoria serie de titulación). La muestra se ensaya frente a al menos dos, y preferentemente al menos tres, cuatro, cinco, seis o siete cantidades diferentes del antígeno. Los ensayos típicos también pueden incluir un control negativo que no contiene ningún antígeno.

20 En este contexto, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que comprende al menos un determinante antigénico o epítipo capaz de interactuar específicamente con el anticuerpo diana que se desea detectar, o cualquier agente de captura que interactúa específicamente con la región variable o regiones determinantes de complementariedad de dicho anticuerpo. El antígeno será típicamente una macromolécula biológica de origen  
25 natural o sintético tal como, por ejemplo, una proteína o péptido, un polisacárido o un ácido nucleico, y puede incluir anticuerpos o fragmentos de los mismos tales como anticuerpos anti-idiotipo.

Los lectores expertos apreciarán que, en el método de la invención, la cantidad de determinantes antigénicos o epítipos disponibles para la unión al anticuerpo diana es importante para establecer una serie de titulación. En  
30 muchos formatos de ensayo, la cantidad de determinantes antigénicos o epítipos disponible para la unión se correlaciona directamente con la cantidad de moléculas de antígeno presentes. Sin embargo, en otras realizaciones, tales como ciertos sistemas de ensayo en fase sólida, la cantidad de determinantes antigénicos o epítipos expuestos puede no correlacionarse directamente con la cantidad de antígeno, sino que puede depender de otros factores, tales como la unión a la superficie sólida. En estas realizaciones, las referencias en la presente memoria a  
35 "diferentes cantidades de antígeno" en una serie de titulación puede considerarse que se refieren a diferentes cantidades del determinante antigénico o epítipo.

La cantidad relativa o absoluta de unión específica entre anticuerpo y antígeno se determina para cada cantidad diferente de antígeno (determinante antigénico o epítipo) usada y se usa para representar o calcular una curva de la  
40 cantidad (relativa o absoluta) de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno ensayada. Se ilustran resultados típicos, a modo de ejemplo solamente, en las Figuras adjuntas para la detección de varios anticuerpos diferentes. La presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el ensayo se determina basándose en la cantidad de unión específica observada a cada cantidad de antígeno y generalmente está indicada por una curva generalmente sigmoidea o en forma de S. Las cantidades absolutas de  
45 unión específica entre anticuerpo y antígeno generalmente no son materiales, a menos que se desee producir una medición cuantitativa. Para una determinación simple de tipo sí/no de la presencia o ausencia de anticuerpos es suficiente que se produzca solamente una curva de la forma correcta. Si no hay variación en la unión detectable a lo largo de las diferentes cantidades de antígeno ensayadas, entonces esto puede puntuarse como una ausencia de una cantidad detectable del anticuerpo. En realizaciones preferidas de la invención, el método no es cuantitativo. Por  
50 lo tanto, puede proporcionar una determinación de tipo sí/no de la presencia o ausencia de anticuerpo usando una relación proporcional sin dimensiones que sea independiente de las intensidades de señal.

Puede obtenerse una medida de la cantidad de anticuerpo presente en una muestra particular, si se desea, a partir de los resultados de ensayos de titulación de antígeno.  
55

El método de la invención es ventajoso para su uso en ensayos clínicos de diagnóstico, pronóstico, predictivos y/o de control, en los que las cantidades absolutas de anticuerpo diana presentes pueden variar enormemente de un paciente a otro. Los inventores han observado que si dichos ensayos están basados en la detección de unión de anticuerpo usando una sola cantidad/concentración de antígeno de ensayo, pueden pasarse por alto muestras de  
60 pacientes que contengan una cantidad de anticuerpo que esté en el extremo más bajo o más alto del intervalo fisiológico normal de la cantidad de anticuerpo en la población debido a limitaciones de la metodología de ensayo; las muestras con una baja cantidad de anticuerpo pueden puntuarse como resultados falsos negativos, mientras que aquellas con niveles muy elevados de anticuerpo pueden estar fuera de la escala para una detección con precisión dentro de la metodología de ensayo seleccionada.  
65

- El método de ensayo de titulación de la invención también es particularmente adecuado para la detección de anticuerpos/autoanticuerpos como marcadores biológicos de patología o susceptibilidad cuando existe una variación de un paciente a otro considerable en la especificidad y afinidad de los anticuerpos/autoanticuerpos por el antígeno diana. Las respuestas de autoanticuerpos por su propia naturaleza pueden variar significativamente de un paciente a otro, produciéndose la variación tanto en las cantidades absolutas de autoanticuerpo presente como en la especificidad/afinidad de los autoanticuerpos. El método de la invención puede tener en cuenta esta variación de un paciente a otro, permitiendo de este modo que se desarrolle un formato de ensayo convencional para cualquier anticuerpo/autoanticuerpo dado.
- Las interacciones entre los autoanticuerpos y sus antígenos diana son generalmente de baja afinidad, pero la fuerza de unión puede variar de un paciente a otro, como se ha resumido anteriormente. El método de la invención está particularmente adaptado para la detección de una unión de baja afinidad, ya que puede inferirse un resultado positivo a partir de la forma de la curva de titulación.
- El método de la invención también proporciona una defensa frente a variaciones de un día a otro en el rendimiento de los inmunoensayos usados para la detección de autoanticuerpos/anticuerpos con fines de diagnóstico, pronóstico y/o control (patología o terapia). Con frecuencia se observa que puede existir una variación considerable de un día a otro en la intensidad de la señal cuando se llevan a cabo inmunoensayos para la detección de anticuerpos en muestras que comprenden fluidos corporales de pacientes. Dicha variación puede surgir, por ejemplo, debido a diferencias en la forma en que se obtienen y se almacenan las muestras antes del ensayo. Dichos factores hacen difícil puntuar los resultados de ensayos clínicos con seguridad, por ejemplo, basándose en un simple valor umbral de la unión de antígeno/anticuerpo. La presente invención minimiza los efectos de dicha variación de un día a otro puesto que un resultado positivo para la presencia de anticuerpo es claramente evidente a partir de la forma de la curva de titulación, independientemente de la intensidad de la señal.
- Son todavía ventajas adicionales del método de la invención el que permita la dilución de la muestra de paciente, y aun así produce resultados coherentes, y también que generalmente producirá el mismo resultado de exploración cualitativo (positivo/negativo) usando fluidos corporales de diferentes fuentes en un individuo (por ejemplo, sangre o suero frente a líquido ascítico o efusión pleural), aun cuando la concentración absoluta de anticuerpos pueda ser diferente en los diferentes fluidos.
- El método de la invención puede llevarse a cabo en cualquier formato adecuado que permita el contacto entre una muestra sospechosa de contener el anticuerpo y múltiples cantidades diferentes de un antígeno. Convenientemente, el contacto entre la muestra y las diferentes cantidades del antígeno puede tener lugar en cámaras de reacción separadas pero paralelas tales como los pocillos de una placa de microtitulación. Pueden revestirse cantidades variables del antígeno sobre los pocillos de la placa de microtitulación por preparación de diluciones en serie de una reserva de antígeno a lo largo de los pocillos de la placa de microtitulación. La reserva de antígeno puede ser de concentración conocida o desconocida. Después pueden añadirse a los pocillos de la placa alícuotas de la muestra de ensayo, manteniéndose el volumen y la dilución de la muestra de ensayo constantes en cada pocillo. Las cantidades absolutas de antígeno añadido a los pocillos de la placa de microtitulación pueden variar dependiendo de factores tales como la naturaleza del anticuerpo diana, la naturaleza de la muestra bajo ensayo, la dilución de la muestra de ensayo, etc., como se apreciará por los expertos en la materia. Generalmente, las cantidades de antígeno y la dilución de la muestra de ensayo se seleccionarán para producir un intervalo de intensidad de señal que se incluya dentro del intervalo de detección aceptable de la lectura seleccionada para la detección de la unión de antígeno/anticuerpo en el método. Se proporcionan en los ejemplos adjuntos cantidades y diluciones típicas para el ensayo de muestras de suero humano sospechosas de contener autoanticuerpos anti-marcadores tumorales. Convenientemente, las cantidades de antígeno ensayadas pueden variar en el intervalo de 0,01 µg/ml a 10 µg/ml.
- Como se ha mencionado anteriormente, también es posible construir una curva de titulación partiendo de una sola reserva de antígeno aun cuando se desconoce la concentración absoluta de antígeno en la reserva. Con tal de que se use una misma solución madre única y se diluya en serie de la misma forma, es posible comparar los resultados de ensayos de titulación separados para este procesamiento de antígeno en diferentes muestras de ensayo de partida.
- En una realización adicional pueden inmovilizarse diferentes cantidades del antígeno (determinantes antigénicos o epítomos) en localizaciones o sitios de reacción separados en un soporte sólido. Todo el soporte puede ponerse después en contacto con la muestra de ensayo y la unión de anticuerpo a antígeno detectarse o medirse por separado en cada una de las localizaciones o sitios de reacción separados. El soporte sólido adecuado también incluye micromatrices, por ejemplo matrices en las que sitios o puntos separados en la matriz comprenden diferentes cantidades del antígeno. Pueden prepararse micromatrices por inmovilización de diferentes cantidades de un antígeno particular en sitios de reacción resolubles separados en la matriz. En otras realizaciones, la cantidad real de moléculas de antígeno inmovilizadas puede mantenerse sustancialmente constante, pero variarse el tamaño de los sitios o puntos en la matriz para alterar la cantidad de epítomo de unión disponible, proporcionando una serie de titulación de sitios o puntos con diferentes cantidades de epítomo de unión disponible. En dichas realizaciones, la concentración superficial bidimensional del epítomo o epítomos de unión en el antígeno es importante para preparar la serie de titulación, más que la cantidad absoluta de antígeno. Se conocen en general en la técnica procedimientos

para la preparación e interrogación de micromatrices de proteína/péptido.

Se entenderá a partir de la discusión anterior que en todas las realizaciones de la invención pueden conseguirse variaciones en la cantidad de antígeno cambiando la densidad de antígeno o epítipo frente a la que se ensaya la muestra, o manteniendo la densidad de antígeno o epítipo pero aumentando el área superficial sobre la que se inmoviliza antígeno, o ambas.

Pueden usarse micromatrices para realizar múltiples ensayos para anticuerpos de diferente especificidad en una sola muestra en paralelo. Esto puede realizarse usando matrices que comprenden múltiples conjuntos de diferentes antígenos, comprendiendo cada conjunto un antígeno particular en cantidades o concentraciones múltiples diferentes. La expresión "antígenos diferentes" incluye antígenos derivados de diferentes proteínas o polipéptidos (tales como antígenos derivados de proteínas no relacionadas codificadas por diferentes genes) y también antígenos que proceden de diferentes epítipos peptídicos de una sola proteína o polipéptido. Una micromatriz dada puede incluir exclusivamente conjuntos de antígenos diferentes derivados de proteínas o polipéptidos diferentes, o exclusivamente conjuntos de diferentes antígenos derivados de epítipos peptídicos diferentes de una sola proteína o polipéptido, o una mezcla de los dos en cualquier proporción. Debería señalarse que cada conjunto de diferentes cantidades o concentraciones de antígeno individual en cualquier realización de la invención comprenderá generalmente un solo antígeno y no mezclas de los mismos.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "fluido corporal", cuando se refiere al material a ensayar para determinar la presencia de anticuerpos usando el método de la invención, incluye, entre otros plasma, suero, sangre completa, orina, sudor, linfa, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico; efusión pleural, líquido seminal, esputo, aspirado de pezón, seroma posoperatorio o líquido de drenaje de heridas. Como se ha mencionado anteriormente, los métodos de la invención se llevan a cabo preferentemente *in vitro* en una muestra de ensayo que comprende fluido corporal extraído del sujeto de ensayo. El tipo de fluido corporal usado puede variar dependiendo de la identidad del anticuerpo a ensayar y de la situación clínica en que se use el ensayo. En general, se prefiere realizar los ensayos en muestras de suero o plasma. La muestra de ensayo puede incluir componentes adicionales además del fluido corporal, tales como por ejemplo diluyentes, conservantes, agentes estabilizantes, tampones, etc.

El término "antígeno" se usa en la presente memoria en un sentido amplio para referirse a cualquier sustancia que presente una reactividad inmunológica específica con un anticuerpo diana a detectar. Los antígenos adecuados pueden incluir, pero sin limitación, proteínas de origen natural, proteínas o polipéptidos recombinantes o sintéticos, péptidos sintéticos, peptidomiméticos, etc., también polisacáridos y ácidos nucleicos. En concreto, cuando en la presente memoria se usa el término "antígeno" se pretende incluir cualquier agente de captura, ya sea de origen humano, de origen de mamífero o de otro modo, capaz de una interacción inmunológica específica con las regiones variables o determinantes de complementariedad del anticuerpo a detectar. Por ejemplo, los anticuerpos anti-idiotípicos pueden considerarse un antígeno para este fin, así como los antígenos generados por presentación en fago.

Ciertos antígenos pueden comprender o proceder de proteínas o polipéptidos aislados de fuentes naturales, incluyendo, pero sin limitación, proteínas o polipéptidos aislados de tejidos o fluidos corporales de pacientes. En dichas realizaciones, el antígeno puede comprender sustancialmente toda la proteína de origen natural; es decir, una proteína sustancialmente en la forma en que se aísla de la fuente natural, o puede comprender un fragmento de la proteína de origen natural. Para ser eficaz como antígeno en el método de la invención cualquier "fragmento" de este tipo debe conservar la reactividad inmunológica con los anticuerpos para el ensayo de los cuales se usará. Podrían prepararse fragmentos adecuados, por ejemplo, por escisión química o enzimática de la proteína aislada.

Dependiendo de la naturaleza exacta del ensayo en que se usará, el antígeno puede comprender una proteína de origen natural, o fragmento de la misma, unida a una o más moléculas adicionales que confieran alguna característica deseable no presente de forma natural en la proteína. Por ejemplo, la proteína o fragmento puede conjugarse con un marcador de revelado, tal como por ejemplo un marcador fluorescente, marcador coloreado, marcador luminiscente, radiomarcador o metal pesado, tal como oro coloidal. En otras realizaciones, la proteína o fragmento puede expresarse como una proteína de fusión. A modo de ejemplo, las proteínas de fusión pueden incluir un péptido etiqueta en el extremo N- o C-terminal para contribuir a la purificación del antígeno expresado de forma recombinante.

Dependiendo del formato del ensayo en el que se va a usar, el antígeno puede inmovilizarse en un soporte sólido tal como, por ejemplo, los pocillos de una placa de microtitulación, perlas de micromatriz o microplacas o perlas magnéticas. La inmovilización puede efectuarse mediante adsorción no covalente o unión covalente.

Puede usarse cualquier medio de unión adecuado con tal de que éste no afecte desfavorablemente a la capacidad del antígeno para reaccionar inmunológicamente con el anticuerpo diana en un grado significativo.

La invención no está limitada a ensayos en fase sólida, sino que también incluye ensayos que, en su totalidad o en parte, se llevan a cabo en fase líquida, por ejemplo, ensayos de perlas en fase de solución.

En una realización, los antígenos pueden marcarse con un ligando que facilitaría la inmovilización, tal como biotina. Después, el antígeno puede diluirse hasta un intervalo de titulación adecuado y después permitirse que reaccione con autoanticuerpos en muestras de pacientes en solución. Los inmunocomplejos resultantes pueden inmovilizarse después sobre un soporte sólido mediante una interacción de ligando-receptor (por ejemplo, biotina-estreptavidina) y el resto del ensayo realizarse como se describe a continuación.

Para facilitar la producción de antígenos biotinilados para su uso en los métodos de ensayo de la invención, ADNc que codifican un antígeno de longitud completa, una versión truncada del mismo o un fragmento antigénico del mismo pueden expresarse como una proteína de fusión marcada con una etiqueta proteica o polipeptídica a la que puede unirse el cofactor biotina mediante una reacción enzimática. Están disponibles en el mercado de varias fuentes vectores para la producción de antígenos biotinilados recombinantes.

Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, una ventaja adicional del uso de la estrategia de curva de titulación con antígenos biotinilados es que el ensayo es capaz de distinguir entre la unión del componente de biotina a anticuerpos anti-biotina y la verdadera unión del antígeno a su anticuerpo afín. Los inventores han observado que un número significativo de población humana produce anticuerpos anti-biotina que podrían conducir a la producción de resultados falsos positivos en ensayos basados en el uso de antígeno biotinilado.

