

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 979**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/557** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2007 E 07804276 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 2062053**

54 Título: **Métodos de inmunoanálisis mejorados**

30 Prioridad:

**13.09.2006 US 844158 P**

**13.09.2006 GB 0618055**

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

**12.03.2013**

73 Titular/es:

**ONCIMMUNE LTD (100.0%)  
CLINICAL SCIENCES BUILDING, CITY HOSPITAL  
HUCKNALL ROAD  
NOTTINGHAM NOTTINGHAMSHIRE NG5, GB**

72 Inventor/es:

**ROBERTSON, JOHN FORSYTH RUSSELL;  
MURRAY, ANDREA;  
CHAPMAN, CAROLINE y  
BARNES, TONY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 397 979 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 Inmunoanálisis Mejorados

**Campo de la invención**

La invención se refiere en general al campo de los análisis de diagnóstico o pronóstico y, en particular, se refiere a análisis para la detección de anticuerpos en una muestra que comprende un fluido corporal de un paciente, en donde dichos anticuerpos se utilizan como marcadores biológicos de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad.

**Antecedentes de la invención**

Muchos análisis de diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento dependen de la detección de un marcador biológico de una enfermedad concreta o susceptibilidad a la enfermedad. Tales marcadores biológicos son comúnmente proteínas o polipéptidos que son característicos de una enfermedad concreta o están asociados con la susceptibilidad a la enfermedad.

En los últimos años se ha hecho evidente que los anticuerpos, y, en particular, los autoanticuerpos, también pueden servir como marcadores biológicos de la enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad. Los autoanticuerpos son anticuerpos de origen natural dirigidos contra un antígeno que el sistema inmunitario de un individuo reconoce como foráneo incluso aunque ese antígeno se origine realmente en el individuo. Pueden estar presentes en la circulación como autoanticuerpos circulantes libres o en forma de complejos inmunitarios circulantes que consisten en autoanticuerpos unidos a su antígeno diana. Las diferencias entre una proteína de tipo salvaje expresada por células "normales" y una forma alterada de la proteína producida por una célula enferma o durante un proceso de enfermedad puede, en algunos casos, conducir a que la proteína alterada sea reconocida por el sistema inmunitario de un individuo como "no propia" y provocar de ese modo una respuesta inmunitaria en ese individuo. Esto puede ser una respuesta inmunitaria humoral (es decir, mediada por células B) que conduce 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 se basan en la evaluación de la respuesta inmunitaria de un individuo a dos o más marcadores tumorales diferentes. Estos métodos generalmente implican poner en contacto una muestra de fluido corporal tomada del individuo con un panel de dos o más antígenos marcadores de tumores distintos, cada uno derivado de una proteína marcadora de tumoreses diferente, y detectar la formación de complejos de los antígenos marcadores de tumores unidos a autoanticuerpos circulantes inmunológicamente específicos de las proteínas marcadoras de tumoreses. La presencia de dichos autoanticuerpos circulantes se considera una indicación de la presencia de cáncer.

Los análisis que miden la respuesta inmunitaria del individuo a la presencia de proteína marcadora de tumoreses en términos de producción de autoanticuerpos proporcionan una alternativa a la medición directa o detección de proteínas marcadoras de tumoreses en fluidos corporales. Tales análisis constituyen esencialmente una detección indirecta de la presencia de proteína marcadora de tumoreses. Debido a la naturaleza de la respuesta inmunitaria, es probable que los autoanticuerpos puedan ser producidos por una cantidad muy pequeña de proteína marcadora de tumoreses circulante y los métodos indirectos que se basan en la detección de la respuesta inmunitaria a marcadores tumorales por consiguiente serán más sensibles que los métodos para la medición directa de marcadores tumorales en fluidos corporales. Los métodos de análisis basados en la detección de autoanticuerpos por lo tanto pueden ser particularmente valiosos en el proceso temprano de la enfermedad y posiblemente también en relación con el escrutinio de pacientes asintomáticos, por ejemplo en el escrutinio para identificar individuos "en riesgo" de desarrollar enfermedad entre una población de individuos asintomáticos o para identificar a los individuos que han desarrollado una enfermedad en una población de individuos asintomáticos. Además, los métodos de análisis basados en la detección de autoanticuerpos pueden tener un valor particular en el proceso temprano de la enfermedad y posiblemente también se pueden usar para identificar individuos que han desarrollado una enfermedad en una población de individuos sintomáticos. Además, pueden ser útiles para la detección temprana de enfermedades recurrentes. Los métodos de análisis también pueden ser valiosos en la selección o seguimiento de terapias para una enfermedad.

Los anticuerpos y autoanticuerpos también pueden servir como marcadores biológicos de otros estados de enfermedad o susceptibilidades a enfermedades, de las cuales la artritis reumatoide, el lupus eritematoso generalizado (LEG), la cirrosis biliar primaria (CBP), la tiroiditis autoinmune (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto), la gastritis autoinmune (por ejemplo, anemia perniciosa), la adrenalitis autoinmune (por ejemplo, enfermedad de Addison), el hipoparatiroidismo autoinmune, la diabetes autoinmune (por ejemplo, diabetes de Tipo 1), la miastenia grave no son más que ejemplos.

Los autores de la presente invención han reconocido que cuando los análisis basados en la detección de anticuerpos se utilizan para evaluar diagnósticamente o pronósticamente el estado de la enfermedad, la progresión

de la enfermedad o la susceptibilidad a la enfermedad de un individuo en una población, pueden surgir dificultades en la elaboración de una metodología de análisis normalizada apropiada para toda la población de sujetos que va a ser sometida a escrutinio debido a que las cantidades absolutas de anticuerpo presente varían considerablemente de un individuo a otro. Esto puede producir una alta incidencia de resultados falsos negativos, por ejemplo, entre individuos que tienen una baja cantidad de anticuerpo. Del mismo modo, existe una dificultad en la puntuación de resultados positivos verdaderos debido a que la variación de las cantidades absolutas de anticuerpo de un individuo a otro significa que es difícil fijar un umbral para un resultado de análisis positivo que sea apropiado para todos los individuos dentro de la población escrutada.

Los autores de la presente invención han determinado que el rendimiento y más específicamente la utilidad clínica y la fiabilidad de los análisis basados en la detección de anticuerpos, en particular los autoanticuerpos, como marcadores biológicos de la enfermedad se pueden mejorar drásticamente mediante la inclusión de una etapa de titulación del antígeno. Al someter a ensayo la muestra que se sospecha que contiene anticuerpos contra una serie de cantidades diferentes de antígeno y construir una curva de titulación es posible identificar fiablemente resultados de escrutinio positivos verdaderos independientemente de la cantidad absoluta de anticuerpo presente en la muestra. Este enfoque es contrario a los métodos de la técnica anterior que titulan meramente el antígeno para construir una curva de calibración para permitir la identificación de la concentración de antígeno más apropiada para ser utilizada para la detección de anticuerpos en muestras de pacientes reales. En estos métodos sólo se propone una medición de punto único para el diagnóstico real. Por lo tanto, estos métodos no permitirán la variación de cantidades del anticuerpo que se va a detectar de individuo a individuo que dan como resultado la incidencia de falsos positivos y falsos negativos. Los autores de la presente invención han encontrado que los métodos de análisis basados en la titulación del antígeno exhiben una mayor especificidad y sensibilidad que la medición de la reactividad de autoanticuerpos a una única concentración de antígeno.

Los autores de la presente invención han determinado adicionalmente que los métodos de análisis que combinan la titulación del antígeno con la titulación simultánea de la muestra de ensayo ofrecen aún más ventajas que los métodos basados solo en la titulación del antígeno, en particular en el contexto de la detección de autoanticuerpos. Estos denominados métodos de "titulación cruzada" constituyen el objeto de la presente invención.

### Resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar un estado de enfermedad o la susceptibilidad a la enfermedad en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método detectar un anticuerpo en una muestra de ensayo desconocida, en donde la muestra de ensayo comprende un fluido corporal de dicho sujeto mamífero y en donde dicho anticuerpo es un marcador biológico de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, cuyo método comprende:

1. (a) preparar dos o más diluciones diferentes de dicha muestra de ensayo y llevar a cabo las siguientes etapas (i) y (ii) con respecto a cada dilución de la muestra de ensayo:
  1. (i) poner en contacto la dilución de la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,
  2. (ii) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada cantidad de antígeno usado en la etapa (i),
2. (b) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo utilizado en la etapa (a), y
3. (c) determinar la presencia o ausencia de dicho estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad basándose en la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo y la cantidad de antígeno sometidos a ensayo, en donde un resultado positivo para determinar la presencia del anticuerpo en la muestra de ensayo se puntúa mediante la comparación con un resultado de corte obtenido a partir de un grupo control de sujetos normales.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero donde dicho anticuerpo es un marcador biológico de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, cuyo método comprende:

1. (a) preparar dos o más diluciones diferentes de la muestra de ensayo y dicho llevar a cabo las siguientes etapas (i) y (ii) con respecto a cada dilución de la muestra de ensayo:
  1. (i) poner en contacto la dilución de la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,
  2. (ii) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada cantidad de antígeno usado en la etapa (i),
2. (b) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en la etapa (a), en donde la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el análisis está indicada por una curva

generalmente en forma de S o sigmoidea para al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en donde dicho anticuerpo está dirigido a una sustancia extraña introducida en dicho sujeto mamífero, comprendiendo el método:

(Cuyo método comprende:

(a) preparar dos o más diluciones diferentes de dicha muestra de ensayo y llevar a cabo las siguientes etapas (i) y (ii) con respecto a cada dilución de la muestra de ensayo:

1. (i) poner en contacto la dilución de la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,
2. (ii) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada cantidad de antígeno usado en la etapa (i),

(b) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en la etapa (a), y en donde la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el análisis está indicada por una curva generalmente en forma de S o sigmoidea para al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo.

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

En todos los aspectos de la invención, el anticuerpo puede ser un autoanticuerpo.

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

En todos los aspectos de la invención, la etapa (a) del análisis implicará poner en contacto preferiblemente todas y cada una de las diluciones de la muestra de ensayo con todas y cada una de las cantidades de antígeno utilizado en el análisis, de tal manera que se sometan a ensayo todas las posibles combinaciones de diluciones de la muestra de ensayo y las cantidades de antígeno.

Una característica concreta de la invención en todos sus aspectos es que el criterio para determinar si el anticuerpo relevante está o no está presente en la muestra de ensayo se basa en la cantidad de unión específica observada en todas y cada una de las diferentes combinaciones de diluciones de la muestra de ensayo y concentraciones de antígeno sometidas a ensayo, en otras palabras los valores colectivos, en lugar de sólo una lectura a una única concentración de antígeno o para una única dilución de la muestra de ensayo. Así, la determinación de la presencia o ausencia de estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad o anticuerpos para una sustancia extraña en una muestra de paciente puede seguir estando basada directamente en estos valores colectivos. En una realización, se realiza la valoración sobre la base de la presencia de una curva generalmente en forma de S o sigmoidea cuando la cantidad de unión específica se representa frente a la cantidad de antígeno durante al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo. Como resultará evidente a partir de los Ejemplos de la presente invención, los autores de la presente invención han observado que los métodos de la invención tienen una sensibilidad más alta con una especificidad equivalente al menos a los métodos de diagnóstico o detección basados en la titulación del antígeno solo y reducen la incidencia de determinaciones falsas positivas y falsas negativas.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente.

En los pasajes siguientes se definen características diferentes de los diversos aspectos de la invención con mayor detalle. Cada característica definida de ese modo en relación con un aspecto de la invención se puede combinar con las características descritas en relación con cualquier otro aspecto de la invención a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas a menos que se indique claramente lo contrario.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra una serie de curvas de titulación cruzada para la detección de autoanticuerpos contra p53 (Fig. 1 a a d) y c-myc (Fig.1 e a h) en las muestras de suero tomadas de pacientes con cáncer de mama. En cada experimento, se sometieron a ensayo por separado seis diluciones diferentes del suero del paciente para la unión específica contra una serie de titulación de cantidades variables de antígeno p53 o c-myc recombinantes (la dilución de suero 1/10.000 es efectivamente un control "sin suero"). Para cada antígeno, se

trazaron curvas separadas de la unión específica (expresada como absorbancia a 650 nm) frente a la concentración de antígeno para cada dilución del suero del paciente.

La Figura 2 ilustra un ejemplo de un diseño de placa de titulación utilizado para realizar análisis de Suero y Concentración de Antígeno Óptimos (OSAAC) según el ejemplo 3. Nota - las diluciones de suero y antígeno se muestran en placas separadas, mientras que en la práctica las diluciones de suero y antígeno se añaden a los pocillos correspondientes de la misma placa única.

Las Figuras 3 a 7 muestran una serie de curvas de titulación cruzada para la detección de autoanticuerpos contra p53, ECD6 (también conocido como dominio extracelular de HER2) y un fragmento 3' de ECD6 en muestras de suero tomadas de pacientes con cáncer de mama primario y sujetos de control normales. En cada experimento, se sometieron a ensayo por separado seis diluciones diferentes del suero del paciente para la unión específica contra una serie de titulación de cantidades variables de antígenos p53, ECD6 o fragmento 3' de ECD6 recombinantes. Para cada antígeno, se trazaron curvas separadas de la unión específica (expresada como absorbancia a 650 nm) frente a la concentración de antígeno para cada dilución del suero del paciente. La Figura 3 muestra las curvas de titulación representativas para la detección de autoanticuerpos anti-p53 en el suero de un paciente de cáncer de mama primario (panel a) o un sujeto de control normal (panel b). La Figura 4 muestra las curvas de titulación representativas para la detección de autoanticuerpos anti-ECD6 (utilizando antígeno ECD6) en el suero de un paciente de cáncer de mama primario (panel a) o de un sujeto normal de control (panel b). La Figura 5 muestra las curvas de titulación representativas para la detección de autoanticuerpos anti-ECD6 (utilizando antígeno 3' ECD6) en el suero de un paciente de cáncer de mama primario (panel a) o un sujeto de control normal (panel b). La Figura 6 muestra las curvas de titulación representativas para la detección de autoanticuerpos anti-p53 o autoanticuerpos anti-ECD6 en el suero del mismo paciente de cáncer de mama primario usando el antígeno p53 (panel A), antígeno ECD6 (panel B) o antígeno 3' ECD6 (panel C). La Figura 7 (paneles a a d) muestra las curvas de titulación adicionales mencionadas en el ejemplo 3.

### **Descripción detallada de la invención**

En términos generales, la invención proporciona un método de inmunoanálisis para la detección de un anticuerpo que sirve como un marcador biológico de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, que se caracteriza porque dos o más diluciones diferentes de una muestra que se va a someter a ensayo para determinar la presencia del anticuerpo (muestra de ensayo) son analizadas cada una para determinar unión específica frente a diferentes cantidades de antígeno específico para el anticuerpo, y se producen las curvas de titulación separadas de la cantidad de unión de anticuerpo/antígeno frente a la cantidad de antígeno sometido a ensayo para cada dilución diferente de la muestra de ensayo. En pocas palabras, el análisis se basa en la titulación cruzada tanto de la muestra de ensayo como del antígeno utilizados como reactivos en el inmunoanálisis.

Las características generales de los inmunoanálisis, por ejemplo ELISA, radioinmunoanálisis y similares, son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase Immunoassay, E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996). Los inmunoanálisis para la detección de anticuerpos que tienen una especificidad inmunológica concreta requieren generalmente el uso de un reactivo (antígeno) que exhibe reactividad inmunológica específica con el anticuerpo sometido a ensayo. Dependiendo del formato del análisis este antígeno puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido. Una muestra que se va a someter a ensayo para determinar la presencia del anticuerpo se pone en contacto con el antígeno y si los anticuerpos de la especificidad inmunológica requerida están presentes en la muestra estos reaccionarán inmunológicamente con el antígeno para formar complejos anticuerpo-antígeno que a continuación se pueden detectar o medir cuantitativamente.

El método de la invención se caracteriza porque dos o más diluciones diferentes de la muestra que se va a someter a ensayo para determinar la presencia del anticuerpo son sometidos a ensayo cada uno contra de una pluralidad de cantidades diferentes de antígeno (también denominado en la presente memoria como una serie de titulación de antígeno). El análisis debe implicar someter a ensayo al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo, pero puede implicar someter a ensayo tres, cuatro, cinco, o de seis a diez o incluso más diluciones diferentes de la muestra de ensayo. Cada dilución separada de la muestra de ensayo se somete a ensayo contra al menos dos, y preferiblemente al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete o más cantidades diferentes del antígeno. Los análisis típicos también pueden incluir un control negativo que no contiene ningún antígeno y/o un control de muestra de ensayo negativo, tal como por ejemplo una dilución 1/10.000 de la muestra de ensayo.