Como se ha mencionado anteriormente, el "inmunoensayo" usado para detectar anticuerpos de acuerdo con la invención puede estar basado en procedimientos convencionales conocidos en la técnica, con la excepción de que se usan múltiples cantidades de antígeno para crear una curva de titulación. En una realización más preferida, el inmunoensayo puede ser un ELISA. Los ELISA se conocen bien en general en la técnica. En un ELISA "indirecto" típico, un antígeno que tiene especificidad por los anticuerpos bajo ensayo se inmoviliza en una superficie sólida (por ejemplo, los pocillos de una placa de ensayo de microtitulación convencional, o la superficie de una microperla o una micromatriz) y una muestra que comprende fluido corporal a ensayar para determinar la presencia de anticuerpos se pone en contacto con el antígeno inmovilizado. Cualquier anticuerpo de la especificidad deseada presente en la muestra se unirá al antígeno inmovilizado. Los complejos de antígeno/anticuerpo unidos pueden detectarse entonces usando cualquier método adecuado. En una realización preferida, un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana secundario marcado, que reconoce específicamente un epítipo común para una o más clases de inmunoglobulinas humanas, se usa para detectar los complejos de antígeno/anticuerpo. Típicamente, el anticuerpo secundario será anti-IgG o anti-IgM. El anticuerpo secundario está habitualmente marcado con un marcador detectable, típicamente un marcador enzimático tal como, por ejemplo, peroxidasa o fosfatasa alcalina, permitiendo la detección cuantitativa por adición de un sustrato para la enzima que genera un producto detectable, por ejemplo, un producto coloreado, quimioluminiscente o fluorescente. Pueden usarse otros tipos de marcadores detectables conocidos en la técnica con un efecto equivalente.

La invención se refiere a un método de detección de anticuerpos que son marcadores biológicos de una susceptibilidad a patología o enfermedad. Este aspecto particular de la invención excluye preferentemente ensayos diseñados para ensayar para anticuerpos producidos como resultado de una exposición a vacuna o protocolo de inmunización, distinta de una vacunación con marcadores de cáncer. Por lo tanto, los ensayos de acuerdo con este aspecto de la invención preferentemente no incluyen ensayos diseñados para ensayar la presencia de anticuerpos antivirales o antibacterianos después de la vacunación/inmunización.

En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo puede ser un autoanticuerpo. Como se ha indicado anteriormente, el término "autoanticuerpo" se refiere a un anticuerpo de origen natural dirigido contra un antígeno que el sistema inmune de un individuo reconoce como extraño aun cuando ese antígeno se originó en realidad en el individuo. Los autoanticuerpos incluyen anticuerpos dirigidos contra formas alteradas de proteínas de origen natural producidas por una célula enferma o durante un proceso patológico. La forma alterada de la proteína tiene su origen en el individuo pero puede ser vista por el sistema inmune del individuo como "no propia" y por lo tanto generar una respuesta inmune en ese individuo en forma de autoanticuerpos inmunológicamente específicos para la proteína alterada. Dichas formas alteradas de una proteína pueden incluir, por ejemplo, mutantes que tengan una secuencia de aminoácidos alterada, opcionalmente acompañada por cambios en la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, formas truncadas, variantes de corte y empalme, glicofomas alteradas, etc. En otras realizaciones, el autoanticuerpo puede dirigirse a una proteína que está sobreexpresada en una patología como resultado de la amplificación génica o de una regulación anormal de la transcripción. La sobreexpresión de una proteína que normalmente no encuentran las células del sistema inmune en cantidades significativas puede desencadenar una respuesta inmune que conduzca a la producción de autoanticuerpos. En todavía realizaciones adicionales, el autoanticuerpo puede estar dirigido a una forma fetal de una proteína que se expresa en una patología. Si una proteína fetal que normalmente se expresa solamente en fases tempranas del desarrollo antes de que el sistema inmune sea funcional se expresa en una patología, la forma fetal puede ser reconocida por el sistema inmune como "extraña", desencadenando una respuesta inmune que conduzca a la producción de autoanticuerpos.

En una realización, el anticuerpo puede ser un autoanticuerpo específico para una proteína marcadora tumoral y, más particularmente, un autoanticuerpo antitumoral "asociado a cáncer".

La expresión autoanticuerpo antitumoral "asociado a cáncer" se refiere a un autoanticuerpo que está dirigido contra un epítopo presente en formas de proteínas marcadoras tumorales que se expresan preferentemente en la patología cancerosa. La presencia de dichos autoanticuerpos es característica de la patología cancerosa o de la predisposición al cáncer en pacientes asintomáticos.

En aplicaciones preferidas, el método de la invención se usará para detectar la presencia de autoanticuerpos antitumorales asociados a cáncer en sujetos o pacientes humanos, y más preferentemente adoptará la forma de un inmunoensayo *in vitro*, realizado en una muestra de ensayo que comprende una muestra de fluido corporal tomada del sujeto/paciente. La muestra de fluido corporal puede diluirse en un tampón adecuado o puede tratarse para su almacenamiento a largo plazo o de otro modo antes del ensayo.

Los inmunoensayos *in vitro* no son invasivos y pueden repetirse tan frecuentemente como se crea necesario para construir un perfil de producción de autoanticuerpos en un paciente, antes de la aparición de la enfermedad, como en la exploración de individuos "en riesgo", o durante todo el transcurso de la enfermedad (analizado adicionalmente a continuación en relación con aplicaciones preferidas del método).

En particular, pero sin limitación, las realizaciones de los métodos de la invención pueden comprender inmunoensayos para detectar (simultáneamente) dos o más tipos de autoanticuerpos, teniendo cada uno especificidad por diferentes epítomos en la misma proteína marcadora tumoral o proteínas marcadoras tumorales relacionadas (por ejemplo, diferentes isoformas o variantes codificadas por un solo gen) o por epítomos en proteínas marcadoras tumorales diferentes (lo que significa proteínas codificadas por genes diferentes). Estos métodos implicarán típicamente el uso de un panel de dos o más conjuntos de antígenos, procediendo habitualmente cada conjunto de antígenos de una proteína marcadora tumoral diferente (significando diferente en este contexto proteínas que son los productos de genes diferentes) aunque, como se ha señalado anteriormente, un conjunto de antígenos también podría implicar epítomos diferentes en la misma proteína marcadora tumoral. Un conjunto de antígenos se refiere a un solo antígeno que se ensayará a cantidades/concentraciones diferentes en el método de la invención. Estos métodos, que en lo sucesivo pueden denominarse "ensayos de panel", utilizan un panel de dos o más conjuntos de antígenos para controlar la respuesta inmune global de un individuo a un tumor u otro cambio carcinogénico/neoplásico. Estos métodos detectan por lo tanto un "perfil" de la respuesta inmune en un individuo dado; indicando qué marcadores tumorales generan una respuesta inmune que da como resultado la producción de autoanticuerpos. El uso de un panel de dos o más antígenos para controlar la producción de autoanticuerpos contra dos o más marcadores tumorales diferentes es generalmente más sensible que la detección de autoanticuerpos contra marcadores individuales y proporciona una frecuencia mucho menor de resultados falsos negativos (véanse los documentos WO 99/58978 y WO 2004/044590, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria en su totalidad por preferencia).

Por lo tanto, en una realización no limitante, la invención proporciona un método de detección de dos o más anticuerpos en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en el que al menos uno de dichos anticuerpos es un marcador biológico de una susceptibilidad a patología o enfermedad, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con dos o más conjuntos de antígenos, en el que cada uno de dichos conjuntos de antígenos es específico para uno de dichos anticuerpos a detectar en la muestra de ensayo, y en el que cada conjunto de antígenos comprende una pluralidad de cantidades diferentes de dicho antígeno,
- (b) detectar la cantidad de unión específica entre dichos anticuerpos y dichos antígenos, y
- (c) representar o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada conjunto de antígenos usado en la etapa (a).

En una realización, cada uno de dichos dos o más anticuerpos será un marcador biológico de una susceptibilidad a patología o enfermedad, sin embargo, se incluye dentro del alcance de la invención combinar un ensayo de titulación para un antígeno marcador de enfermedad con un ensayo de titulación para otro tipo cualquiera de anticuerpo, que puede o no ser un marcador de enfermedad, en la misma muestra de ensayo.

De cualquier manera, el criterio de si están o no presentes en la muestra de ensayo los anticuerpos pertinentes se basa en la cantidad de unión específica observada a cada una de las concentraciones de antígeno diferentes con respecto a cada antígeno diferente en el ensayo, en otras palabras, los valores colectivos para cada antígeno más que una lectura a una única concentración para cada antígeno. Por lo tanto, la determinación de la presencia o ausencia de susceptibilidad a patología o enfermedad, o de anticuerpos contra una sustancia extraña en una muestra de paciente basándose en la presencia de dos o más tipos de anticuerpos puede basarse en estos valores colectivos para cada antígeno. Preferentemente, el juicio se realiza basándose en la proyección de una curva generalmente sigmoidea o en forma de S con respecto a cualquiera o todos los antígenos presentes en el ensayo.

Para evitar dudas, los ensayos basados en el uso de un solo tipo de antígeno para detectar anticuerpos pueden denominarse en la presente memoria "ensayos de un solo marcador", mientras que los ensayos basados en el uso de un panel de dos o más antígenos se denominan "ensayos de panel".

El método de la invención puede adaptarse para su uso en la detección de autoanticuerpos contra esencialmente cualquier proteína marcadora tumoral para la que pueda prepararse un antígeno adecuado, como un ensayo de un solo marcador o como un componente de un ensayo de panel. En particular, el método puede adaptarse para detectar/medir autoanticuerpos contra la proteína receptora del factor de crecimiento epidérmico EGFR (Downward et al (1984) Nature. 307: 521-527; Robertson et al. (2001) Archives of Pathology and Laboratory Medicine 126; 177-81), la glicoproteína MUC1 (Batra, S. K. et al. (1992) Int. J. Pancreatol. 12: 271-283) y las proteínas reguladoras del ciclo celular/transducción de señales Myc (Blackwood, E. M. et al. (1994) Molecular Biology of the Cell 5: 597-609), p53 (Matlashewski, G. et al. (1984) EMBO J. 3: 3257-3262; Wolf, D. et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 1887-1893) y ras (o Ras) (Capella, G. et al. (1991) Environ Health Perspectives. 93: 125-131), y también BRCA1 (Scully, R. et al. (1997) PNAS 94: 5605-10), BRCA2 (Sharan, S. K. et al. (1997) Nature. 386: 804-810), APC (Su, L. K. et al. (1993) Cancer Res. 53: 2728-2731; Munemitsu, S. et al. (1995) PNAS 92: 3046-50), CA125 (Nouwen, E. J. et al. (1990) Differentiation. 45: 192-8), PSA (Rosenberg, R. S. et al. (1998) Biochem Biophys Res Commun. 248: 935-939), antígeno carcinoembrionario CEA (Duffy, M.J. (2001) Clin Chem, Abr 47(4): 624-30), CA19.9 (Haga, Y. et al (1989) Clin. Biochem (1989) Oct 22(5): 363-8), NY-ESO-1 (antígeno de cáncer/testículo; Chen, Y.-T. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 94: 1914-1918, 1997), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata; Israeli, R. S. et al., Cancer Res. 53: 227-230, 1993), PSCA (antígeno de células madre de próstata; Reiter, R. E. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 1735-1740, 1998) y EpCam (molécula de adhesión celular epitelial; Szala, S. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 87: 3542-3546, 1990), HER2 (también conocido como c-erbB2 Coussens, L. et al., Science. 230: 1132-1139, 1985), CAGE (Jager D, et al., Cancer Res. 15 Dic 1999; 59(24): 6197-204; Mashino K, et al., Br J Cancer. 1 Sept 2001; 85(5): 713-20), citoqueratinas (Moll R, et al., Cell. Nov 1982; 31(1): 11-24; Braun S, et al., N Engl J Med. 2000; 342: 525-533), recovirina (Maeda A, et al., Cancer Res. 1 Abr 2000; 60(7): 1914-20, calicreínas (Kim H, et al., Br J Cancer 2001; 84: 643-650; Yousef GM, et al., Tumor Biol 2002; 23: 185-192); anexinas (Hudelst G, et al., Breast Cancer Res Treat. Ag 2004; 86(3): 281-91),  $\alpha$ -fetoproteína (Stiller D, et al., Acta Histochem Suppl. 1986; 33: 225-31), GRP78 (Block TM, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 18 En 2005; 102(3): 779-84; Hsu WM, et al., Int J Cancer. 1 Mar 2005; 113(6): 920-7), CA125 (Norum LF, et al., Tumour Biol. Jul-Ag 2001; 22(4): 223-8; Perey L, et al., Br J Cancer. Oct 1990; 62(4): 668-70; Devine PL, et al., Anticancer Res. May-Jun 1992; 12(3): 709-17); mamoglobina (Zehentner BK, et al., Clin Chem. Nov 2004; 50(11): 2069-76; Zehentner BK, Carter D. Clin Biochem. Abr 2004; 37(4): 249-57), raf (Callans LS. et al., Ann Surg Oncol. En 1995; 2(1): 38-42; Pratt MA, et al., Mol Cell Biochem. Dic 1998; 189(1-2): 119-25), beta-gonadotropina coriónica humana b-HCG (Ayala AR, et al., Am J Reprod Immunol. Abr-May 1983; 3(3): 149-51; Gregory JJ Jr, et al., Drugs. Abr 1999; 57(4): 463-7), o antígeno 4-5 (Krause P, et al., J Immunol Methods. Dic 2003; 283(1-2): 261-7). Sin embargo, la invención no pretende limitarse a la detección de autoanticuerpos contra estos marcadores tumorales particulares.

Pueden emplearse métodos de ensayo de acuerdo con la invención basados en la detección de autoanticuerpos anti-marcadores tumorales (en forma de ensayo de un solo marcador o de panel) en una diversidad de situaciones clínicas diferentes. En particular, el método puede usarse en la detección o el diagnóstico del cáncer, en la evaluación del pronóstico de un paciente diagnosticado con cáncer, en la predicción de la respuesta a terapia, en el control del avance del cáncer u otra enfermedad neoplásica en un paciente, en la detección de un cambio neoplásico temprano o carcinogénico temprano en un sujeto humano asintomático, en la exploración de una población de sujetos humanos asintomáticos para identificar a aquellos sujetos que presentan un riesgo aumentado de desarrollo de cáncer, o para diagnosticar la presencia de cáncer, en la predicción de la respuesta de un paciente con cáncer a un tratamiento anticanceroso (por ejemplo, vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, terapia de anticuerpos humanos, quimioterapia), en el control de la respuesta de un paciente con cáncer a un tratamiento anticanceroso (por ejemplo, vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, terapia de anticuerpos humanos, quimioterapia), en la detección de enfermedad recurrente en un paciente al que se le ha diagnosticado previamente que tiene cáncer que se ha sometido a un tratamiento anticanceroso para reducir la cantidad de cáncer presente, o en la selección de una terapia anticancerosa (por ejemplo vacuna, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, terapia de anticuerpos humanos, quimioterapia) para su uso en un paciente particular.

Los inventores han observado en general que los niveles de autoanticuerpos asociados con cáncer muestran una correlación positiva con la patología (véase también el documento WO 99/58979, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia). Por lo tanto, cuando se usa el método de la invención en aplicaciones clínicas, niveles aumentados de autoanticuerpos anti-marcadores tumorales en comparación con controles adecuados se toman en general como un indicio de la patología cancerosa.

Por ejemplo, cuando los inmunoensayos se usan en el diagnóstico del cáncer, la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos en comparación con individuos de control "normales" se toma como un indicio de que el individuo tiene cáncer. Los individuos de control "normales" serán preferentemente controles de la misma edad que no tengan ningún diagnóstico de cáncer basándose en criterios clínicos, de formación de imágenes y/o bioquímicos.

Cuando los inmunoensayos se usan en la predicción de la respuesta de un paciente con cáncer a un tratamiento anticanceroso (por ejemplo vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, terapia de anticuerpos humanos, quimioterapia), la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos en comparación con individuos de control "normales" puede tomarse como un indicio de si es o no

probable que el individuo responda al tratamiento anticanceroso. Los individuos de control "normales" serán preferentemente controles de la misma edad que no tengan ningún diagnóstico de cáncer basándose en criterios clínicos, de formación de imágenes y/o bioquímicos. Para cada uno de los tratamientos enumerados anteriormente puede establecerse una relación entre el nivel de autoanticuerpos en comparación con controles y el probable éxito del tratamiento, por observación del resultado de dicho tratamiento en pacientes cuyo estado de anticuerpos se controla durante todo el tratamiento. La relación previamente establecida puede usarse después para predecir la probabilidad de éxito para cada tratamiento en un paciente dado basándose en la evaluación del estado de autoanticuerpos.