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 las regiones determinantes de la complementariedad de dicho anticuerpo. El antígeno típicamente será una macromolécula biológica de origen 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 epítopos disponibles para la unión al anticuerpo diana es importante para establecer una serie de titulación. En muchos formatos de análisis la cantidad de determinantes antigénicos o epítopos disponibles para la unión está directamente correlacionada con la cantidad de moléculas de antígeno presentes. Sin embargo, en otras realizaciones, tales como ciertos sistemas de análisis en fase sólida, la cantidad de determinantes antigénicos o epítopos expuestos puede no correlacionarse directamente con la cantidad de antígeno pero puede depender de otros factores, tales como la unión a la superficie sólida. En estas realizaciones, se puede considerar que las referencias de la presente memoria a "diferentes cantidades de antígeno" en una serie de titulación se refieren a diferentes cantidades del determinante antigénico o epítopo.

La cantidad relativa o absoluta de la unión específica entre el anticuerpo (presente en la dilución de la muestra de ensayo) y el antígeno se determina para cada combinación diferente de dilución de la muestra de ensayo y la cantidad de antígeno (determinante antigénico o epítopo) sometida a ensayo. Los resultados se utilizan a continuación para trazar o calcular una serie de curvas de la cantidad (relativa o absoluta) de la unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno sometido a ensayo, generándose una curva separada para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en el análisis. Los resultados típicos se ilustran, 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 análisis se determina basándose en la cantidad de unión específica observada en cada cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en el análisis y se indica generalmente por la presencia de una curva en forma de S o sigmoidea para al menos dos diluciones de la muestra de ensayo diferentes.

Las cantidades absolutas de unión específica entre anticuerpo y antígeno no son generalmente importantes, a menos que se desee producir una medición cuantitativa. Para una simple determinación afirmativa/negativa de la presencia o ausencia de anticuerpos es suficiente que se produzca solo una curva de la forma correcta para al menos dos de las diluciones de la muestra de ensayo diferentes sometidas a ensayo en el análisis. Si no hay variación en la unión detectable respecto a las diferentes cantidades de antígeno sometidas a ensayo para cualquiera de las diluciones de la muestra de ensayo sometidas a ensayo, ésta se puede puntuar como una ausencia de una cantidad detectable del anticuerpo. En realizaciones preferidas de la invención, el método no es cuantitativo. Por tanto, puede dar una determinación afirmativa/negativa de la presencia o ausencia de anticuerpos usando una relación adimensional proporcional, que es independiente de la intensidad de la señal.

Una medida de la cantidad de anticuerpo presente en una muestra concreta, si se desea, puede derivar si se desea de los resultados del análisis de titulación cruzada. En realizaciones no limitantes que implican ensayos clínicos de una población de pacientes, se puede establecer un corte para puntuar un resultado en un paciente en concreto como positivo en comparación con los resultados obtenidos de un grupo control de sujetos normales, por ejemplo, un corte de media + 2 desviaciones típicas del grupo normal. Las muestras de pacientes en los que la unión específica de antígeno a anticuerpo diana (por ejemplo, el valor obtenido después de la corrección para la unión no específica) cae por encima de este corte para al menos una concentración de antígeno puede ser puntuadas como positivas.

En otras realizaciones no limitantes de la invención se puede utilizar un sistema de calibración con el fin de puntuar las muestras de ensayo desconocidas como positivas o negativas. Uno de tales sistemas de calibración se puede basar en el uso de muestras de control positivas y negativas conocidas. Se pueden analizar muestras de control positivas y negativas/calibradoras en paralelo con la muestra o las muestras de ensayo usando la metodología de análisis de la invención. Las muestras de ensayo desconocidas se consideran positivas o negativas en comparación con las muestras de control positivas y negativas conocidas utilizadas como calibradores.

El método de la invención es ventajoso para su uso en ensayos clínicos de diagnóstico, pronóstico, predictivos y/o de seguimiento, en donde las cantidades absolutas de anticuerpo diana presente puede variar enormemente de paciente a paciente. Los autores de la presente invención han observado que si tales análisis se basan en la detección de la unión de anticuerpos utilizando una única cantidad/concentración de antígeno de ensayo, las muestras de pacientes que contienen una cantidad de anticuerpo que se encuentra en un extremo muy bajo o muy alto del intervalo fisiológico normal (de cantidad de anticuerpo) a través de la población se pueden perder debido a las limitaciones de la metodología de análisis; muestras con una baja cantidad de anticuerpo pueden considerarse como resultados falsos negativos, mientras que aquellas con niveles muy altos de anticuerpo pueden estar fuera de la escala para la detección exacta dentro de la metodología de análisis elegida.

En todas las realizaciones de la invención, el anticuerpo detectado utilizando la metodología de análisis de titulación cruzada puede ser un autoanticuerpo.

El método de análisis de titulación cruzada de la invención es particularmente adecuado para la detección de anticuerpos/autoanticuerpos como marcadores biológicos de estado de enfermedad o susceptibilidad donde existe una considerable variación de paciente a paciente, tanto en las cantidades absolutas de anticuerpo/autoanticuerpo

presentes en el paciente, como en la especificidad de los anticuerpos/autoanticuerpos, en particular, la afinidad del anticuerpo/ autoanticuerpos para su antígeno diana. Las respuestas de autoanticuerpos, por su naturaleza pueden variar significativamente de paciente a paciente, ocurriendo la variación tanto en las cantidades absolutas de autoanticuerpos presentes como en la especificidad/afinidad de los autoanticuerpos. El método de la invención puede tener en cuenta esta variación de paciente a paciente, permitiendo así un formato de análisis convencional (adecuado para su uso en el ensayo de todos los individuos dentro de una población) que se va a desarrollar para cualquier anticuerpo/autoanticuerpo dado.

Las interacciones entre los autoanticuerpos y sus antígenos diana son generalmente de baja afinidad pero la fuerza de la unión puede variar de paciente a paciente, como se ha esbozado anteriormente. El método de la invención es particularmente adecuado para la detección de la unión de baja afinidad, ya que se puede deducir un resultado positivo de la forma de las curvas de titulación generadas para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en el análisis.

El método de la invención difiere de los métodos de análisis basados en la titulación del antígeno solo (es decir, análisis que implican someter a ensayo una única muestra de ensayo frente a una serie de titulaciones de antígeno) ya que permite la detección de señales producidas por la unión de anticuerpos poco abundantes y/o de baja afinidad que de otra manera podría ser enmascarada por la unión no específica (del antígeno utilizado en el análisis) con componentes no buscados en la muestra de ensayo.

Los autores de la presente invención han observado una considerable variación inter-antígeno y también intra-antígeno en la dilución de la muestra de ensayo óptima requerido para la detección óptima de los anticuerpos diana. Por lo tanto, la misma muestra de ensayo del paciente puede tener una primera dilución óptima para la detección de anticuerpos para un primer antígeno y una dilución óptima diferente para la detección de anticuerpos para un segundo antígeno derivado de una proteína diferente (variabilidad inter-antígeno). La "diferencia" en la dilución óptima de la muestra de ensayo para dos antígenos derivados de proteínas diferentes puede ser de varios órdenes de magnitud. Por ejemplo, una dilución óptima de una muestra de ensayo dada para la detección de anticuerpos para un primer antígeno (proteína A) podría ser 1:800, pero la *misma muestra de ensayo* puede requerir una dilución óptima de 1:50 para la detección de anticuerpos para un segundo antígeno (proteína B). Un efecto similar se puede observar cuando los antígenos utilizados son diferentes fragmentos de la misma proteína, o una proteína de longitud completa y un sub-fragmento de esta proteína (variabilidad intra-antígeno). Por lo tanto, si la muestra de ensayo se va a someter a ensayo para determinar la reactividad frente a un panel de antígenos diferentes (que se derivan de diferentes proteínas o fragmentos de una sola proteína o una combinación de los mismos), la dilución óptima de la muestra de ensayo requerida para cada antígeno en el panel podría ser diferente. El método de la invención evita este problema sometiendo a ensayo diluciones variables de la muestra de ensayo frente a diluciones variables de cada antígeno en el panel cada vez que se realiza el método en un entorno clínico. Así, cada antígeno en el panel se pondrá automáticamente a prueba a su dilución "óptima" de la muestra de ensayo.

Los autores de la presente invención también han observado que se pueden producir diferencias inter-individuo en la dilución de muestra de ensayo óptima para un antígeno concreto. Así, para cualquier antígeno dado una muestra de ensayo de un primer sujeto puede dar un resultado óptimo a una primera dilución de la muestra de ensayo (por ejemplo, 1:100), mientras que cuando una muestra de ensayo de un segundo sujeto se somete a ensayo utilizando el *mismo antígeno* puede ser óptima una dilución diferente de la muestra de ensayo (por ejemplo, 1:500). El método de la invención es capaz de tener en cuenta tal variación de paciente a paciente ya que para cada antígeno sometido a ensayo se somete a ensayo una serie de diluciones de la muestra de ensayo, frente a un intervalo de diluciones de antígeno *cada vez que el análisis se realiza en un entorno clínico*. De este modo, el método de la invención siempre utilizará la dilución de la muestra de ensayo óptima para cada antígeno sometido a ensayo contra cada muestra de ensayo.

El método de la invención también proporciona una protección contra la variación día a día en la realización de inmunoanálisis utilizados para la detección de autoanticuerpos/anticuerpos para el diagnóstico, pronóstico y/o control (estado de enfermedad o terapia). Se observa a menudo que puede haber una variación considerable día a día en la intensidad de la señal cuando se llevan a cabo inmunoanálisis para la detección de anticuerpos en muestras que comprenden los fluidos corporales de pacientes. Tal variación puede surgir, por ejemplo, debido a diferencias en la forma en que se obtuvieron las muestras y se almacenaron antes de la prueba. Estos factores hacen difícil puntuar los resultados de los análisis clínicos con certeza, por ejemplo sobre la base de un valor umbral sencillo de la unión anticuerpo/antígeno. La presente invención minimiza los efectos de tal variación día a día ya que es claramente evidente un resultado positivo para determinar la presencia de anticuerpo a partir de la forma de las curvas de titulación generadas para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en el análisis, independiente de la intensidad de la señal.

Una ventaja adicional del método de la invención es que permite la dilución de la muestra del paciente, pero todavía produce resultados consistentes, y también que se producirá generalmente el mismo resultado de escrutinio cualitativo (positivo/negativo) utilizando fluidos corporales de diferentes fuentes en un individuo (por ejemplo, sangre

o suero frente de líquido ascítico o efusión pleural), incluso aunque 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 múltiples diluciones de una muestra sospechosa de contener el anticuerpo y múltiples cantidades diferentes de un antígeno. Convenientemente, el contacto entre diluciones diferentes de la muestra y diferentes cantidades del antígeno puede tener lugar en cámaras de reacción separadas pero paralelas, tales como los pocillos de una placa de microtitulación. Se pueden aplicar en forma de recubrimiento cantidades variables del antígeno sobre los pocillos de la placa de microtitulación mediante la preparación de diluciones seriadas a partir de una provisión de antígeno a través de los pocillos de la placa de microtitulación. La provisión de antígeno puede ser de concentración conocida o desconocida. A continuación se pueden añadir alícuotas de las diluciones preparadas de la muestra de ensayo a los pocillos de la placa, manteniendo constante el volumen de la muestra de ensayo en cada pocillo. Las cantidades absolutas de antígeno añadidas 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 sometida a ensayo, las diluciones de la muestra de ensayo, etc., como apreciarán los expertos en la técnica. Generalmente las cantidades de antígeno y las diluciones de la muestra de ensayo se seleccionarán de manera que se produzca un intervalo de intensidad de la señal que caiga dentro del intervalo de detección aceptable de la lectura de salida elegida para la detección de la unión anticuerpo/antígeno en el método. Las cantidades y diluciones típicas para someter a ensayo las muestras de suero humano que se sospecha que contienen autoanticuerpos marcadores antitumorales se dan en los ejemplos adjuntos. A modo de ejemplo solamente, las diluciones típicas de la muestra de ensayo pueden variar en el intervalo de 1/30 a 1/10.000 (o 1:50 a 1:1600). Las cantidades de antígeno sometidas a ensayo puede variar normalmente en el intervalo de 0,01 µg/ml a 10 µg/ml, (o 0,16 nM a 160 nM) aunque no se pretende que sean limitantes.

Como se ha mencionado anteriormente, también es posible construir las curvas de titulación para dos o más diluciones de la muestra de ensayo a partir de una sola provisión de antígeno incluso cuando la concentración absoluta de antígeno en la provisión sea desconocida. Siempre que se utilice una misma solución de partida y se diluya seriadamente de la misma manera, es posible comparar los resultados de los análisis separados de titulación para este antígeno ejecutados en diferentes muestras de ensayo de partida.

En una realización adicional del análisis se pueden inmovilizar diferentes cantidades de antígeno (determinantes antigénicos o epítomos) en localizaciones o sitios de reacción discretos sobre un soporte sólido. El soporte completo, o una zona discreta del mismo que comprende una subfracción de los sitios de reacción, se puede poner en contacto a continuación con una dilución de la muestra de ensayo y detectar o medir la unión del anticuerpo al antígeno por separado en cada una de las localizaciones o sitios de reacción discretos. Los soportes sólidos adecuados también incluyen micromatrices, por ejemplo matrices en las que los sitios discretos o las aplicaciones en la matriz comprenden diferentes cantidades de antígeno. Las micromatrices se pueden preparar mediante la inmovilización de diferentes cantidades de un antígeno concreto en sitios de reacción discretos que se pueden resolver en la matriz. En otras realizaciones, la cantidad real de las moléculas de antígeno inmovilizadas se puede mantener sustancialmente constante, pero el tamaño de los sitios o aplicaciones en la matriz se puede variar con el fin de alterar la cantidad de epítomo de unión disponible, proporcionando una serie de titulación de los sitios o aplicaciones con diferentes cantidades de epítomo de unión disponible. En tales realizaciones, la concentración en la superficie bidimensional del epítomo o los epítomos de unión sobre el antígeno es importante en la preparación de la serie de titulación, en lugar de la cantidad absoluta de antígeno. Los mecanismos para la preparación y la interrogación de las micromatrices de proteínas/péptidos son generalmente conocidos en la técnica.

Se entenderá a partir de la discusión anterior que en todas las realizaciones de la invención, la variación en la cantidad de antígeno se puede lograr cambiando la densidad del antígeno o epítomo contra el que se someten a ensayo las diluciones de la muestra de ensayo, o manteniendo la densidad del antígeno o epítomo pero aumentando el área de superficie sobre la cual se inmoviliza el antígeno, o ambos.

Se puede utilizar micromatrices para realizar múltiples análisis para anticuerpos de diferente especificidad en paralelo. Esto se puede realizar utilizando matrices que comprenden múltiples conjuntos de antígenos diferentes, comprendiendo cada conjunto un antígeno concreto en múltiples cantidades o concentraciones diferentes. El término "antígenos" diferentes abarca antígenos derivados de proteínas o polipéptidos diferentes (tales como antígenos derivados de proteínas no relacionadas codificadas por genes diferentes) y también antígenos que derivan de diferentes epítomos peptídicos de una única proteína o polipéptido. Una micromatriz dada puede incluir exclusivamente conjuntos de diferentes antígenos obtenidos de proteínas o polipéptidos diferentes, o exclusivamente conjuntos de antígenos diferentes derivados de epítomos peptídicos diferentes de una única proteína o polipéptido, o una mezcla de los dos en cualquier proporción. Cabe señalar que en todas las realizaciones de la invención, se prefiere que cada serie de titulación de antígeno individual comprenda diferentes cantidades o concentraciones de sólo un tipo de antígenos y no mezclas de antígenos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "fluido corporal", cuando se refiere al material que se va a someter a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos utilizando el método de la invención, incluye, entre