5  
10  
15  
20  
25

Cuando los inmunoensayos se usan en el control del avance del cáncer o de otra enfermedad neoplásica en un paciente, la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos en comparación con un "control normal" se toma como un indicio de la presencia de cáncer en el paciente. El "control normal" pueden ser niveles de autoanticuerpos presentes en individuos de control, preferentemente de la misma edad, que no tengan ningún diagnóstico de cáncer basándose en criterios clínicos, de formación de imágenes y/o bioquímicos. Como alternativa, el "control normal" puede ser un nivel "basal" establecido para el paciente particular bajo ensayo. El nivel "basal" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos presente cuando se realizó un primer diagnóstico de cáncer o un diagnóstico de cáncer recurrente. Cualquier aumento por encima del nivel basal se tomaría como un indicio de que la cantidad de cáncer presente en el paciente ha aumentado, mientras que cualquier disminución por debajo del nivel basal se tomaría como un indicio de que la cantidad de cáncer presente en el paciente ha disminuido. El valor "basal" también puede ser, por ejemplo, el nivel antes de que se comience un nuevo tratamiento. Un cambio en el nivel de autoanticuerpos se tomaría como un indicio de la eficacia de la terapia. La dirección del "cambio" (es decir, aumento frente a disminución) que indica una respuesta positiva al tratamiento dependerá de la naturaleza exacta del tratamiento. Para cualquier tratamiento dado, la dirección del "cambio" en los niveles de autoanticuerpos que indica un resultado positivo puede determinarse fácilmente, por ejemplo, por control de los niveles de autoanticuerpos en comparación con otros indicadores clínicos o bioquímicos de respuesta al tratamiento.

30

Cuando los inmunoensayos se usan en la exploración de una población de sujetos humanos asintomáticos, esto puede ser para identificar a aquellos sujetos que presenten un riesgo aumentado de desarrollar cáncer, los individuos que tengan un nivel elevado de autoanticuerpos en comparación con individuos de control "normales" se identifican como que están "en riesgo" de desarrollar cáncer. Los individuos de control "normales" serán preferentemente controles de la misma edad en los que no se haya identificado que tengan ninguna predisposición a desarrollar cáncer o ningún riesgo elevado significativo de desarrollar cáncer. Una excepción a esto puede ser cuando la propia edad es un factor de riesgo principal.

35  
40  
45

Cuando los inmunoensayos se usan en la exploración de una población de sujetos humanos asintomáticos, esto puede ser para diagnosticar cáncer en aquellos sujetos que ya han desarrollado un cáncer, puntuándose los individuos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos en comparación con individuos de control "normales" como que tienen cáncer o alguna forma de cambio neoplásico. Los individuos de control "normales" serán preferentemente controles de la misma edad en los que no se haya identificado que tengan ninguna predisposición a desarrollar cáncer o ningún riesgo elevado significativo de desarrollar cáncer. Una excepción a esto puede ser cuando la propia edad es un factor de riesgo principal. Como alternativa, el "control normal" puede ser un nivel "basal" establecido para el paciente particular bajo ensayo. El nivel "basal" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos presente cuando el paciente se ensayó por primera vez y se descubrió que tenía niveles que no estaban elevados por encima de una población de "control normal". Cualquier aumento después de eso frente a esta medición basal se tomaría como un indicio de la presencia de cáncer en ese individuo. Por lo tanto, el individuo podría convertirse a través de dicho ensayo basal en su propio control para la medición futura de autoanticuerpos.

50  
55  
60

Cuando los inmunoensayos se usan en el control de la respuesta de un paciente con cáncer a un tratamiento anticanceroso (por ejemplo vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, terapia de anticuerpos humanos, quimioterapia), la presencia de un nivel alterado de autoanticuerpos después del tratamiento se toma como un indicio de que el paciente ha respondido positivamente al tratamiento. Un nivel basal de autoanticuerpos tomado antes de que se comience el tratamiento puede usarse con fines comparativos para determinar si el tratamiento da como resultado un "aumento o disminución" en los niveles de autoanticuerpos. Un cambio en el nivel de autoanticuerpos se tomaría como un indicio de la eficacia de la terapia. La dirección del "cambio" (es decir, aumento frente a disminución) que indica una respuesta positiva al tratamiento dependerá de la naturaleza exacta del tratamiento. Para cualquier tratamiento dado, la dirección del "cambio" en los niveles de autoanticuerpos que indica un resultado positivo puede determinarse fácilmente, por ejemplo, por control de los niveles de autoanticuerpos en comparación con otros indicadores clínicos o bioquímicos de respuesta al tratamiento.

65

El método de la invención puede usarse en la predicción y/o control de respuestas de un individuo a esencialmente cualquier tratamiento anticanceroso conocido. Esto incluye, por ejemplo, terapia de anticuerpos humanos, en la que se infunden al paciente anticuerpos monoclonales o policlonales, siendo un ejemplo específico no limitante el tratamiento con el anticuerpo anti-factor de crecimiento Herceptina" (Baselga, J., D. Tripathy et al., J Clin Oncol., 14(3), 737-744, 1996). La presencia de una respuesta de autoanticuerpos natural puede aumentar o inhibir la eficacia de tratamiento con anticuerpos terapéuticos infundidos artificialmente. Usando el método de la invención es

posible correlacionar la respuesta a cualquier tratamiento anticanceroso, incluyendo la terapia de anticuerpos, con niveles naturales de autoanticuerpos antes de y a lo largo del transcurso del tratamiento en cualquier paciente o grupo de pacientes. Después, este conocimiento puede usarse a su vez para predecir cómo responderán otros pacientes (o el mismo paciente en el caso de un tratamiento repetido) al mismo tratamiento.

5 Cuando los inmunoensayos se usan en la detección de una enfermedad recurrente, la presencia de un nivel aumentado de autoanticuerpos en el paciente en comparación con "controles normales" se toma como un indicio de que la enfermedad ha recurrido. El "control normal" pueden ser niveles de autoanticuerpos presentes en individuos de control, preferentemente de la misma edad, que no tienen ningún diagnóstico de cáncer basándose en criterios clínicos, de formación de imágenes y/o bioquímicos. Como alternativa, el "control normal" puede ser un nivel "basal" establecido para el paciente particular bajo ensayo. El nivel "basal" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos presente durante un periodo de remisión de enfermedad basándose en criterios clínicos, de formación de imágenes y/o bioquímicos.

15 El método de ensayo de la invención puede aplicarse en la detección de muchos tipos de cáncer diferentes, de los que son ejemplos los cánceres de mama, vejiga, colorrectal, próstata, pulmón, pancreático y ovárico. Los ensayos pueden complementar los métodos de exploración y vigilancia existentes. Por ejemplo, en el caso del cáncer de mama primario podrían usarse inmunoensayos para autoanticuerpos para alertar a los clínicos de biopsiar pequeñas lesiones en mamogramas que radiográficamente no parezcan sospechosas, o de llevar a cabo formación de imágenes de las mamas o repetir la formación de imágenes antes de lo planeado. En la clínica, se espera que los métodos de ensayo de la invención sean más objetivos y reproducibles en comparación con las técnicas de formación de imágenes actuales (es decir, mamografía y ultrasonido), cuyo éxito puede depender del operario.

25 Los "ensayos de panel" pueden confeccionarse teniendo en consideración la aplicación clínica particular. Un panel de antígenos para la detección de autoanticuerpos contra al menos p53 y c-erbB2 es particularmente útil para muchos tipos de cáncer y puede complementarse opcionalmente con otros marcadores que tengan una asociación conocida con el cáncer particular, o con una fase del cáncer particular que se va a detectar. Por ejemplo, para el cáncer de mama el panel podría incluir MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA, mientras que para el cáncer de vejiga el panel podría incluir opcionalmente MUC 1 y/o c-myc, para el cáncer colorrectal ras y/o APC, para el cáncer de próstata PSA y/o BRCA 1 y/o BRCA2 o para el cáncer de ovario BRCA1 y/o BRCA2 y/o CA125. Existen otras realizaciones preferidas en las que p53 o c-erbB2 no son necesariamente esenciales.

En el caso del cáncer de mama, los paneles adecuados podrían seleccionarse de los siguientes:

35 p53 y MUC 1 con c-erbB2 y/o c-myc, y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o BRC1 opcionales;  
 p53 y c-myc con c-erbB2 y/o MUC1 y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o BRC1 opcionales;  
 p53 y BRCA1 con c-erbB2 y/o MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o BRC1 opcionales;  
 p53 y BRCA2 con c-erbB2 y/o MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o BRC1 opcionales;  
 c-erbB2 y MUC 1 con p53 y/o c-myc, y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o BRC1 opcionales;  
 40 c-erbB2 y c-myc con p53 y/o MUC1 y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o BRC1 opcionales;  
 c-erbB2 y BRCA1 con p53 y/o MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o BRC1 opcionales;  
 c-erbB2 y BRCA2 con p53 y/o MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o PSA opcionales;  
 p53, c-myc, NY-ESO-1 y BRCA2.

45 En el caso del cáncer colorrectal los paneles adecuados podrían seleccionarse, por ejemplo, de los siguientes:

p53 y ras con c-erbB2 y/o APC opcionales;  
 p53 y APC con c-erbB2 y/o Ras opcionales;  
 Ras y APC con p53 y/o c-erbB2 opcionales.  
 50 Dichos paneles también podrían incluir CEA o CA19-9.

En el caso del cáncer de próstata los paneles adecuados podrían seleccionarse, por ejemplo, de los siguientes:

55 p53 y PSA con BRCA1 y/o BRCA2 y/o c-erbB2 opcionales;  
 c-erbB2 y PSA con p53 y/o BRCA1 y/o BRCA2 opcionales;  
 PSMA, PSCA y calicreínas.

En el caso del cáncer de ovario los paneles adecuados podrían seleccionarse, por ejemplo, de los siguientes:

60 p53 y CA125 con c-erbB2 y/o BRCA1 y/o BRCA2 opcionales;  
 c-erbB2 y CA125 con p53 y/o BRCA1 y/o BRCA2 opcionales;  
 HER2, anexinas, CAGE y 4-5.

En el caso del cáncer de pulmón, los paneles adecuados pueden seleccionarse de:

65 p53 y NY-ESO-1, opcionalmente con marcadores adicionales;

HER2, anexas, CAGE y 4-5.

- 5 Cuando el método de la invención se usa para realizar un "ensayo de panel" basado en dos o más antígenos marcadores tumorales derivados de diferentes proteínas, al menos uno de los antígenos en el panel debe ensayarse en un ensayo de acuerdo con la invención basado en el ensayo de múltiples cantidades diferentes del antígeno para formar una curva de titulación. Preferentemente, cada uno de los antígenos que forman el panel se ensaya de acuerdo con el ensayo de la invención y se representa/calcula una curva de titulación para cada antígeno individual en el panel.
- 10 La invención también contempla que pueda usarse un ensayo de titulación para la detección de al menos un anticuerpo anti-marcador tumoral en combinación con un ensayo diseñado para detectar al menos una proteína marcadora tumoral (que puede estar relacionada o no relacionada con el antígeno usado en el ensayo de titulación) en la misma muestra de paciente. Por lo tanto, pueden realizarse en paralelo en una sola muestra de paciente ensayos para autoanticuerpos anti-marcadores tumorales y ensayos para proteínas marcadoras tumorales.
- 15 En una realización adicional, el método de inmunoensayo de la invención puede usarse en la selección de una vacuna anti-cáncer para su uso en un paciente particular. En esta realización, una muestra de fluido corporal tomada del paciente se ensaya usando un panel de dos o más antígenos, correspondiendo cada uno a una proteína marcadora tumoral diferente, para determinar la potencia relativa de la respuesta inmune del paciente contra cada una de las proteínas marcadoras tumorales diferentes. La "potencia de la respuesta inmune" contra una proteína o proteínas marcadoras tumorales dadas está indicada por la presencia y/o la cantidad de autoanticuerpos asociados con cáncer específicos para esa proteína marcadora tumoral detectada usando el inmunoensayo; cuando los autoanticuerpos se cuantifican, cuanto mayor sea el nivel de autoanticuerpos asociados con cáncer más potente será la respuesta inmune. La proteína o proteínas marcadoras tumorales identificadas como generadoras de la respuesta inmune más potente o de respuestas potentes en el paciente (es decir, el mayor nivel de autoanticuerpos) se seleccionan entonces para constituir la base de una vacuna anti-cáncer para su uso en el paciente.
- 20 La utilidad del método de la invención no se limita a la detección de autoanticuerpos antitumorales, aunque el ensayo es particularmente útil para este fin. El cáncer es sólo un ejemplo de una enfermedad en la que puede usarse la detección de autoanticuerpos como un marcador biológico para la susceptibilidad a patología/enfermedad. Los inventores han demostrado que se obtienen ventajas importantes mediante el uso de una estrategia de titulación para detectar autoanticuerpos en muestras de pacientes. Por lo tanto, es razonable concluir que se obtendrán ventajas similares mediante el uso de la estrategia de titulación para detectar autoanticuerpos que sean marcadores biológicos para enfermedades distintas de cáncer. Por lo tanto, el método es aplicable a la detección de cualquier autoanticuerpo que sirva como marcador biológico para una susceptibilidad a patología o enfermedad en cualquier enfermedad que se haya demostrado (o que pueda demostrarse) que está asociada con la producción de autoanticuerpos.
- 30 Otras aplicaciones del método de la invención incluyen, pero sin limitación, la detección de autoanticuerpos que son marcadores biológicos de una enfermedad autoinmune, tal como, por ejemplo, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), cirrosis biliar primaria (PBC), tiroiditis autoinmune (por ejemplo tiroiditis de Hashimoto), gastritis autoinmune (por ejemplo anemia perniciosa), adrenalitis autoinmune (por ejemplo enfermedad de Addison), hipoparatiroidismo autoinmune, diabetes autoinmune (por ejemplo diabetes Tipo 1) o miastenia grave, y la exploración de muestras de pacientes para enfermedades renales o hepáticas que conduzcan a una insuficiencia o fallo de cualquier órgano, y para la exploración de muestras de pacientes postrasplante para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra el tejido enfermo (que se ha dejado *in situ* postrasplante) o contra el tejido trasplantado.
- 40 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de detección de un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en el que dicho anticuerpo está dirigido contra una sustancia extraña introducida en dicho sujeto mamífero, comprendiendo el método:
- 50 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,
- 55 (b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno, y
- (c) representar o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno usada en la etapa (a).
- 60 Preferentemente, en esta realización de la invención el método incluye como etapa (d) detectar la presencia de dicho anticuerpo basándose en la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno a cada concentración de antígeno diferente usada, en otras palabras, los valores colectivos observados para un antígeno particular. Preferentemente, la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el ensayo está indicada mediante una curva generalmente sigmoidea o en forma de S.
- 65 En este aspecto de la invención, la metodología de titulación puede usarse para evaluar la respuesta inmune de un sujeto mamífero y, preferentemente, un sujeto humano, contra cualquier sustancia extraña introducida en dicho

sujeto.

5 En una realización, la sustancia extraña puede ser un agente terapéutico tal como, por ejemplo, un fármaco o profármaco, terapia de anticuerpos humanos o vacuna. El método de la invención puede usarse para evaluar si la administración de un agente terapéutico a un paciente desencadena una respuesta inmune que conduce a la producción de anticuerpos específicos para un epítipo en el agente terapéutico, o un componente de un vehículo, excipiente, soporte, etc. de administración administrado con el agente terapéutico.

10 La naturaleza exacta del agente terapéutico no es limitante de la invención. En realizaciones no limitantes, el método de la invención puede usarse para evaluar la respuesta inmune contra moléculas pequeñas sintéticas, sustancias de origen natural, agentes biológicos de origen natural o producidos sintéticamente, o cualquier combinación de dos o más de los anteriores, opcionalmente en combinación con excipientes, soportes o vehículos de administración.

15 En una realización útil, el método de la invención puede usarse para evaluar la respuesta inmune contra una porción no diana de un agente terapéutico o vacuna. Por porción "no diana" se entiende una parte componente del agente terapéutico o vacuna administrado que, en el caso de un agente terapéutico, no contribuye directamente a la actividad terapéutica o, en el caso de una vacuna, no está destinada a generar la producción de anticuerpos en el hospedador. La porción no diana puede estar presente, por ejemplo, para facilitar la purificación del agente terapéutico o vacuna, o puede estar diseñada para contribuir a la administración, captación o direccionamiento del agente terapéutico/vacuna. Los ejemplos de dichas porciones "no diana" incluyen, pero sin limitación, enlazadores o marcadores unidos comúnmente a polipéptidos expresados de forma recombinante, tales como marcadores de biotina, etiquetas de histidina, etc.

20 En otra realización de este aspecto de la invención, la sustancia extraña puede ser un agente infeccioso tal como un hongo, bacteria, virus o parásito.

25 La invención se entenderá adicionalmente con referencia a los ejemplos experimentales no limitantes siguientes:

**Ejemplo 1 – Protocolo general para titulación de antígeno en un ensayo de autoanticuerpos**

30 Pueden prepararse muestras de antígenos marcadores tumorales (biotinilados) por expresión recombinante, siguiendo métodos análogos a los descritos en el documento WO 99/58978.

35 En resumen, ADNc que codifican los antígenos marcadores de interés se clonaron en el vector pET21 (Invitrogen), que se ha modificado para codificar una etiqueta de biotina y una etiqueta de histidina 6x para contribuir a la purificación de la proteína expresada. Los clones resultantes se cultivan en una célula hospedadora bacteriana adecuada (en cuerpos de inclusión), las bacterias se lisan y se desnaturalizan, y los antígenos expresados se recuperan mediante columnas de afinidad de quelato de níquel (Hi-trap, disponible en el mercado en Amersham, siguiendo el protocolo del fabricante). Los antígenos expresados se renaturalizaron mediante diálisis en tampón apropiado, y el rendimiento de la proteína expresada se evaluó por SDS-PAGE, transferencia de western y ELISA, y se cuantificó antes del almacenamiento.

40 El control negativo VOL es un vector vacío (es decir, sin ADNc clonado) que todavía incluye las secuencias de etiqueta de His y biotina).

45 Los números de acceso de GenBank para varios ADNc marcadores son los siguientes:

P53: B003596  
 c-myc: V00568  
 50 EGO6 (HER2) dominio extracelular: M11730  
 NY-ESO: NM\_001327  
 BRCA2: U43746  
 BRCA1 delta 9-10: NM\_007302

55 1. Los antígenos y VOL (control negativo) se diluyeron hasta concentraciones apropiadas en tampón carbonato 0,1 M, después se diluyeron en serie para formar un intervalo de titulación semilogarítmico (véase la tabla 1). Las diluciones de antígeno se dispensaron a 50 µl/pocillo en las filas de una placa de microtitulación Falcon de acuerdo con la distribución de placa, usando una pipeta multicanal electrónica. Las placas se cubrieron y se almacenaron a 4°C durante 48 h.

60 2. Las placas se lavaron una vez en PBS + tween 20 al 0,1% usando un lavador de placas automático, después se secaron dando golpecitos sobre un pañuelo de papel.

65 3. Las placas se bloquearon con tampón de incubación de alto contenido en sal (HSB, PBS + NaCl 0,5 M + caseína al 0,1%) a 200 µl/pocillo durante una hora o hasta ser necesario su uso (se almacenan cubiertas a 4°C).

4. Las muestras de suero se descongelaron, se agitaron vorticialmente y se diluyeron 1/100 en HSB a temperatura ambiente.

5. Las placas se vaciaron y se secaron dando golpecitos sobre un pañuelo de papel. Cada muestra de suero diluida se dispensó a 50 µl/pocillo en todos los pocillos de la placa de microtitulación usando una pipeta multicanal electrónica. Los anticuerpos de control se diluyeron 1/1000 en HSB-arrd dispensado en pocillos apropiados de la placa final. Las placas se cubrieron y se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación.

10. 6. Etapa de lavado: Las placas se lavaron tres veces en PBS + tween 20 al 0,1% usando un lavador de placas automático, después se secaron dando golpecitos sobre un pañuelo de papel.

15. 7. Se dispensó anti-Ig humana de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson, 1/10.000 en HSB) a 50 µl/pocillo en todos los pocillos de la placa de microtitulación. Se dispensó anti-Ig de ratón de conejo conjugado con HRP (1/1000 en HSB) en pocillos de control que contenían anticuerpo anti-antígeno. Después, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación.

8. Las placas se lavaron como en la etapa 6.

20. 9. Se añadió sustrato TMB previamente preparado a 50 µl/pocillo y la placa se incubó sobre la poyata durante 10 min. Las placas se golpearon suavemente para mezclar.

25. 10. La densidad óptica de los pocillos se determinó a 650 nm usando un protocolo de lector de placas convencional.

Tabla 1: Distribuciones de placa convencionales

Placas de P53												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	p53 10 µg/ml			c-myc 10 µ/ml			NY-ESO 10 µg/ml			VOL 10 µg/ml		
B	p53 3 µg/ml			c-myc 3 µg/ml			NY-ESO 3 µg/ml			VOL 3 µg/ml		
C	p53 1 µg/ml			c-myc 1 µg/ml			NY-ESO 1 µg/ml			VOL 1 µg/ml		
D	p53 0,3 µg/ml			c-myc 0,3 µg/ml			NY-ESO 0,3 µg/ml			VOL 0,3 µg/ml		
E	p53 0,1 µg/ml			c-myc 0,1 µg/ml			NY-ESO 0,1 µg/ml			VOL 0,1 µg/ml		
F	p53 0,03 µg/ml			c-myc 0,03 µg/ml			NY-ESO 0,03 µg/ml			VOL 0,03 µg/ml		
G	p53 0,01 µg/ml			c-myc 0,01 µg/ml			NY-ESO 0,01 µg/ml			VOL 0,01 µg/ml		
H	tampón carbonato			tampón carbonato			tampón carbonato			tampón carbonato		
Placas de BRCA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRCA1 10 µg/ml			BRCA2 10 µg/ml			ECD-6 10 µg/ml			VOL, 10 µg/ml		
B	BRCA1 3 µg/ml			BRCA2 3 µg/ml			ECD-6 3 µg/ml			VOL 3 µg/ml		
C	BRCA1 1 µg/ml			BRCA2 1 µg/ml			ECD-6 1 µg/ml			VOL 1 µg/ml		
D	BRCA1 0,3 µg/ml			BRCA2,0,3 µg/ml			ECD-6 0,3 µg/ml			VOL 0,3 µg/ml		
E	BRCA1 0,1 µg/ml			BRCA2 0,1 µg/ml			ECD-6 0,1 µg/ml			VOL 0,1 µg/ml		
F	BRCA1 0,03 µg/ml			BRCA2 0,03 µg/ml			ECD-6 0,03 µg/ml			VOL 0,03 µg/ml		
G	BRCA1 0,01 µg/ml			BRCA2 0,01 µg/ml			ECD-6 0,01 µg/ml			VOL 0,01 µg/ml		
H	tampón carbonato			tampón carbonato			tampón carbonato			tampón carbonato		

**Ejemplo 2 – Detección de autoanticuerpos en cáncer de mama primario**

30. Los datos siguientes se obtuvieron de un estudio piloto para evaluar la sensibilidad y reproducibilidad de un panel de ensayos de autoanticuerpos de titulación en cáncer de mama primario (PBC). El estudio incluía suero de 17 mujeres sin pruebas de cáncer y muestras de suero preoperatorias de 20 mujeres con cáncer de mama primario. Las muestras normales y de cáncer eran de la misma edad. Hubo que retirar una muestra normal y tres muestras de cáncer del estudio porque mostraron pruebas de respuestas de anticuerpos anti-biotina y por lo tanto no podían evaluarse usando el ensayo en su formato actual. Se cree que aproximadamente el 10% de la población desarrolla una respuesta inmune contra biotina.

35.

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo proporcionado en el ejemplo 1, usando los antígenos p53, c-myc, NY- ESO-1 y BRCA2.

5 La Figura 1 proporciona ejemplos de curvas obtenidas cuando se usó el ensayo de titulación de antígeno para medir autoanticuerpos de p53 en suero. Puede observarse que el suero de paciente con cáncer 17766(C) se une fuertemente al antígeno de ensayo (p53) con una curva sigmoidea característica, pero no se une al control negativo, VOL. En comparación, el suero de un individuo normal, 18052(N), no proporciona una curva de titulación para la unión al antígeno de ensayo o al control negativo.

10 Los niveles de autoanticuerpos se expresaron como la densidad óptica (650 nm) debida a la unión al antígeno de ensayo menos la debida a la unión al control negativo (VOL). El punto de corte normal se calculó como el 95º percentil (media + 2 desviaciones típicas) del grupo normal. Esto se muestra como la línea de puntos en la Figura 2, en la que los niveles de autoanticuerpo anti-p53 en individuos normales se comparan con pacientes con cáncer. Puede observarse que el grupo con cáncer muestra generalmente mayores niveles de autoanticuerpos y también  
15 tiene una mayor proporción de individuos con niveles por encima del punto de corte.

El panel consistía en cuatro antígenos; p53, c-myc, NY-E80-1 y BRCA2. La sensibilidad de los ensayos individuales se proporciona en la tabla 2, junto con la sensibilidad combinada del panel de cuatro antígenos en la detección de  
20 cáncer de mama primario (63%).

p53	c-myc	NY-ESO-1	BRCA2	Panel
6/17 (35%)	5/17 (29%)	4/17 (24%)	4/17 (24%)	63%

25 Tabla 2: Sensibilidad del ensayo de autoanticuerpos de titulación de antígeno. Se midieron los autoanticuerpos contra cuatro antígenos diferentes y se calculó la sensibilidad combinada del panel. Se calcularon los niveles del punto de corte como la media + 2 desviaciones típicas de la muestra normal enviada. Los individuos con respuestas de anticuerpos anti-biotina se excluyeron como no susceptibles de evaluación.

30 Para evaluar si las mediciones obtenidas usando el ensayo de autoanticuerpos de titulación eran o no reproducibles, los ensayos se realizaron en tres días separados y los resultados se muestran en la tabla 3. Un ensayo se consideraba reproducible si concordaban los tres resultados. La reproducibilidad de las mediciones realizadas en suero normal era del 94% (15/16) y del 88% (14/16) en muestras de cáncer de mama.

Normales	Procesamiento			PBC	Procesamiento		
	A	B	C		A	B	C
18017	-	+	+	17733	+	-	-
18018	-	-	-	17734 AB	+	-	-
18019	-	-	-	17735	-	-	-
18020	-	-	-	17742	+	+	+
18021	-	-	-	17743	+	+	+
18047	-	-	-	17744	+	+	+
18048 AB	+	-	+	17755	-	+	-
18049	-	-	-	17756	-	-	-
18050	ND	-	-	17757	-	-	-
18051	-	-	-	17758	ND	-	-
18052	-	-	-	17759	+	+	+
18053	-	-	-	17766	+	+	+
18054	-	-	-	17774	-	-	-
18055	-	-	-	17775 AB	+	+	-
18056	-	-	-	17776	-	-	-
18057	-	-	-	17777	-	-	ND
18058	-	-	-	17796	-	-	-
				17797 AB	+	-	-
				17832	+	+	+
				17450			

35 Tabla 3: Reproducibilidad del ensayo de titulación de antígeno para autoanticuerpos de p53. Se realizaron ensayos en tres días separados (Procesamientos A, B y C) en muestras de suero de pacientes con cáncer de mama primario (PBC) o controles normales. Los niveles del punto de corte se calcularon diariamente como la media + 2 desviaciones típicas del conjunto de muestras normales. AB denota individuos que mostraban pruebas de una respuesta de anticuerpos anti-biotina y que no pueden evaluarse mediante el formato de ensayo actual. Un ensayo

se consideraba reproducible si concordaban los tres resultados. La reproducibilidad de los individuos normales era del 94% (15/16) y la de los pacientes con PBC era del 88% (14/16).

**Ejemplo 3 – Detección de autoanticuerpos en cáncer de pulmón**

5 El análisis de respuestas de autoanticuerpos contra 2 antígenos (p53 y NY-ESO) en un estudio de cáncer de pulmón piloto (10 plasmás normales y 9 plasmás de cáncer de pulmón) puso de manifiesto un índice de detección del 78% (Figura 3).

10 El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo general del ejemplo 1, excepto por que se usaron muestras de plasma en lugar de suero.

15 Las muestras de pacientes positivas presentaban curvas de titulación sigmoideas similares a las mostradas en la Figura 1. La Figura 3 muestra una comparación de los niveles de autoanticuerpos de p53 y NY-ESO en individuos normales y pacientes con cáncer de pulmón, según se miden usando el ensayo de titulación de antígeno. Los puntos de corte normales se calcularon como la media más 2 desviaciones típicas de la población normal.

**Ejemplo 4 – Curvas de titulación adicionales**

20 Todas las curvas de titulación adicionales siguientes se generaron en ensayos basados en la metodología general descrita en el Ejemplo 1. Los resultados indican que la estrategia de curva de titulación puede aplicarse a la detección de una diversidad de antígenos diferentes, en diferentes tipos de fluidos corporales y en diferente enfermedad (ejemplificada por diferentes tipos de cáncer), y también ilustran la ventaja del método de la invención para distinguir entre resultados "verdaderos" y "falsos" positivos.

25 La Figura 4 muestra una curva de titulación para la detección de autoanticuerpos contra p53 y NY-ESO en una muestra de líquido ascítico tomada de un paciente con cáncer de mama. Este paciente se ensayó, pero se descubrió que no producía autoanticuerpos contra c-myc.

30 La Figura 5 muestra una curva de titulación para la detección de autoanticuerpos contra BRCA1, BRCA2 y HER2 en una muestra de suero de un paciente con cáncer de mama (carcinoma ductal *in situ*).

35 La Figura 6 muestra una curva de titulación para la detección de autoanticuerpos contra NY-ESO en una muestra de suero de un paciente con cáncer de pulmón. Este paciente se ensayó, pero se descubrió que no producía autoanticuerpos contra p53 o c-myc.

40 La Figura 7 muestra una curva de titulación para la detección de autoanticuerpos contra NY-ESO y p53 en una muestra de suero de un paciente con cáncer de pulmón. Este paciente se ensayó, pero se descubrió que no producía autoanticuerpos contra c-myc.

45 Las Figuras 8(a) y 8(b) ilustran los resultados en dos ensayos de titulación independientes para autoanticuerpos contra p53, c-myc y NY-ESO-1 en muestras de suero de un sujeto "normal" (es decir, un individuo sin pruebas de cáncer). En el ensayo mostrado en la Figura 8(a) se observa una línea plana con cantidades crecientes de antígeno, lo que indica que la muestra de suero no contiene autoanticuerpos contra ninguno de los antígenos ensayados. Cuando se ensayó de nuevo una segunda alícuota de la misma muestra de suero de paciente usando la misma metodología de ensayo, el ensayo falló, produciendo los resultados anómalos mostrados en la Figura 8(b). La ausencia de la curva de titulación característica con cantidades crecientes de antígeno indica que éste es un resultado anómalo, más que un verdadero positivo. Si esta muestra se hubiera ensayado en un ensayo de un solo punto usando una única cantidad fija de antígeno, entonces podría haber aparecido como un resultado "falso positivo". Por lo tanto, estos resultados ilustran la ventaja de la estrategia de curva de titulación para distinguir entre resultados verdaderos y falsos positivos.

50 Las Figuras 9(a) y 9(b) muestran los resultados de dos ensayos de titulación independientes llevados a cabo en muestras de suero de un solo paciente con cáncer de mama invasivo usando una variedad de antígenos diferentes. Este paciente particular muestra autoanticuerpos contra NY-ESO-1, HER2 y BRCA2. Para cada antígeno positivo un resultado de ensayo positivo está indicado por una intensidad de señal creciente a medida que aumenta la concentración de antígeno, es decir, una señal de titulación.

55 Las Figuras 10(a) y 10(b) ilustran la utilidad de la invención para distinguir entre respuestas anti-biotina y "verdaderos" autoanticuerpos contra un antígeno específico (es decir, un marcador tumoral). En estos ensayos se ensayaron muestras de suero de un sujeto humano clínicamente normal para determinar la presencia de autoanticuerpos usando los antígenos biotinilados BRCA2, HER2, c-myc y NY-ESO-1, BRCA1 no biotinilado y productos de expresión de control del vector "vacío" VOL, que codifica la etiqueta de biotina pero ningún antígeno adicional. El individuo ensayado presenta una respuesta de titulación tanto contra antígenos biotinilados como contra el vector vacío VOL, que es realmente biotina solamente, pero ninguna respuesta contra el antígeno no biotinilado BRCA1, indicando que los resultados "positivos" con los marcadores biotinilados se deben de hecho a la presencia

de anticuerpos anti-biotina en este individuo.