- 5 otros, plasma, suero, sangre completa, orina, sudor, linfa, heces, fluido cerebrospinal, ascitis, efusión pleural, líquido seminal, esputo, material aspirado de pezón, seroma post-operatorio o líquido de drenaje de heridas. Como se ha mencionado, los métodos de la invención se llevan a cabo preferiblemente *in vitro* en diluciones de una muestra de ensayo que comprende fluido corporal retirado del sujeto sometido a ensayo. El tipo de fluido corporal usado puede variar dependiendo de la identidad del anticuerpo que se va a someter a ensayo y la situación clínica en la que se utiliza el análisis. En general, se prefiere realizar los análisis sobre muestras de suero o plasma. La muestra de ensayo puede incluir componentes adicionales además de los fluidos corporales, tales como por ejemplo diluyentes, conservantes, agentes estabilizantes, tampones, etc. Las diluciones de la muestra de ensayo se pueden preparar usando cualquier diluyente adecuado. El lector experto apreciará que la razón para la preparación de diluciones de la muestra de ensayo es simplemente producir una serie de muestras de ensayo que contengan cada una cantidades absolutas diferentes del anticuerpo diana a detectar en el inmunoanálisis. No se pretende excluir otros medios para obtener las "muestras de ensayo" que contienen cantidades variables del anticuerpo diana. A modo de ejemplo, una muestra de ensayo extraída de un paciente podría ser de hecho "concentrada" en lugar de diluida, por ejemplo, usando diálisis, con el fin de obtener una muestra de ensayo que contiene una concentración más alta del anticuerpo que existe naturalmente. En otras realizaciones, tales como cuando el fluido corporal extraído del paciente está relativamente diluido con respecto al anticuerpo diana, el fluido corporal podría ser concentrado primero (por ejemplo por diálisis o técnicas similares) para preparar una provisión concentrada que a continuación se utiliza para preparar una serie de diluciones para su uso en un análisis de acuerdo con la invención.
- 10
- 15
- 20 El término "antígeno" se utiliza en la presente memoria en un sentido amplio para referirse a cualquier sustancia que exhibe reactividad inmunológica específica con un anticuerpo diana a detectar. Los antígenos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas de origen natural, proteínas recombinantes o sintéticas o polipéptidos, péptidos sintéticos, peptidomiméticos, etc., también polisacáridos y ácidos nucleicos. Específicamente, cuando se utiliza "antígeno" en la presente memoria se pretende que abarque cualquier agente de captura, ya sea de origen humano, procedente de mamíferos, o de otro modo, capaz de una interacción inmunológica específica con las regiones variables o determinantes de complementariedad del anticuerpo que va a ser detectado. Por ejemplo los anticuerpos anti-idiotípicos pueden ser considerados como un antígeno para este propósito como lo pueden los antígenos generados mediante presentación en fagos.
- 25
- 30 Ciertos antígenos pueden comprender o estar derivado de proteínas o polipéptidos aislados de fuentes naturales, incluyendo pero no limitados a proteínas o polipéptidos aislados a partir de tejidos o fluidos corporales del paciente. En tales realizaciones, el antígeno puede comprender sustancialmente la totalidad de la proteína de origen natural, esto es, la proteína sustancialmente en la forma en la que está aislada 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 cualquiera de tales "fragmentos" debe conservar la reactividad inmunológica con los anticuerpos para los cuales que se utilizará para el ensayo. Los fragmentos adecuados pueden, por ejemplo, prepararse mediante escisión química o enzimática de la proteína aislada.
- 35
- 40 Dependiendo de la naturaleza precisa del análisis en el que se va a utilizar, el antígeno puede comprender una biomolécula de origen natural (por ejemplo, una proteína, o fragmento de la misma), conectada a una o más moléculas adicionales que confieren alguna característica deseable no presente de forma natural en la biomolécula. Por ejemplo, la biomolécula (por ejemplo, fragmento de proteína o polipéptido) puede ser conjugada con un marcador indicador, tal como por ejemplo un marcador fluorescente, marcador colorante, marcador luminiscente, radiomarcador o metal pesado tal como oro coloidal. En otras realizaciones se puede expresar una proteína o fragmento como una proteína de fusión. A modo de ejemplo, las proteínas de fusión puede incluir una etiqueta peptídica en el extremo N o C para ayudar a la purificación del antígeno expresado de forma recombinante.
- 45
- 50 Dependiendo del formato del análisis en el que se vaya a utilizar, el antígeno puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido tal como, por ejemplo, los pocillos de una placa de microtitulación, cuentas de micromatrices o chips o cuentas magnéticas. La inmovilización puede realizarse a través de adsorción no covalente o anclaje covalente.
- 55 Sepuede utilizar cualquier medio de anclaje adecuado siempre que éste no afecte adversamente a la capacidad del antígeno para reaccionar inmunológicamente con el anticuerpo diana en un grado significativo.
- 60 La invención no se limita a análisis en fase sólida, sino que también abarca los análisis que, en su totalidad o en parte, se llevan a cabo en fase líquida, por ejemplo, análisis con cuentas en fase de solución.
- En una realización, los antígenos se pueden marcar con un ligando que facilite la inmovilización, tal como biotina. El antígeno se puede diluir a continuación a un intervalo de titulación adecuado y después se deja reaccionar con autoanticuerpos en muestras de pacientes en solución. Los complejos inmunitarios resultantes se puede inmovilizar a continuación en un soporte sólido a través de una interacción ligando-receptor (por ejemplo, biotina-estreptavidina) y realizar el resto del análisis como se describe a continuación.

Para facilitar la producción de antígenos polipeptídicos biotinilados para su uso en los métodos de análisis de la invención, los ADNc que codifican un antígeno del polipéptido completo, una versión truncada del mismo o un fragmento antigénico del mismo pueden ser expresados como una proteína de fusión marcada con una proteína o etiqueta polipeptídica a la que se puede anclar el co-factor de biotina a través de una reacción enzimática. Los vectores para la producción de antígenos recombinantes biotinilados están disponibles comercialmente de numerosas fuentes.

Una ventaja adicional de la utilización del enfoque titulación cruzada con antígenos biotinilados es que el análisis es capaz de distinguir entre la unión del componente biotina a anticuerpos anti-biotina y la verdadera unión del antígeno a su anticuerpo cognado. Los autores de la presente invención han observado que una cantidad significativa de la población humana produce naturalmente anticuerpos anti-biotina que podrían conducir a la producción de resultados falsos positivos en análisis basados en el uso de antígenos biotinilados.

Como se ha mencionado, el "inmunoanálisis" utilizado para detectar anticuerpos de acuerdo con la invención puede estar basado en mecanismos convencionales conocidos en la técnica, con la excepción de que se utilizan múltiples cantidades de antígeno para crear una serie de titulación que puede hacerse reaccionar con múltiples diluciones diferentes de la muestra de ensayo seleccionada. En una realización más preferida, el inmunoanálisis puede ser un ELISA. Los ELISA son generalmente bien conocidos en la técnica. En un ELISA "indirecto" típico un antígeno que tiene especificidad por los anticuerpos sometidos a ensayo se inmoviliza sobre una superficie sólida (por ejemplo, los pocillos de una placa de análisis de microtitulación convencional, o la superficie de una microcuenta o una micromatriz) y una muestra que comprende el fluido corporal que se va a someter a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos se pone en contacto con el antígeno inmovilizado. Cualquiera de los anticuerpos de la especificidad deseada presente en la muestra se unirá al antígeno inmovilizado. Los complejos de anticuerpo/antígeno unidos se pueden detectar a continuación utilizando cualquier método adecuado. En una realización preferida, se utiliza un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana secundario marcado, que reconoce específicamente un epítipo común para una o más clases de inmunoglobulinas humanas, para detectar los complejos antígeno/anticuerpo. Típicamente, el anticuerpo secundario será anti-IgG o anti-IgM. El anticuerpo secundario está generalmente marcado con un marcador detectable, típicamente un marcador enzimático tal como, por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa, que permite la detección cuantitativa mediante la adición de un sustrato para la enzima que genera un producto detectable, por ejemplo un producto coloreado quimioluminiscente o fluorescente. Se pueden utilizar otros tipos de marcadores detectables conocidos en la técnica.

La invención se refiere a un método para detectar anticuerpos que son marcadores biológicos de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad. Este aspecto concreto de la invención excluye preferiblemente los análisis diseñados para someter a ensayo los anticuerpos producidos como resultado de una sensibilización por vacuna o un protocolo de inmunización, distinto de la vacunación con marcadores para el cáncer. Por lo tanto, los análisis de acuerdo con este aspecto de la invención preferiblemente no incluyen los análisis diseñados para someter a ensayo la presencia de anticuerpos anti-virales o anti-bacterianos después de la vacunación/inmunización.