### Ejemplo 5 – Análisis de la sensibilidad y especificidad de ensayos de titulación de antígeno en comparación con una medición de un solo punto

Se realizaron mediciones de autoanticuerpos (AAb) en 100 mujeres con cáncer de mama primario (PBC) y 80 mujeres sin pruebas de enfermedad maligna, usando tanto el método de titulación como por medición a una única concentración de antígeno (10 µg/ml). Se muestran a continuación tablas que muestran una comparación directa de los dos métodos:

Tabla 4. Comparación de la sensibilidad del ensayo de AAb de titulación con una medición a una única concentración de antígeno en PBC

Antígeno	Un solo punto	Ensayo de titulación
p53	17,5%	18,9%
c-myc	6,2%	22,9%
NY-ESO-1	24,7%	25,0%
BRCA2	20,6%	31,3%
HER2	23,7%	25,0%
MUC1	18,5%	19,8%
Panel (de 6 Ag)	54,6%	62,2%

Tabla 5. Comparación de la especificidad del ensayo de AAb de titulación con una medición a una única concentración de antígeno en mujeres normales

Antígeno	Un solo punto	Ensayo de titulación
p53	93,8%	97,3%
c-myc	93,8%	94,6%
NY-ESO-1	90,0%	93,3%
BRCA2	90,0%	94,6%
HBR2	91,3%	95,9%
MUC1	92,5%	95,9%
Panel (de 6 Ag)	71,3%	78,4%

Puede observarse que mediante el uso de varios puntos en la curva de titulación de antígeno se obtuvo tanto una mayor sensibilidad como especificidad en comparación con una medición de un solo punto.

### Ejemplo 6 – Razones potenciales para una mayor sensibilidad y especificidad con el ensayo de titulación de antígeno

Sin quedar ligado a teoría particular alguna, el solicitante considera que existen varias razones para la mayor especificidad y sensibilidad observadas en un ensayo en el que se titula el antígeno.

(i) La Figura 11 muestra los resultados de análisis de AAb de suero de un paciente con cáncer de mama primario (PCB) usando los antígenos p53, c-myc y NY-ESO-1 a una concentración variable. Estos resultados demuestran que, en algunos casos, la curva de titulación baja a altos niveles de antígeno (curva de NY-ESO-1). Éste es un fenómeno comúnmente observado en inmunquímica. Si se usara una medición de un solo punto a 10 µg/ml, este paciente se habría clasificado como negativo con respecto a autoanticuerpos de NY-ESO-1, cuando de hecho existe claramente una respuesta positiva.

(ii) La Figura 12 muestra el análisis de suero de un individuo normal, usando también antígeno titulado p53, c-myc y NY-ESO-1. Esta figura demuestra un efecto que los solicitantes han observado en aproximadamente el 10% de los ensayos, en los que el nivel basal de la medición de antígeno (en este caso p53) se desplaza hasta un nivel por encima del del control negativo (VOL). Esto produce una lectura falsamente elevada. Este tipo de resultado es fácilmente identificable con el ensayo de titulación, pero sería invisible en un conjunto de ensayos de un solo punto. Esto daría como resultado una especificidad reducida debido a estos falsos positivos (véase la Tabla 5).

(iii) Como se ha analizado en el Ejemplo 4, los antígenos que se usan en el ensayo de AAb de titulación tienen una etiqueta de biotina que puede usarse en la purificación de la proteína. Sin embargo, se sabe que aproximadamente el 10% de la población produce una respuesta de anticuerpos contra biotina, que es una vitamina. La Figura 13 demuestra una respuesta anti-biotina en un paciente con PBC. Esta respuesta puede identificarse claramente usando la curva de titulación como una respuesta de anticuerpos fuerte contra el control negativo, VOL (que también está biotinilado). Estos individuos deben considerarse no susceptibles de evaluación con el ensayo en este formato. Sin embargo, si se usara un ensayo de un solo punto, los que

responden con anti-biotina no podrían distinguirse de respuestas verdaderas.

### Ejemplo 7 – Demostración de la sensibilidad aumentada de la titulación de antígeno en comparación con la titulación de suero

Se realizaron mediciones de AAb de dos formas en dos experimentos totalmente separados. El primero fue usando el formato convencional en el que la placa se revistió con antígeno en una titulación semilogarítmica desde 10 µg/ml hasta 0,01 µg/ml. Después del bloqueo, se añadió suero a una dilución de 1 en 100. En el segundo, las placas se revistieron con antígeno a una concentración de 3 µg/ml y, después del bloqueo, se añadió suero en un intervalo de titulación semilogarítmico desde una dilución de 1 en 10 hasta de 1 en 10.000. Los métodos para el resto de los ensayos fueron idénticos. Se ensayaron dos combinaciones de suero que se sabía que eran positivas para p53 y c-myc junto con 8 sueros de mujeres con PBC y 10 sueros de individuos normales. Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Sensibilidad de ensayos de AAb que implican titulación de antígeno en comparación con los que implican titulación de suero

PBC	Antígeno p53	Suero p53	Antígeno c-myc	Suero c-myc	Antígeno BRCA2	Suero BRCA2
pS3 positivo	++	+++	++	++	-	-
c-myc positivo	-	-	+	+	-	-
17179	+++	+++	+++	+++	++	+
19451	+	++	-	-	-	-
18237	++	++	++	+	+	-
18489	-	-	-	-	+	-
19510	-	-	-	-	-	-
19190	+	-	-	-	+	++
18610	+	-	+	+	-	-
18458	+	-	+	-	-	-
positividad	70%	40%	60%	50%	40%	20%

Puede observarse que el formato de ensayo que implica la titulación de antígeno es más sensible que el formato que implica la titulación de suero. Las muestras que eran fuertemente positivas se detectaron mediante ambos formatos, sin embargo, los positivos débiles en el ensayo de titulación de antígeno generalmente no se detectaron en el ensayo de titulación de suero.

La menor sensibilidad demostrada por el formato de titulación de suero se debe a la unión inespecífica intrínseca del suero a alta concentración. Esto causa un nivel de unión a las proteínas incluso en muestras normales (véase la Figura 14), que eleva el valor de punto de corte normal, con la reducción subsiguiente en la sensibilidad. La especificidad también se reducía en el formato de titulación de suero (BRCA2 = 90%) en comparación con el formato de titulación de antígeno (BRCA2 = 100%).

La Figura 15 refleja los experimentos mostrados en la Figura 4, pero con suero de un paciente con cáncer de mama primario. Se descubrió que el paciente era positivo para autoanticuerpos contra p53 y c-myc, pero negativo para autoanticuerpos contra BRCA2 cuando se usaba el método de titulación de antígeno de la invención. Sin embargo, cuando los autoanticuerpos se midieron dentro de un intervalo de titulación de suero, no se detectaron autoanticuerpos (véase la Tabla 6). Esto es debido a la unión inespecífica presentada por el suero a altas concentraciones (demostrada por el alto nivel de unión a la proteína de control negativo (VOL)) que enmascara las señales debidas a la unión específica de autoanticuerpos. La consecuencia es que con la dilución de suero el ensayo podía designar a un paciente con cáncer de mama primario negativo. Puesto que la sensibilidad = verdaderos positivos/verdaderos positivos + falsos negativos, esto tiene el efecto de aumentar el denominador y, por lo tanto, disminuir la sensibilidad.

En resumen, los solicitantes han demostrado que los ensayos de autoanticuerpos de titulación de antígeno son más sensibles y específicos que medir la reactividad de autoanticuerpos a una única concentración de antígeno. Esto es porque la titulación de antígeno proporciona el ámbito para detectar tanto anticuerpos poco abundantes de baja afinidad a altas concentraciones de antígeno, como también anticuerpos muy abundantes que de otro modo se engancharían a alta concentración de antígeno pero que se unirían al máximo más abajo en la curva de titulación. También permite la discriminación de ensayos no evaluables de resultados verdaderos, lo que no es posible con una medición de un solo punto. Se cree que los ensayos de AAb de titulación de antígeno son más sensibles que la simple titulación de suero ya que el alto nivel de unión inespecífica observada con suero a alta concentración aumenta los niveles de punto de corte normales, disminuyendo por lo tanto la sensibilidad.

50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de detección de un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en el que dicho anticuerpo está dirigido contra una sustancia extraña introducida en dicho sujeto mamífero, comprendiendo el método:
- 10 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,  
(b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno a cada concentración de antígeno diferente usada, y  
(c) representar o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno usada en la etapa (a), en el que la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el ensayo está indicada por una curva generalmente sigmoidea o en forma de S.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la detección de la presencia de dicho anticuerpo está basada en los valores colectivos de la cantidad de unión específica para todas las concentraciones de antígeno ensayadas.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el sujeto mamífero es un ser humano.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sustancia extraña es un agente terapéutico.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el agente terapéutico es un fármaco, profármaco o terapia de anticuerpos.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sustancia extraña es una vacuna.
- 30 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en el que la sustancia extraña es una porción no diana de un agente terapéutico o vacuna.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la porción no diana es biotina.
- 35 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la sustancia extraña es un agente infeccioso tal como un hongo, bacteria, virus o parásito.

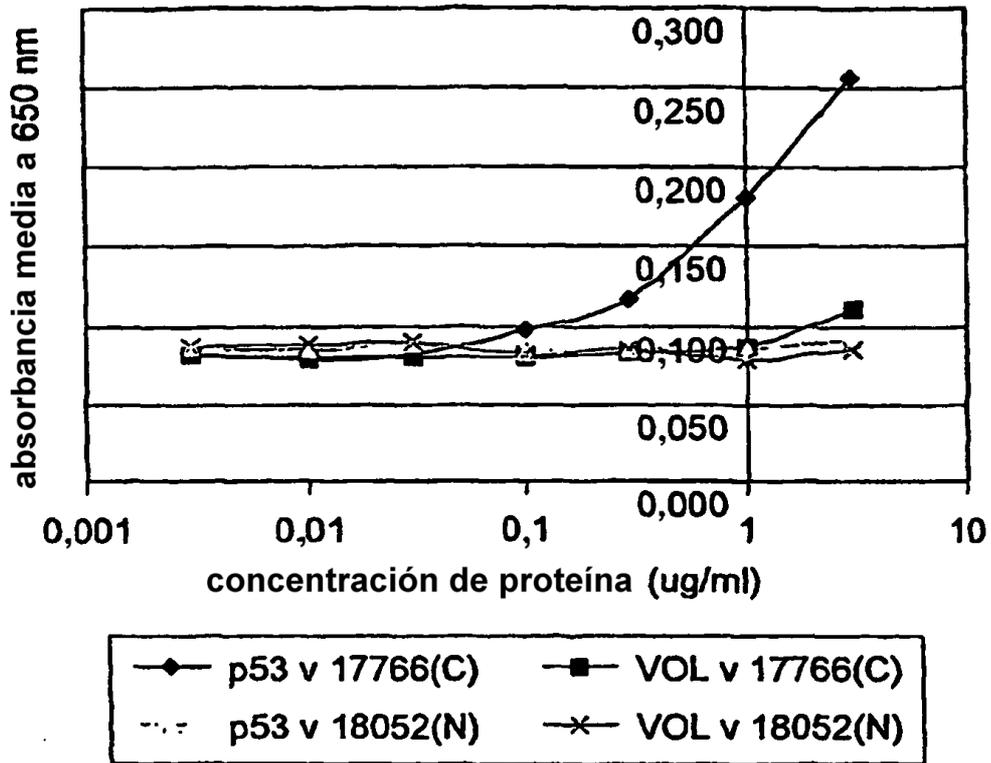


FIG. 1

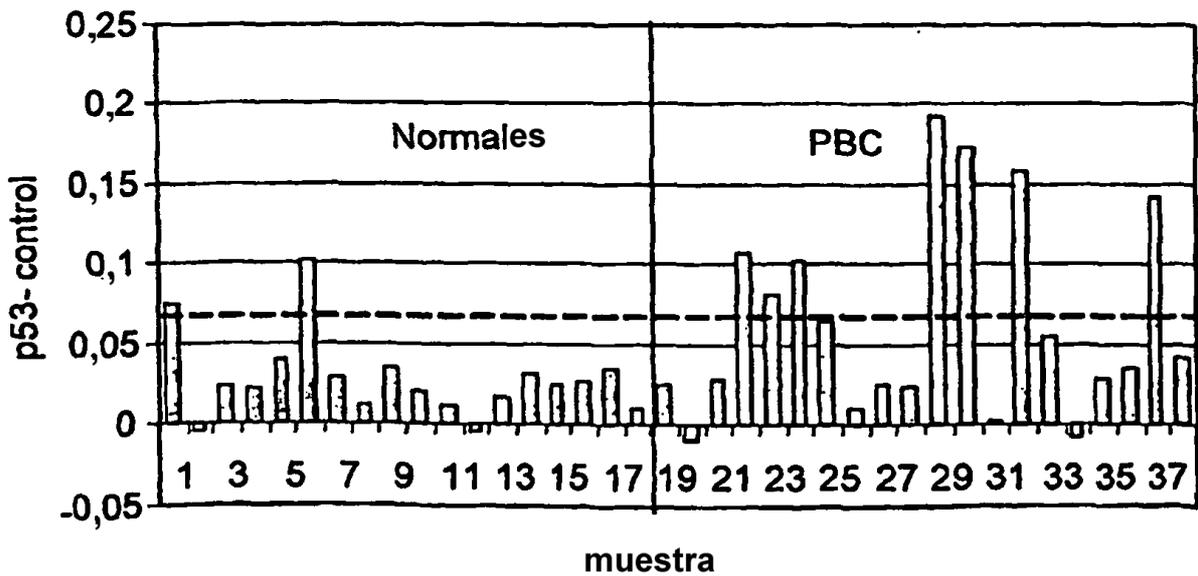
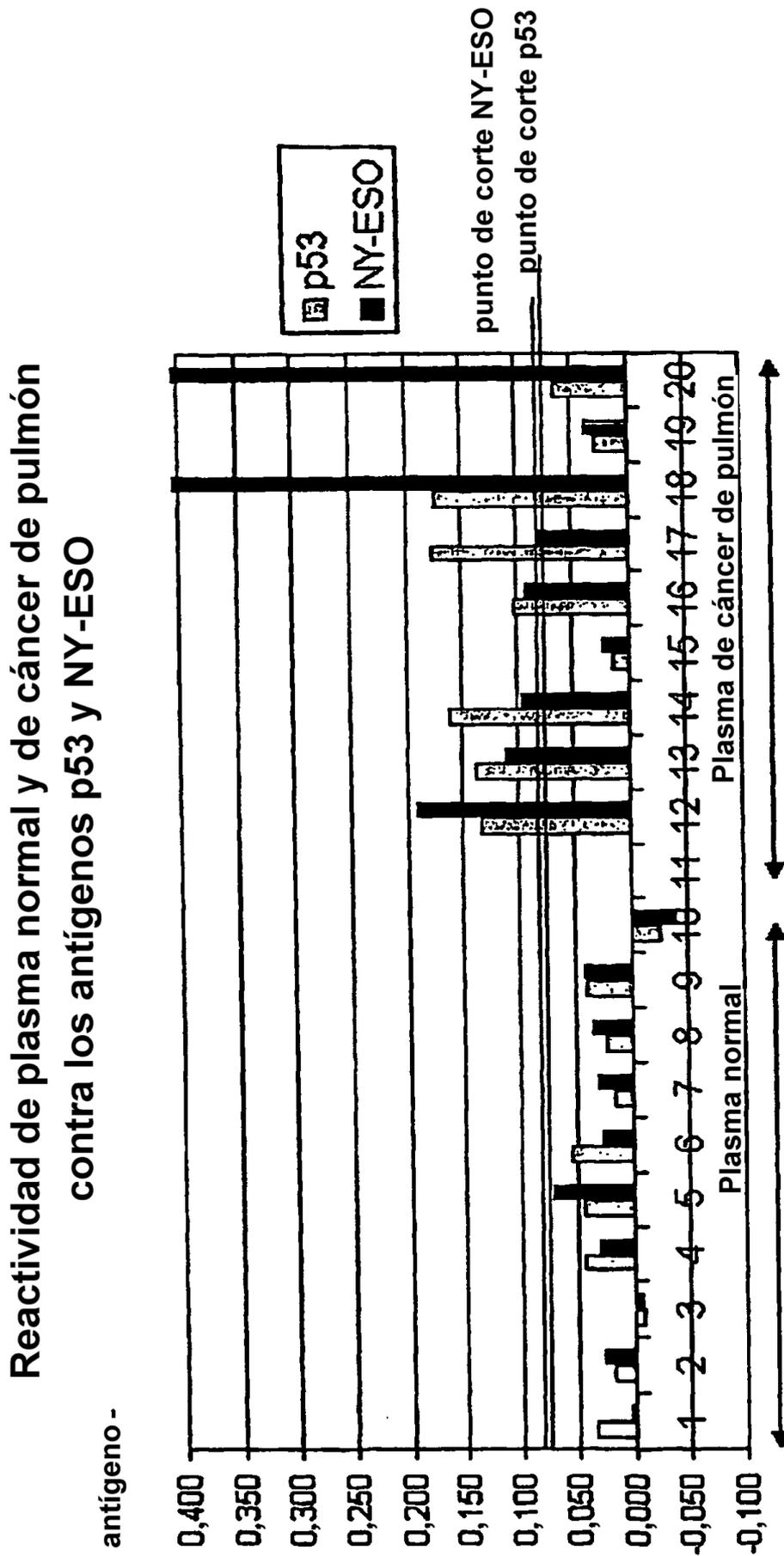
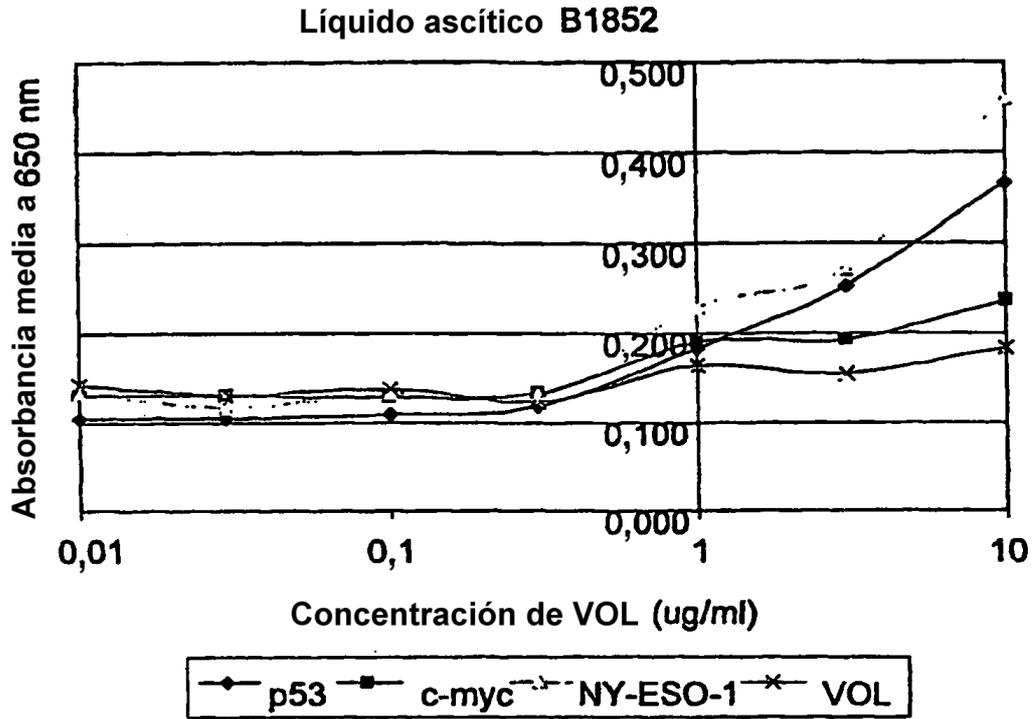


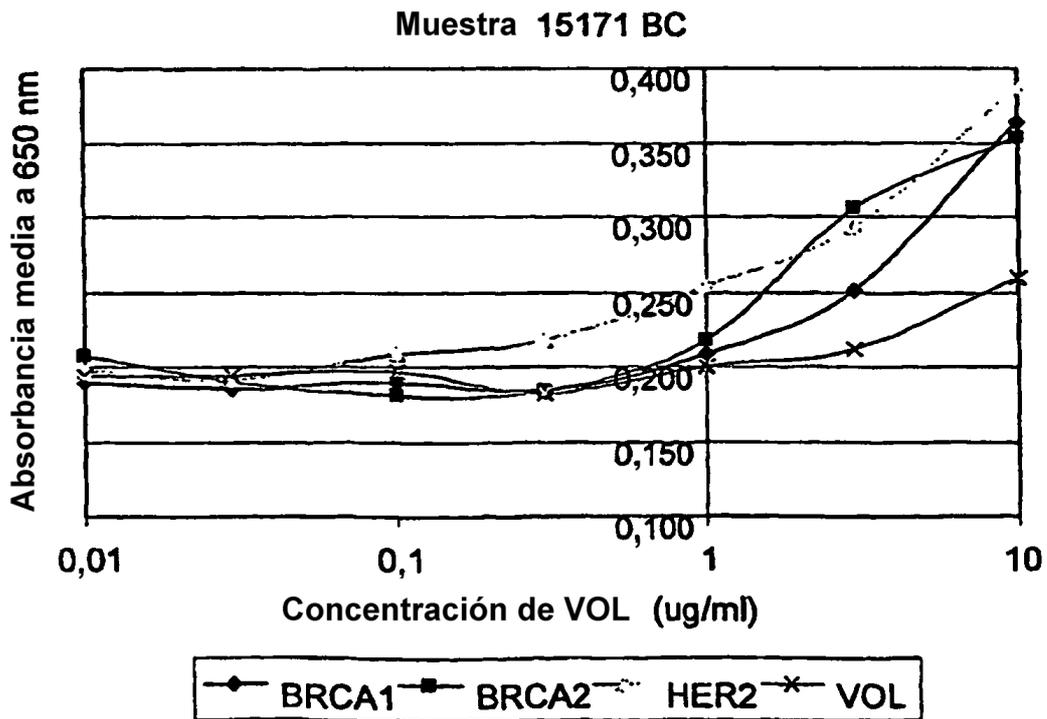
FIG. 2



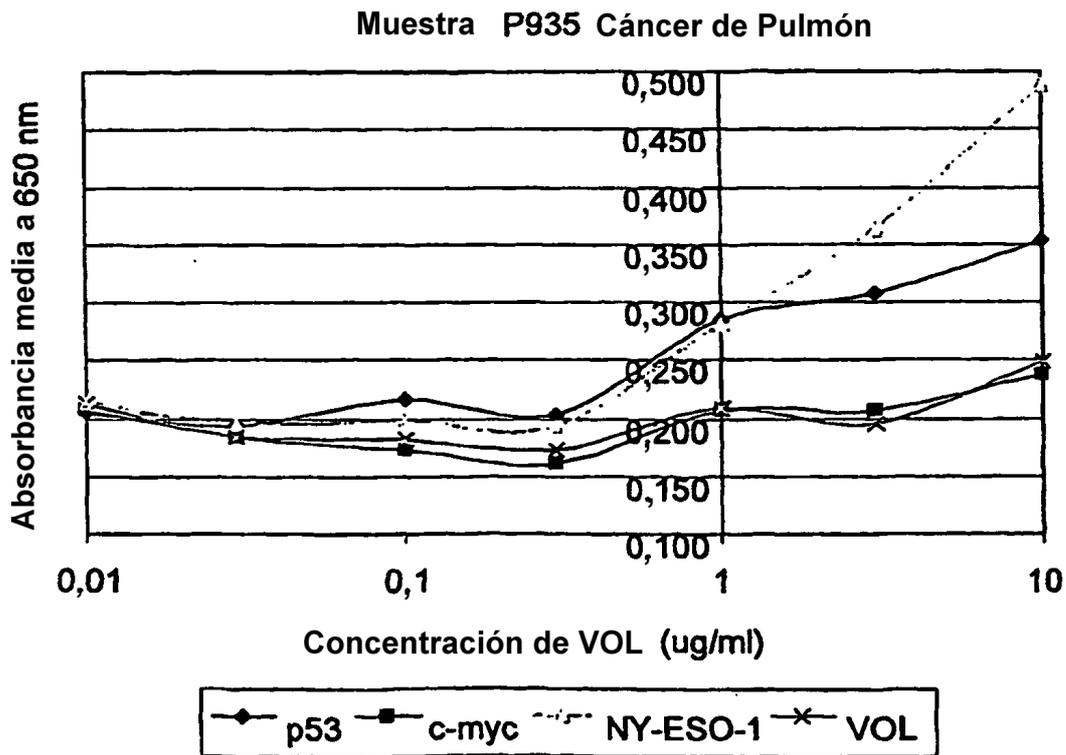
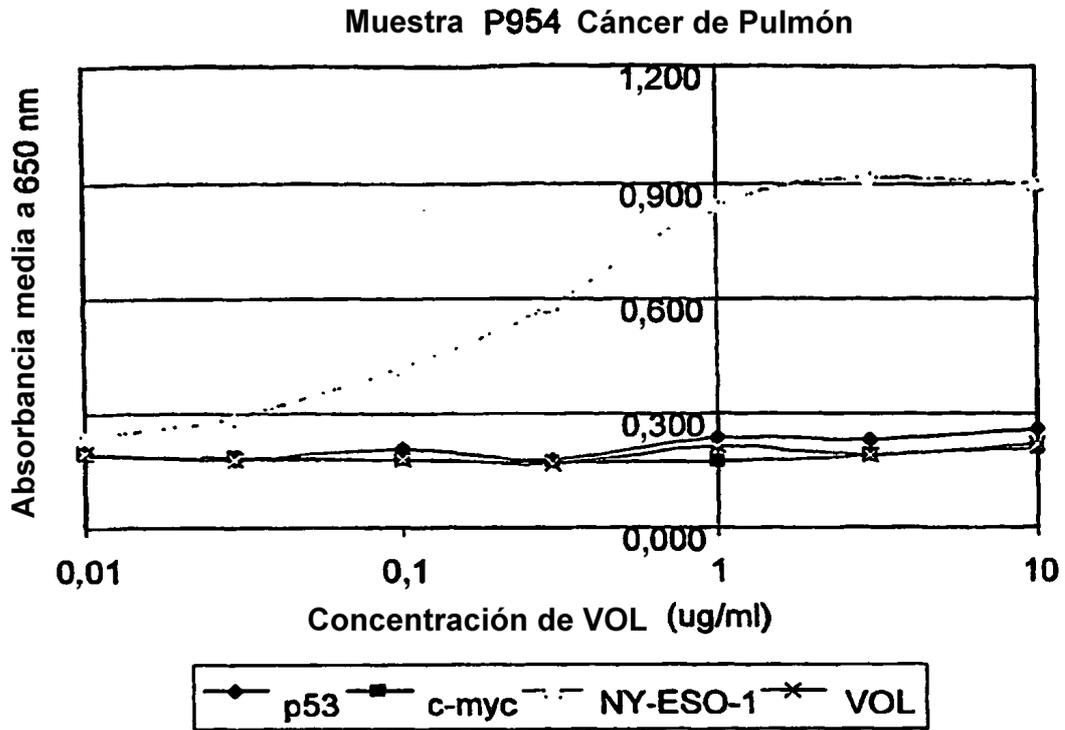
**FIG. 3**