En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo puede ser un autoanticuerpo. Como se indicó anteriormente, el término "autoanticuerpo" se refiere a un anticuerpo de origen natural dirigido a un antígeno que el sistema inmunitario de un individuo reconoce como foráneo incluso si ese antígeno realmente se originó 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 de enfermedad. La forma alterada de la proteína se origina en el individuo, pero puede ser considerado por el sistema inmunitario del individuo como "no propia" y por lo tanto provocar una respuesta inmunitaria en ese individuo en forma de autoanticuerpos inmunológicamente específicos para la proteína alterada. Tales formas alteradas de una proteína puede incluir, por ejemplo, mutantes que tienen la secuencia de aminoácidos alterada, opcionalmente acompañada de cambios en la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, formas truncadas, variantes de empalme, glicofomas alteradas, etc. En otras realizaciones, el autoanticuerpo se puede dirigir a una proteína que está expresada en exceso en un estado de enfermedad, por ejemplo como resultado de amplificación génica o regulación transcripcional anormal. La expresión en exceso de una proteína que no se encuentra normalmente por las células del sistema inmunitario en cantidades significativas, puede desencadenar una respuesta inmunitaria que conduce a producción de autoanticuerpos. En otras realizaciones adicionales el autoanticuerpo se puede dirigir a una forma fetal de una proteína que se expresa en un estado de enfermedad. Si una proteína fetal que normalmente se expresa sólo en las primeras etapas de desarrollo antes de que el sistema inmunitario sea funcional se expresa en un estado de enfermedad, la forma fetal pueden ser reconocida por el sistema inmunitario como "extraña", desencadenando una respuesta inmunitaria que conduce a la producción de autoanticuerpos .

En una realización, el anticuerpo puede ser un autoanticuerpo específico para una proteína marcadora de tumores, y más particularmente un autoanticuerpo anti-tumoral "asociado al cáncer".

El término autoanticuerpo anti-tumoral "asociado al cáncer" hace referencia a un autoanticuerpo que se dirige contra un epítipo presente en las formas de proteínas marcadoras de tumoreses que se expresan preferentemente en el estado de enfermedad del cáncer. La presencia de tales autoanticuerpos es característica del estado de enfermedad del cáncer, o de predisposición al cáncer en pacientes asintomáticos.

En aplicaciones preferidas, el método de la invención se utilizará para detectar la presencia de autoanticuerpos antitumorales asociados al cáncer en muestras de ensayo derivadas de sujetos o pacientes humanos (aunque el método se puede utilizar en muestras de ensayo derivadas de otros mamíferos no humanos), y muy preferentemente adoptará la forma de un inmunoanálisis *in vitro*, realizado en dos o más diluciones de una muestra de ensayo que comprende una muestra de fluido corporal tomada del sujeto/paciente. La muestra de fluido corporal puede diluirse en cualquier tampón adecuado y puede ser tratada para su almacenamiento a largo plazo o de otro modo antes de la prueba.

Los inmunoanálisis *in vitro* son no invasivos y pueden repetirse tan a menudo como se considere necesario para construir un perfil de producción de autoanticuerpos en un paciente, ya sea antes de la aparición de la enfermedad, como en el escrutinio de individuos "en riesgo", o durante todo el curso de la enfermedad (comentado adicionalmente más adelante con relación a las aplicaciones preferidas del método).

En particular, pero no limitantes, las realizaciones de los métodos de la invención pueden comprender inmunoanálisis para detectar (simultáneamente) dos o más tipos de autoanticuerpos, teniendo cada uno especificidad por diferentes epítopos en proteínas marcadoras de tumoreses iguales o relacionadas (por ejemplo, diferentes isoformas o variantes codificadas por un único gen) o por epítopos de diferentes proteínas marcadoras de tumoreses (es decir, las proteínas codificadas por diferentes genes). Estos métodos típicamente implicarán el uso de un panel de dos o más conjuntos de antígenos, derivándose cada conjunto de antígenos normalmente de una proteína marcadora de tumoreses diferente (diferente en este contexto significa proteínas que son productos de genes diferentes) aunque, como se señaló anteriormente un conjunto de antígenos también podría implicar diferentes epítopos en la misma proteína marcadora de tumoreses. Un "conjunto" de los antígenos se refiere a un solo antígeno que se va a someter a ensayo a diferentes cantidades/concentraciones en el método de la invención. Estos métodos, que pueden ser denominados en lo sucesivo "análisis de panel", utilizan un panel de dos o más conjuntos de antígenos para controlar la respuesta inmunitaria global de un individuo a un tumor u otro cambio carcinogénico/neoplásico. Estos métodos detectan así un "perfil" de la respuesta inmunitaria en un individuo dado, indicando qué marcadores tumorales provocan una respuesta inmunitaria que da 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 generalmente es 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, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad).

Por lo tanto, en una realización no limitante, la invención proporciona un método para detectar 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 un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, cuyo método comprende:

1. (a) preparar dos o más diluciones diferentes de dicha muestra de ensayo y llevar a cabo las siguientes etapas (i) y (ii) con respecto a cada dilución de la muestra de ensayo:
  1. (i) poner en contacto la dilución de la muestra de ensayo con dos o más conjuntos de antígenos, en donde cada uno de dichos conjuntos de antígenos es específico para uno de dichos anticuerpos que van a ser detectados en la muestra de ensayo y en el que cada conjunto de antígenos comprende una pluralidad de cantidades diferentes del mismo antígeno,
  2. (ii) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada cantidad de antígeno en cada conjunto de antígenos utilizados en la etapa (i),
2. (b) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo con cada conjunto de antígenos utilizados en la etapa (a), en donde la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con uno cualquiera de los conjuntos de antígenos usados en el análisis se indica mediante una curva generalmente en forma de S o sigmoidea para al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo con la conjunto de antígenos.

En una realización de este método cada uno de dichos dos o más anticuerpos será un marcador biológico de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, sin embargo, está dentro del alcance de la invención combinar un análisis de titulación cruzada para un antígeno marcador de la enfermedad con un análisis de titulación cruzada para cualquier otro tipo de anticuerpo, que puede o no ser un marcador de la enfermedad, en la misma muestra de ensayo.

De cualquier manera el criterio para determinar si los anticuerpos relevantes están o no están presentes en la muestra de ensayo se basa en la cantidad de unión específica observada a cada una de las diferentes concentraciones de antígeno con respecto a cada antígeno diferente en el ensayo, en otras palabras los valores colectivos para cada antígeno en lugar de una lectura a una sola concentración para cada antígeno. Por lo tanto, la determinación de la presencia o ausencia de estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad en base a la presencia de dos o más tipos de anticuerpos en una muestra del paciente puede estar basada en estos valores colectivos para cada antígeno. Preferiblemente, la evaluación se realiza sobre la base de la presentación de una curva generalmente en forma de S o sigmoidea para al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo con respecto a cualquiera o todos los antígenos presentes en la prueba.

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

En una realización preferida del método de análisis de panel, al menos uno y preferiblemente todos los anticuerpos detectados en el análisis son autoanticuerpos reactivos con proteínas marcadoras de tumores.

Los análisis de titulación cruzada de acuerdo con la invención se puede adaptar para su uso en la detección de autoanticuerpos contra esencialmente cualquier proteína marcadora de tumores para la que se puede preparar un antígeno adecuado, como un análisis de un solo marcador o como un componente de un análisis de panel. En particular, el método puede adaptarse para detectar/medir autoanticuerpos inmunológicamente específicos para una cualquiera o cualquier combinación de dos o más de las siguientes proteínas marcadoras de tumores, mediante el uso de los antígenos correspondientes:

Proteína del receptor 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);

MUC1 (Batra, S. K. et al. (1992) *Int. J. Pancreatol.* 12: 271-283);

Myc (c-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);

ras (o Ras) (Capella, G. et al. (1991) *Environ Health Perspectives*. 93: 125-131);

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; Norum LF, et al., *Tumour Biol.* 2001 Jul-Aug;22(4):223-8; Perey L, et al., *Br J Cancer*. 1990 Oct;62(4):668-70; Devine PL, et al., *Anticancer Res.* 1992 May-Jun;12(3):709-17);

PSA (Rosenberg, R. S. et al. (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* 248: 935-939);

Antígeno carcinoembrionario CEA (Duffy, M.J. (2001) *Clin Chem*, Apr 47 (4) : 624-30);

CA19.9 (Haga, Y. et al (1989) *Clin Biochem* (1989) Oct 22(5): 363-8);

NY-ESO-1 (antígeno 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 prostáticas; Reiter, R. E. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 1735-1740, 1998);

EpCam (moléculas de adherencia celular epitelial; Szala, S. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 3542-3546, 1990);

HER2-neu (también conocido como c-erbB2) (Coussens, L. et al., *Science* 230: 1132-1139, 1985);

EDC6, que es un nombre alternativo para el dominio extracelular de HER2.