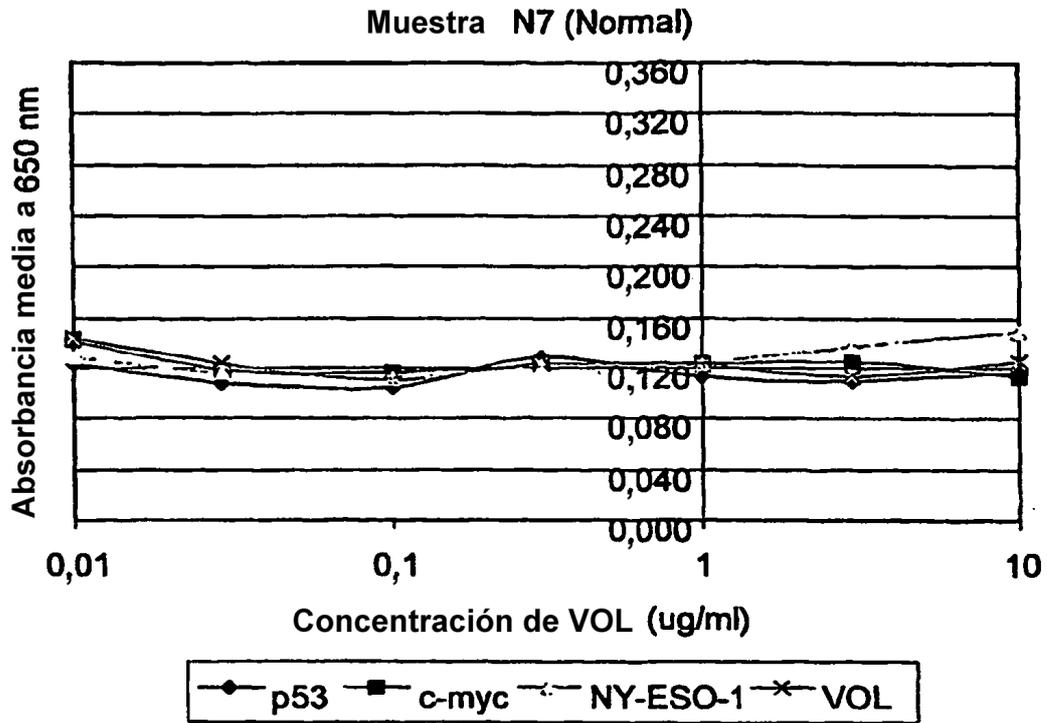


**FIG. 4**

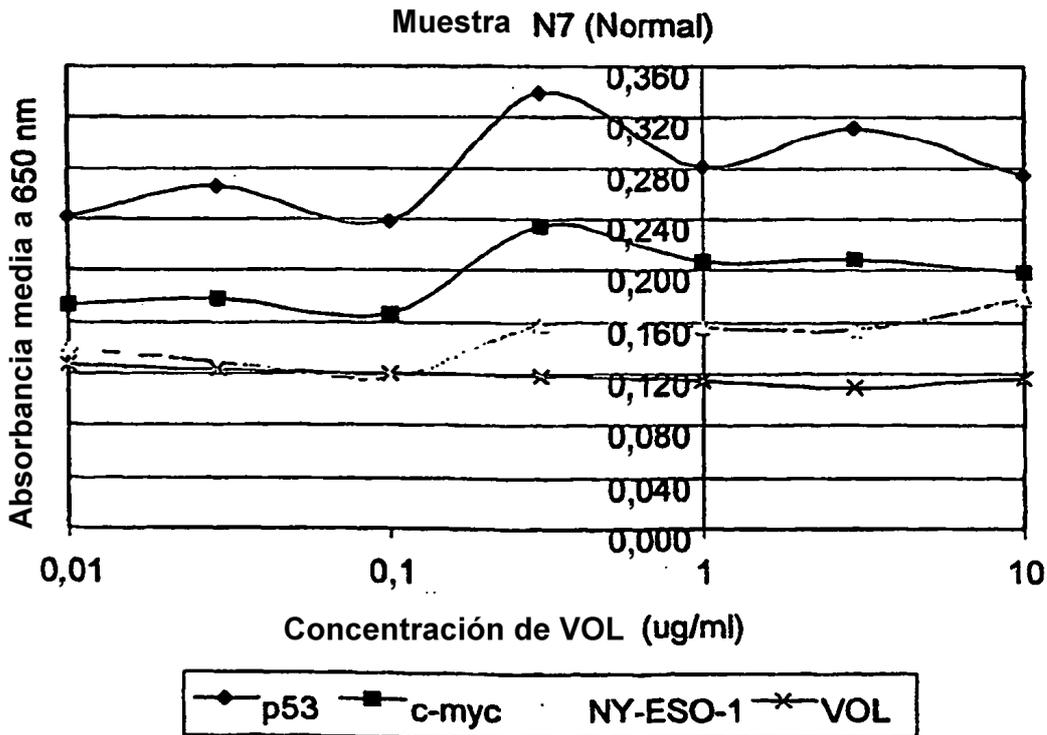


**FIG. 5**

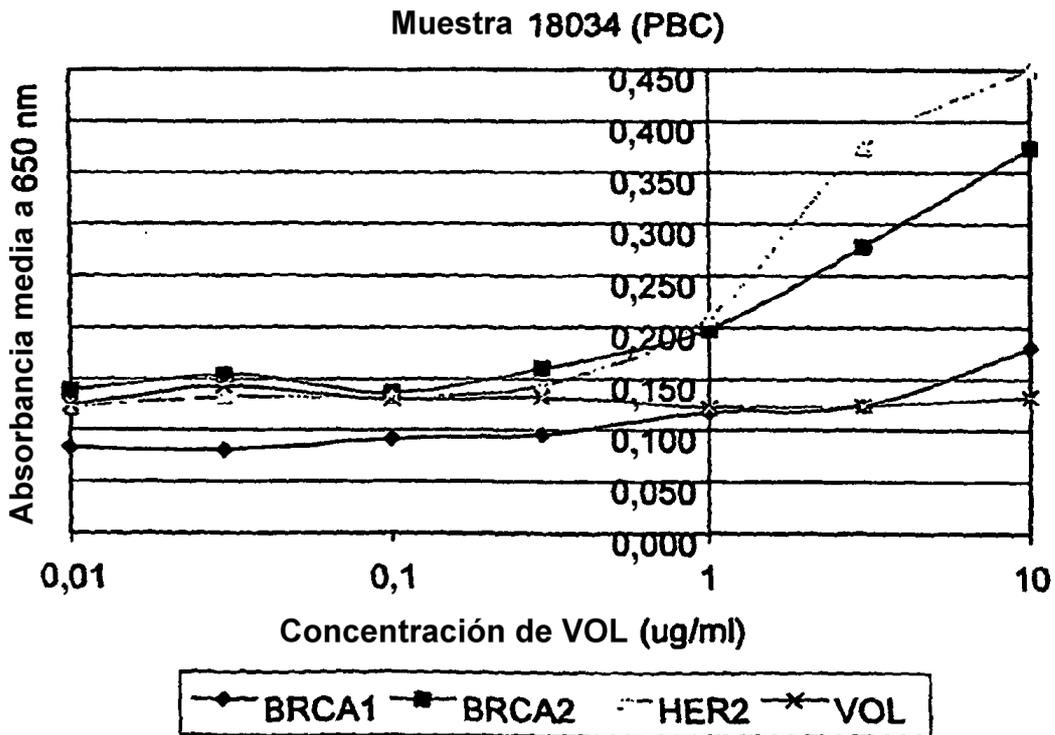
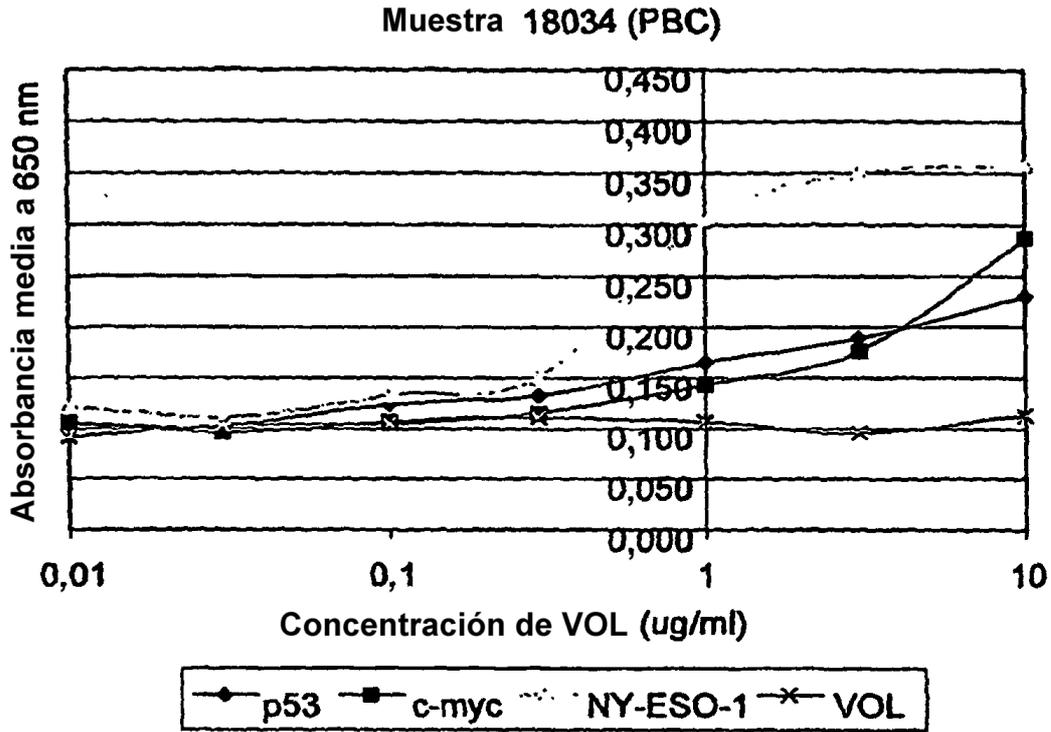


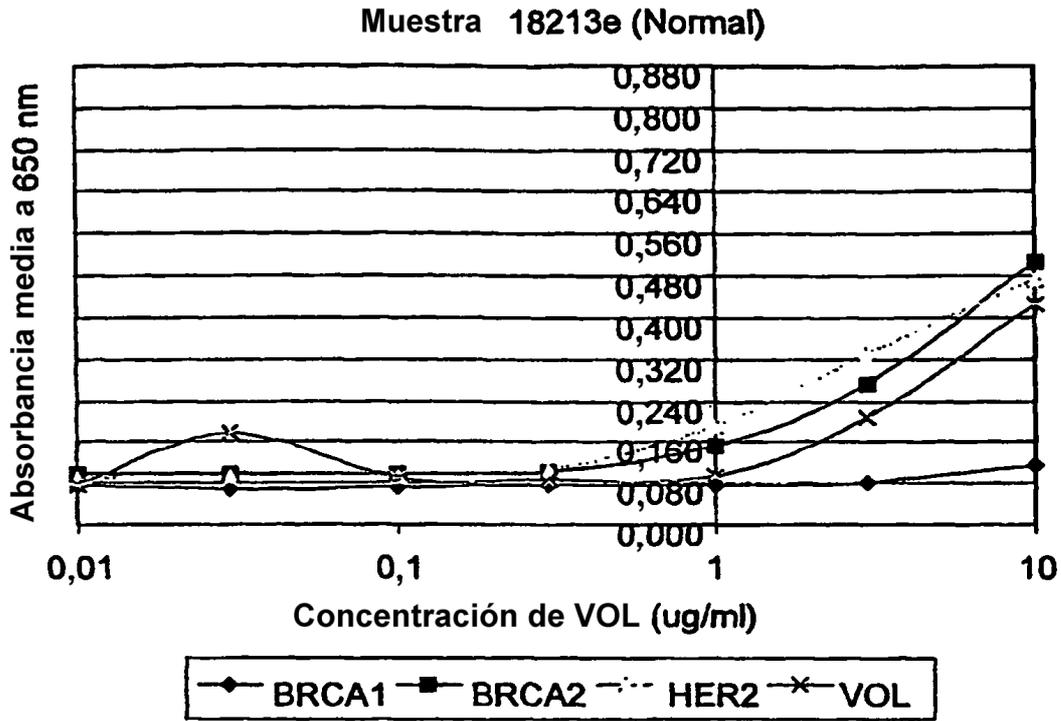


**FIG. 8a**

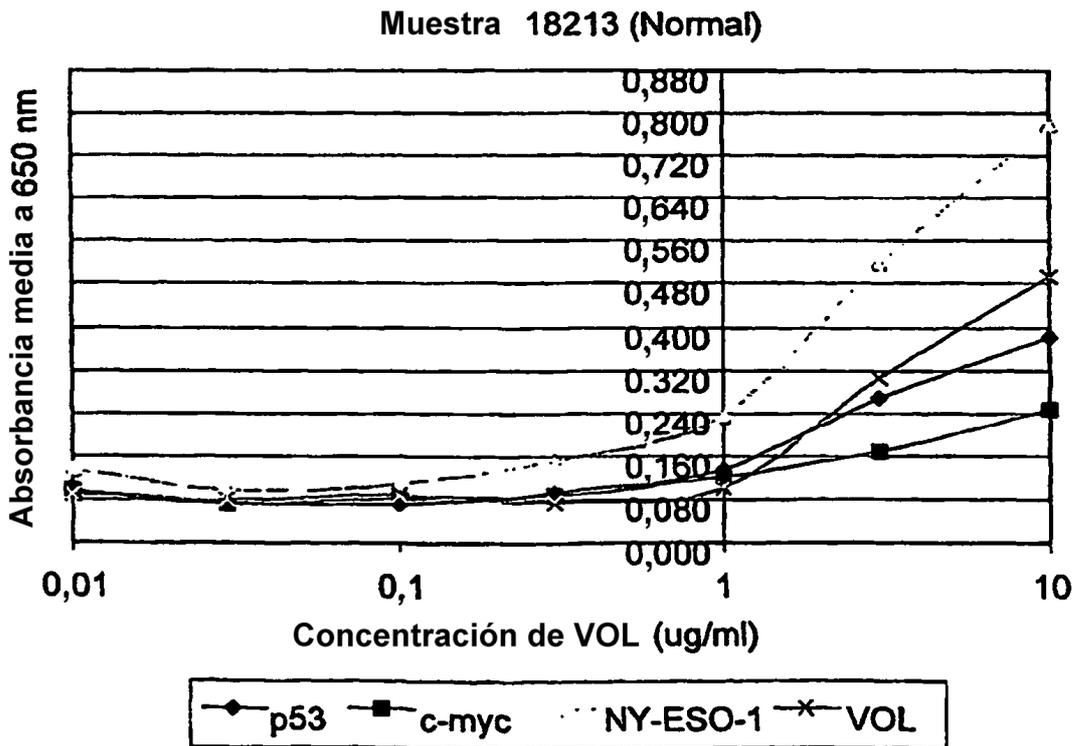


**FIG. 8b**

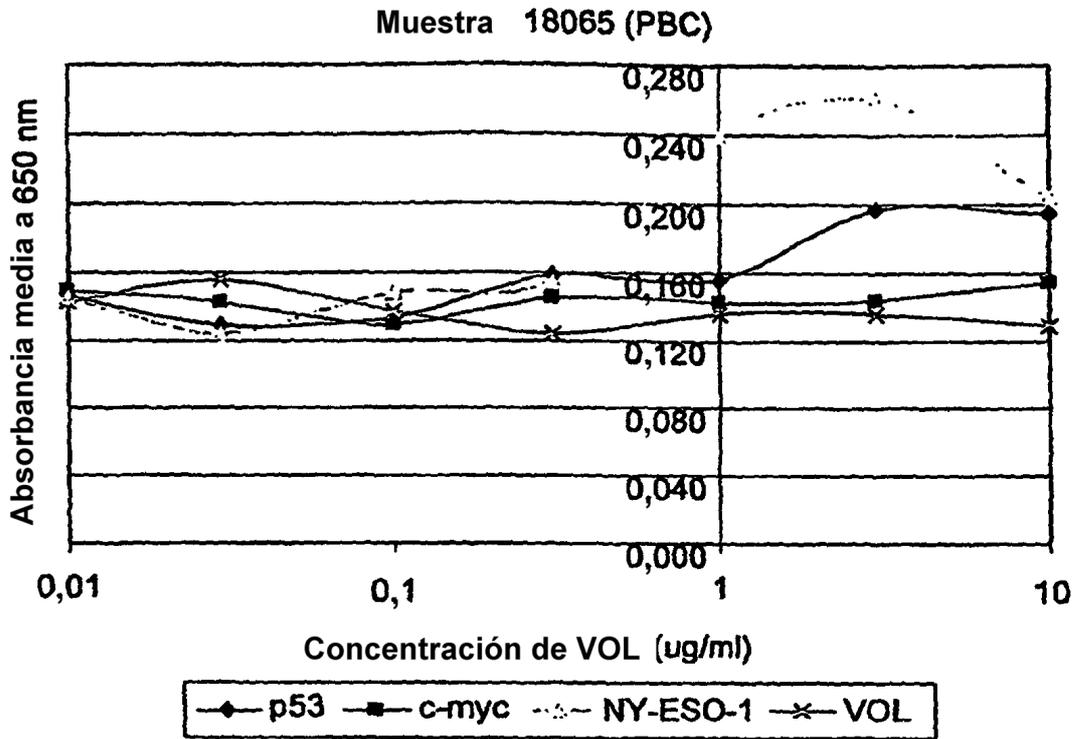




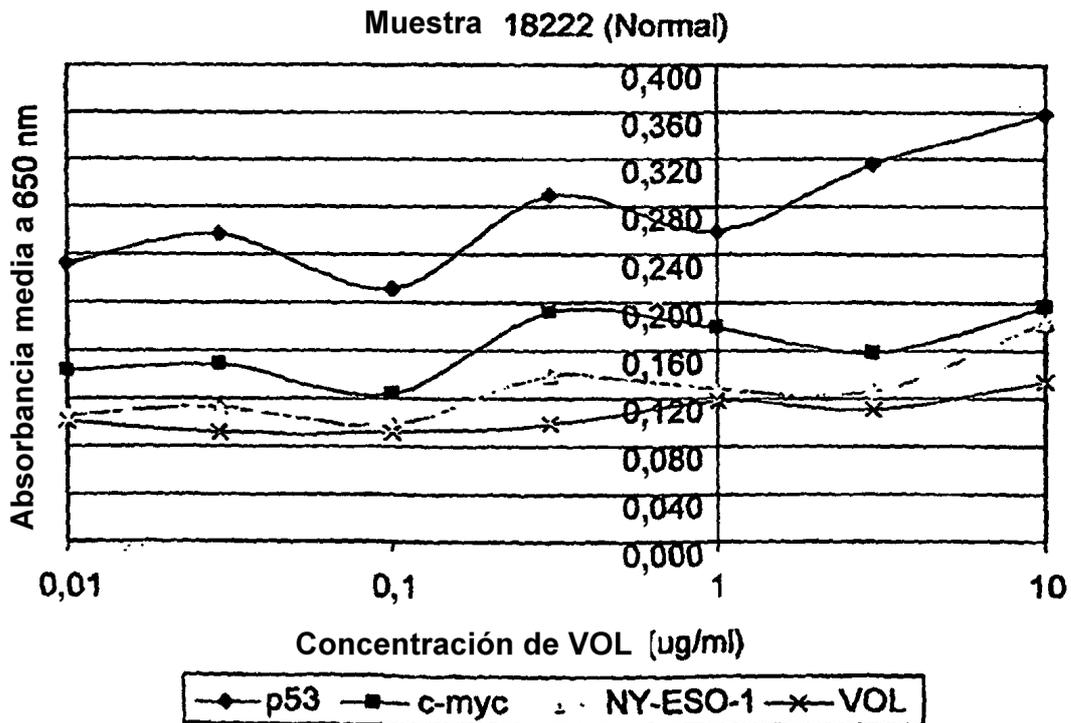
**FIG. 10a**



**FIG. 10b**



**FIG. 11**



**FIG. 12**

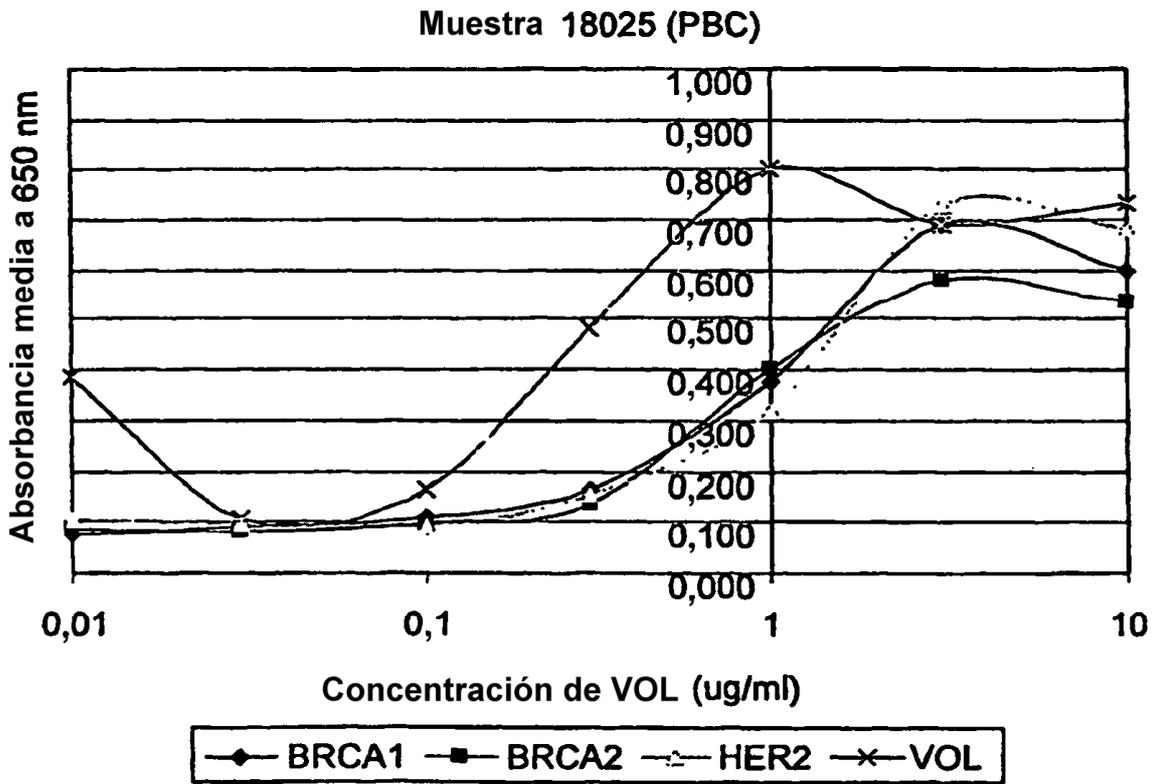
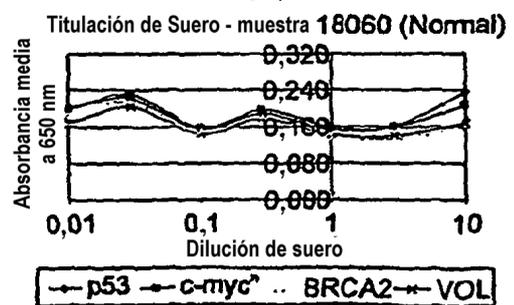
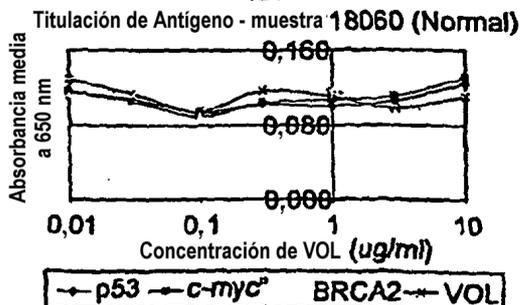
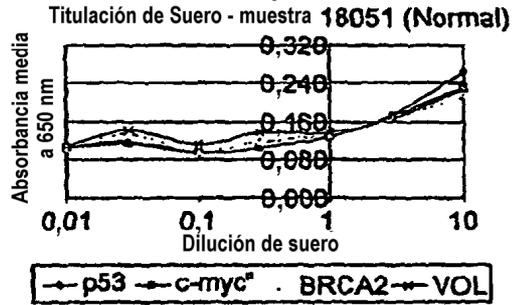
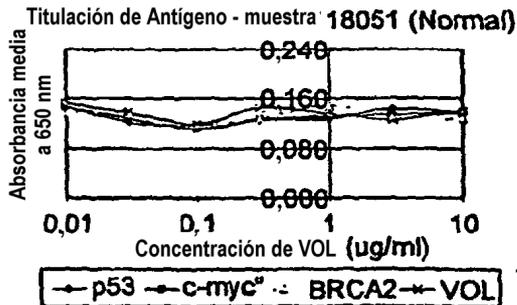
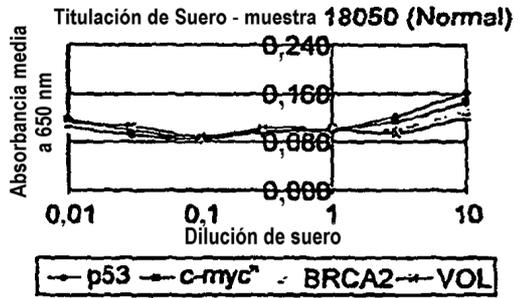
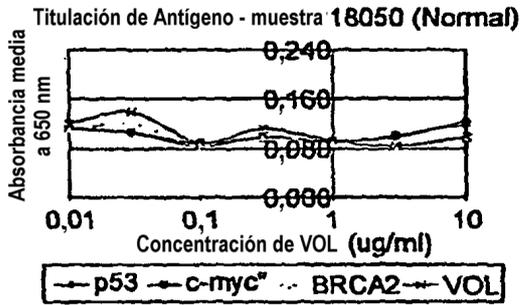
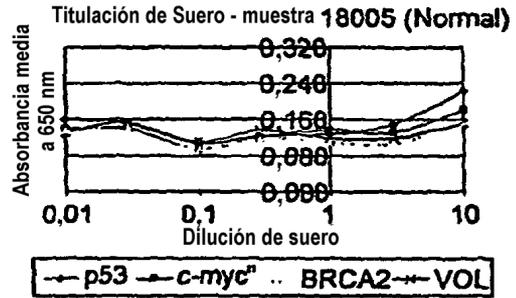
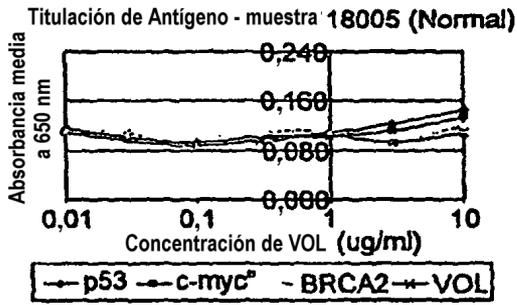
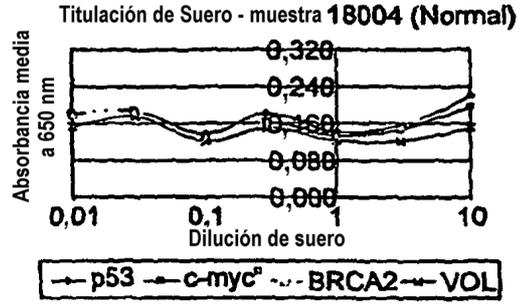
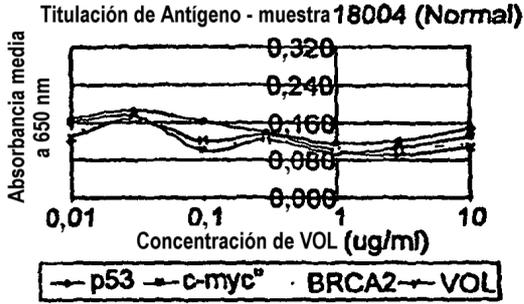
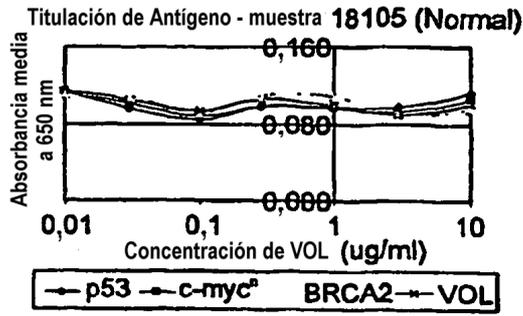


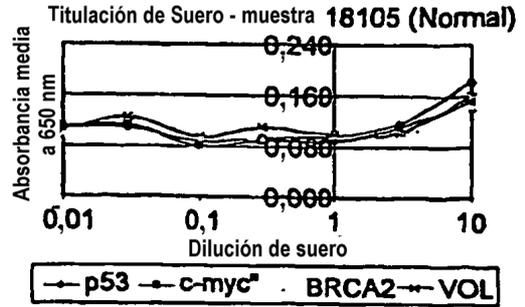
FIG. 13



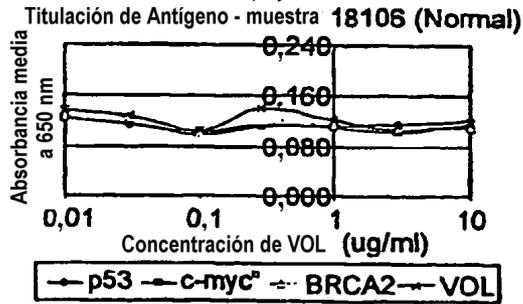
**FIG. 14**



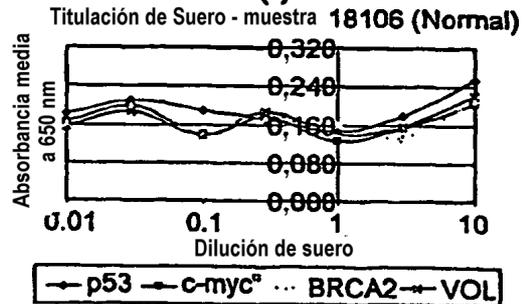
(k)



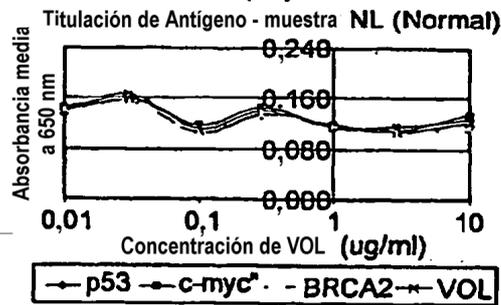
(l)



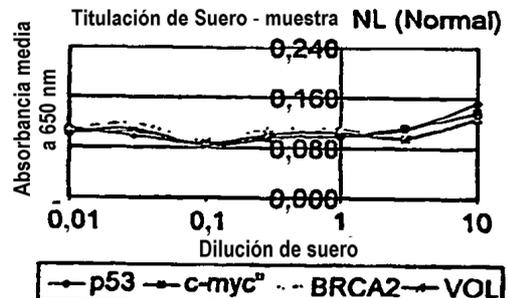
(m)



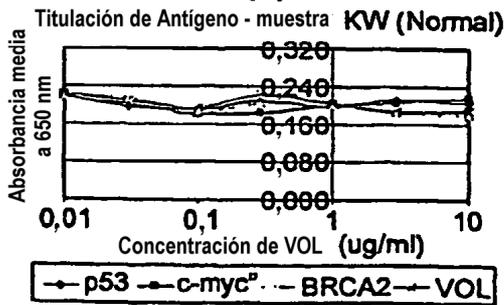
(n)



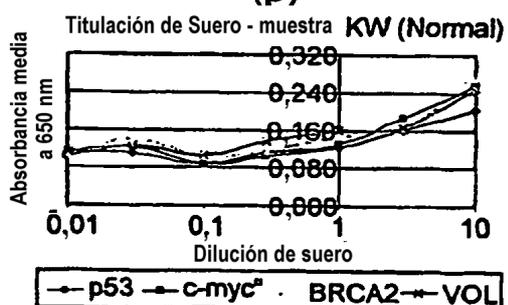
(o)



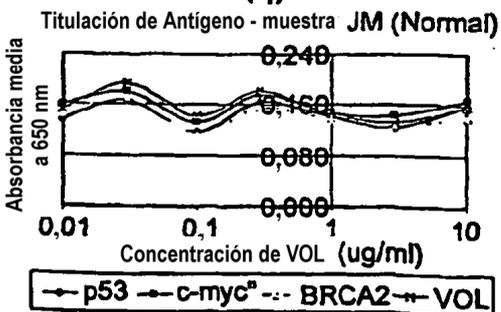
(p)



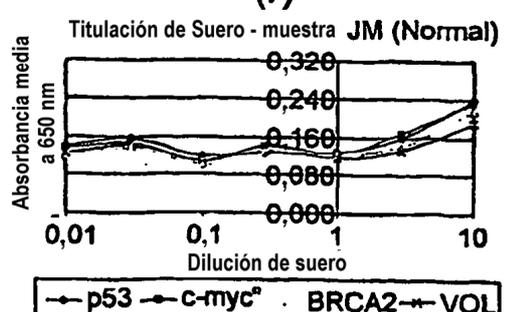
(q)



(r)

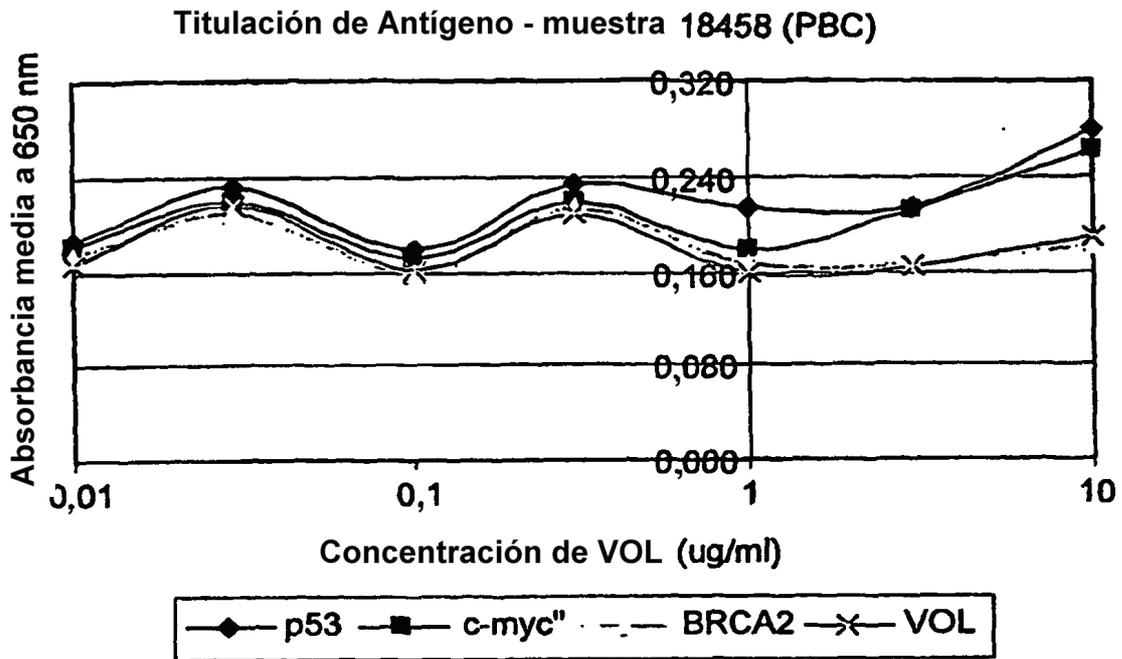


(s)

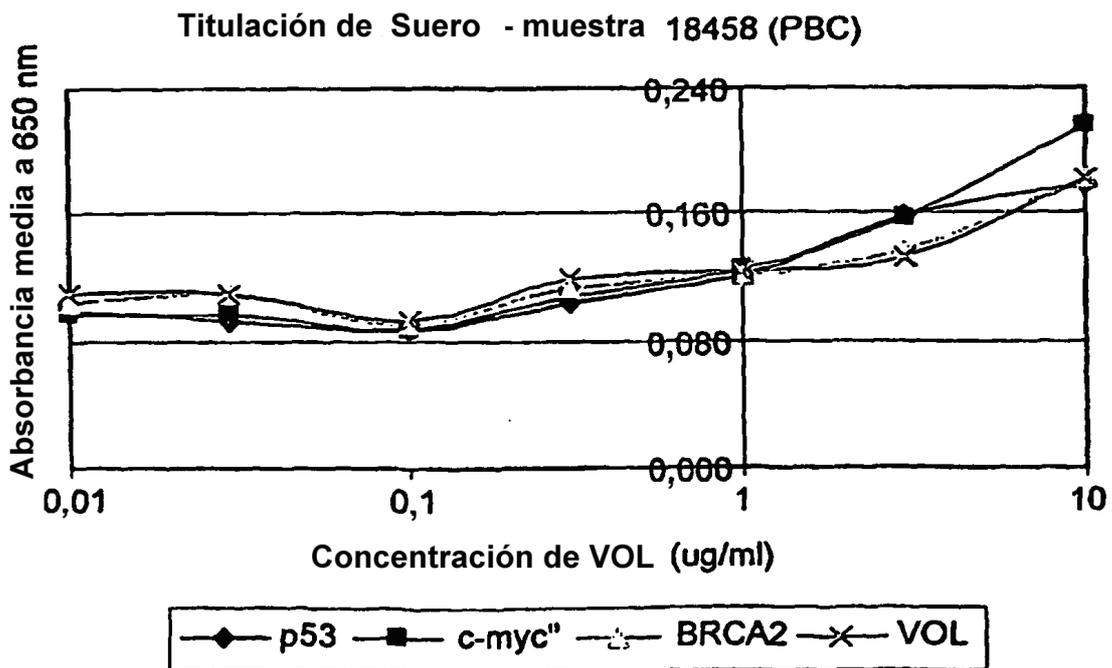


(t)

FIG. 14 CONT



**FIG. 15a**



**FIG. 15b**