CAGE (Jager D, et al., *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59(24):6197-204; Mashino K, et al., *Br J Cancer*. 2001 Sep 1;85(5):713-20);

Citoqueratinas (Moll R, et al., *Cell*. 1982 Nov;31(1):11-24; Braun S, et al., *N Engl J Med*. 2000; 342: 525-533). El término "citoqueratina" se utiliza genéricamente para referirse a cualquier miembro de la familia de las citoqueratinas para las que los autoanticuerpos correspondientes funcionan como marcadores tumorales. Los ejemplos preferidos son las citoqueratinas 5/14, 8/18 (Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G *Hum Pathol.* 2006 Sep;37(9):1217-26. Epub 2006 Jul 18); las citoqueratinas 7, 20 (Vang R, Gown AM, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, Seidman JD, Ronnett BM. *Am J Surg Pathol.* 2006 Sep;30(9):1130-1139); y las citoqueratinas 8/18/19 (Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. *Clin Biochem.* 2004 Jul;37(7):529-40).

Recoverina (Maeda A, et al., *Cancer Res.* 2000 Apr 1;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).

El término "calicreína" se utiliza genéricamente para referirse a cualquier miembro de la familia de las calicreínas para las que los autoanticuerpos correspondientes funcionan como marcadores tumorales. Los ejemplos preferidos son las calicreínas 1 a 15 (KLK 1-15/Hk1-Hk15) (Obiezu CV, Diamandis EP. *Cancer Lett.* 2005 Jun 16;224(1):1-22; Diamandis EP, Yousef GM. *Clin Chem.* 2002 Aug;48(8):1198-205), y en concreto KLK 4-7 (Prezas P, Arlt MJ, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Talieri M,

- Diamandis EP, Kruger A, Magdolen V. *Biol Chem.* 2006 Jun;387(6):807-11; Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV. The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Mar;11(2):54-60. Review.);
- 5 Anexinas (Hudelist G, et al., *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Aug;86(3):281-91; Gerke, V. & Moss, S.E. *Physiological Reviews* 2002 82: 331-371). El término "anexina" se utiliza genéricamente para referirse a cualquier miembro de la familia de las anexinas para las que los autoanticuerpos correspondientes funcionan como marcadores tumorales. Los ejemplos preferidos son las anexinas 1 and 2 (Pedrero, J.M.G., Fernandez, M.P., Morgan, O., Zapatero, A. H., Gonzalez, M.V., Nieto, C. S. & Rodrigo, J.P. *American Journal of Pathology* 2004 164(1): 73-79; Brichory, F.M., Misek, D.E., Yim, A., Krause, M.C., Giordano, T. J., Beer, D.G., Hanash, S.M. 2001 *Medical Sciences* 98(17): 9824-9829) and annexin XI-A (Fernández-Madrid, F., Tang, N., Alansari, H., Granda, J. L., Tait, L., Amirikia, K. C., Moroianu, M., Wang, X. & Karvonen, R.L. *Cancer Research* 2004 64: 5089-5096);
- 10  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) (Stillier D, et al., *Acta Histochem Suppl.* 1986;33:225-31); GRP78 (Block TM, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Jan 18;102(3):779-84; Hsu WM, et al., *Int J Cancer.* 2005 Mar 1;113(6):920-7);
- 15 Mammaglobin (Zehentner BK, et al., *Clin Chem.* 2004 Nov;50(11):2069-76; Zehentner BK, Carter D. *Clin Biochem.* 2004 Apr;37(4):249-57); raf (Callans LS. et al., *Ann Surg Oncol.* 1995 Jan;2(1):38-42; Pratt MA, et al., *Mol Cell Biochem.* 1998 Dec;189(1-2):119-25);
- 20 beta gonadotropina coriónica humana b-HCG (Ayala AR, et al., *Am J Reprod Immunol.* 1983 Apr-May;3(3):149-51; Gregory JJ Jr, et al., *Drugs.* 1999 Apr;57(4):463-7); antígeno 4-5 (Krause P, et al., *J Immunol Methods.* 2003 Dec;283(1-2):261-7); NY-BR-1 (Jage D, Stockert E, Gure AO, Scenlan MJ, Karbach J, Jage E, Knuth A, Old LJ, Chen YT. (2001) Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res* 61 (5): 2055-61);
- 25 Livina (Kasof GM, Gomes BC (2001) Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family. *J Biol Chem*, 276 (5): 3238-46); Survivina (Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptois gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med*, 3 (8): 917-21);
- 30 MUC2 (glycoprotein) Griffiths B, Matthews DJ, West L, Attwood J, Povey S, Swallow DM, Gum JR Kim YS (1990) Assignment of the polymorphic intestinal mucin gene MUC2 to chromosome-11p15. *Ann Hum Genet*, 54: 277-85. Endostatina (Standker L, Schrader M, Kanse SM, Jurgens M, Forssmann WG, Preissner KT (1997) Isolation and characterisation of the circulating form of human endostatin. *FEBS Lett*, 420 (2-3): 129-33;
- 35 Bcl-2 (Tsujiimoto Y, Croce CM (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *PNAS USA*, 83 (14): 5214-8); BIRC7 (Wu Hy, Ma Yh, Zhu Yk, Shen Y, Gu CM, Ye ZY, Lin HL (2006) The expression of BIRC7 protein and mRNA in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 47 (6): 1110-6);
- 40 Proteínas de choque térmico (el término proteínas de choque térmico se utiliza genéricamente para referirse a cualquier proteína de choque térmico para las que los autoanticuerpos correspondientes funcionan como marcadores tumorales) incluyendo pero no exclusivamente:HSP70 (Tauchi K, Tsutsumi Y, Hori S, Yoshimura S, Osamura Ry, Watanabe K (1991) Expression of heat shock protein-70 and c-myc protein in human breast-cancer - an immunohistochemical study. *Jap J Clin Oncol*, 21 (4): 256-63); HSP27 (Differential expression of alphaB-crystallin and Hsp27-1 in anaplastic thyroid carcinomas because of tumor-specific alphaB-crystallin gene (CRYAB) silencing.Mineva I, Gartner W, Hauser P, Kainz A, Loffler M, Wolf G, Oberbauer R, Weissel M, Wagner L. *Cell Stress Chaperones.* 2005 Autumn; 10(3):171-84); and CRYAB (Seitz S, Korsching E, Weimer J, Jacobsen A, Arnold N, Meindl A, Arnold W, Gustavus D, Klebig C, Petersen I, Scherneck S. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Jun;45(6):612-27).
- 50 No55 (Fossa A, Siebert R, Aasheim HC, Maelandsmo GM, Berner A, Fossa SD, Smeland EB Gaudernack G (2000) Identification of a nucleolar protein No55 as a tumour-associated auto-antigen in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 83 (6): 743-9).
- 55 Activador del Plasminógeno de tipo Uroquinasa (uPA) (Booyse FM, Osikowicz G, Feder S, Scheinbuks J (1984) Isolation and characterisation of a urokinase-type plasminogen activator (MR = 54,000) from cultures human epithelial cells indistinguishable from urinary urokinase. *J Biol Chem* 259 (11): 7198-205);
- 60 Tetranectina (proteína de unión a plasminógeno) (Clemmensen I, Petersen LC, Kluft C (1986)Purification and characterization of a novel, Oligomeric, Plasminogen Kringle 4 binding-protein from human plasma -Tetranectin. *Eur J Biochem* 156 (2): 237-333);
- Prolactina (Riddle O, bates RW, Dykshorn SW (1933) The preparation, identification and assey of prolactin - A hormone of the anterior pituitary. *Am J Physiol* 105 (1): 191-216);

Osteopontina (Butler WT, Martin TJ, Raisz LG, Slavkin HC Termine JD, Rodan GA, Veis A (1988) Osteopontin - Structure and biological activity. CBA Foundation Symposia 136: 203-206; Kiefer MC, Bauer DM, Barr PJ (1989) The CDNA and derived amino-acid sequence for human Osteopontin. Nuclei Acids Res 17 (8): 3306-3306);

5 Proteína específica de epidídimo humano (HE4) Kirchoff C, Habben I, Ivell R, Krull N (1991) A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase-inhibitors. Biology of Reproduction 45 (2): 350-357);

10 Inhibidor de tripsina asociado a tumores (TATI) (Huhtala ML, Kahanpaa K, Seppala M, Halila H, Stenman UH (1983) Excretion of a tumour associated trypsin-inhibitor (TATI) in urine of patients with Gynecological Malignancy. Int J Cancer 31 (6): 711-714, 1983;

15 Inhibina (Chari S, Hopkinson CRN, Fritze E, Sturm G, Hirschhauser C. (1977) Partial-Purification of Inhibin from Human Testicular Extracts. ACTA Endocrinologia 85 (Suppl 212) : 215-219) ;

Vimentina (Yang YC, Li X, Chen W. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2006 Sep;38(9):602-10);

20 Cox-1 y Cox-2 (Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, Mehrotra M, Woodard M, Hansen M, Herschman H, Pilbeam C. Cancer Res. 2006 Jul 1;66(13):6657-64; Cervello M, Montalto G. World J Gastroenterol. 2006 Aug 28;12(28):5113-5121).

Se apreciará que se pretende que la invención no esté destinada a la detección de los autoanticuerpos para los marcadores tumorales específicos mencionados anteriormente a modo de ejemplo solamente.

25 Se pueden emplear métodos de análisis de acuerdo con la invención basándose en la detección de autoanticuerpos marcadores anti-tumorales (en forma de análisis de un solo marcador o de un panel) en una variedad de situaciones clínicas diferentes. En particular, el método se puede utilizar en la detección o el diagnóstico de cáncer en sujetos humanos sintomáticos o asintomáticos, en la evaluación de la prognosis de un paciente diagnosticado con cáncer, en la predicción de la respuesta a la terapia, en el seguimiento del progreso 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 el escrutinio de una población de sujetos humanos asintomáticos, con el fin de identificar los sujetos que están en riesgo creciente de desarrollar el cáncer o para diagnosticar la presencia de cáncer, en la predicción de la respuesta de un paciente con cáncer al tratamiento anti-cáncer (por ejemplo, vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de la señal, radioterapia, terapia endocrina, terapia con anticuerpos humanos, quimioterapia), en el seguimiento de la respuesta de un paciente con cáncer al tratamiento anti-cáncer (por ejemplo vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de señal, radioterapia, terapia endocrina, terapia con anticuerpos humanos, quimioterapia), en la detección de una enfermedad recurrente en un paciente previamente diagnosticado de cáncer que se ha sometido a tratamiento contra el cáncer para reducir la cantidad de cáncer presente, o en la selección de una terapia anti-cáncer (por ejemplo, vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o transducción de la señal, radioterapia, terapia endocrina, quimioterapia para el tratamiento con anticuerpos humanos), para su uso en un paciente concreto.

45 Los autores de la presente invención han observado generalmente que los niveles de autoanticuerpos asociados con el cáncer muestran una correlación positiva con el estado de la enfermedad (véase también WO 99/58979). Por lo tanto, cuando el método de la invención se usa en aplicaciones clínicas aumento de los niveles de autoanticuerpos anti-marcadores tumorales, en comparación con controles adecuados, se toman generalmente como una indicación del estado de la enfermedad del cáncer, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria.

50 Cuando los inmunoanálisis se usan en el diagnóstico del cáncer en un individuo humano (sintomático o asintomático para el cáncer), la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos, en comparación con individuos control "normales", se toma generalmente como una indicación de que el individuo tiene cáncer. Los individuos de control "normales" serán preferiblemente controles emparejados por edad que no tienen un diagnóstico de cáncer basado en criterios clínicos, imagenológicos y/o bioquímicos. Una aplicación particularmente útil de este método es para someter a ensayo sujetos humanos que ya manifiestan los síntomas del cáncer (por ejemplo, basándose en la criterios clínicos, imagenológicos y/o bioquímicos) con el fin de ayudar a elaborar o confirmar un diagnóstico de cáncer.

60 Cuando los inmunoanálisis se usan para predecir la respuesta de un paciente con cáncer a un tratamiento anti-cáncer (por ejemplo vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de la señal, radioterapia, terapia endocrina, terapia con anticuerpos humanos, quimioterapia), la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos, en comparación con los individuos control "normales", se puede tomar como una indicación de si es probable o no que el individuo que responda al tratamiento anti-cáncer. Los individuos de control "normales" serán preferiblemente controles emparejados por edad que no tienen un diagnóstico de cáncer basado en criterios clínicos,

imagenológicos, y/o bioquímicos. Para cada uno de los tratamientos enumerados anteriormente, puede establecerse una relación entre el nivel de autoanticuerpos en comparación con los controles y las probabilidades de éxito del tratamiento mediante la observación de los resultados de tal tratamiento en los pacientes cuyo estado de autoanticuerpos se controla durante todo el tratamiento. La relación previamente establecida se puede utilizar a continuación para predecir la probabilidad de éxito para cada tratamiento en un paciente determinado basándose en la evaluación del estado de autoanticuerpos.

Cuando los inmunoanálisis se utilizan en el seguimiento de la evolución 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 una indicación de la presencia de cáncer en el paciente. El "control normal" pueden ser los niveles de autoanticuerpos presentes en los individuos de control, preferiblemente emparejados por edad, que no tienen ningún diagnóstico de cáncer basado en criterios clínicos, imagenológicos y/o bioquímicos. Alternativamente, el "control normal" puede ser un nivel de "referencia" establecido para el paciente concreto sometido a ensayo. El nivel de "referencia" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos presentes cuando se realizó un primer diagnóstico de cáncer o un diagnóstico de cáncer recurrente. Cualquier aumento por encima del nivel de referencia se tomaría como una indicación de que la cantidad de cáncer presente en el paciente ha aumentado, mientras que cualquier disminución por debajo de la referencia se tomaría como una indicación de que la cantidad de cáncer presente en el paciente ha disminuido. El valor de "referencia" también puede ser, por ejemplo, el nivel antes de comenzar un nuevo tratamiento. Un cambio en el nivel de autoanticuerpos se tomaría como una indicación 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 precisa 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 mediante el control de los niveles de autoanticuerpos en comparación con otros indicadores clínicos o bioquímicos de respuesta al tratamiento.

Cuando los inmunoanálisis se utilizan en el escrutinio de una población de sujetos humanos asintomáticos esto puede ser para identificar a los sujetos que tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer, los individuos que tienen un nivel elevado de anticuerpos, en comparación con los individuos de control "normales", se identifican por estar "en riesgo" de desarrollar cáncer. Los individuos de control "normales" serán preferiblemente controles pareados por edad no identificados por tener alguna predisposición a desarrollar cáncer o un riesgo elevado significativo de desarrollar cáncer. Una excepción a esto puede ser que la edad es en sí misma un factor de riesgo importante.

Cuando los inmunoanálisis se usan en el escrutinio de una población de sujetos humanos asintomáticos esto puede ser para diagnosticar el cáncer en aquellos sujetos que ya han desarrollado un cáncer, puntuándose los individuos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos en comparación con los individuos de control "normales" por tener cáncer o alguna forma de cambio neoplásico. Los individuos "normales" de control serán preferiblemente controles emparejados por edad no identificados por tener alguna predisposición a desarrollar cáncer o un riesgo elevado significativo de desarrollar cáncer. Una excepción a esto puede ser que la edad es en sí misma un factor de riesgo importante. Alternativamente, el "control normal" puede ser un nivel de "referencia" establecido para el paciente concreto sometido a ensayo. El nivel de "referencia" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos presentes cuando el paciente sometió a ensayo en primer lugar y se encontró que tenía niveles no elevados por encima de una población de "control normal". Cualquier aumento a partir de entonces frente a esta medida de referencia se tomaría como una indicación de la presencia de cáncer en ese individuo. Así, el individuo podría a través de un ensayo de referencia convertirse en su propio control para una futura medición de autoanticuerpos.

ICuando los inmunoanálisis se usan en el control de la respuesta de un paciente con cáncer a tratamiento anti-cáncer (por ejemplo vacunación, terapias anti-factor de crecimiento o de transducción de la señal, radioterapia, terapia endocrina, terapia con anticuerpos humanos, quimioterapia), la presencia de una alteración del nivel de autoanticuerpos después del tratamiento se toma como una indicación de que el paciente ha respondido positivamente al tratamiento. Un nivel de referencia de autoanticuerpos tomado antes de iniciar el tratamiento se puede utilizar para fines comparativos con el fin de 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 una indicación 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 precisa 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 mediante el control de los niveles de autoanticuerpos en comparación con otros indicadores clínicos o bioquímicos de respuesta al tratamiento.

El método de la invención puede utilizarse para predecir y/o controlar la respuesta de un individuo esencialmente a cualquier tratamiento conocido contra el cáncer. Esto incluye, por ejemplo, la terapia con anticuerpos humanos en la que se infunden en el paciente anticuerpos monoclonales o policlonales, siendo un ejemplo no limitante específico el tratamiento con el anticuerpo anti-factor de crecimiento Herceptin™ (Baselga, J., D. Tripathy et al., J Clin Oncol., 14 (3), 737-744, 1996). La presencia de una respuesta de autoanticuerpos natural puede mejorar o inhibir la eficacia del tratamiento con infusión de anticuerpos terapéuticos artificialmente. Utilizando el método de la invención, es posible

correlacionar la respuesta a cualquier tratamiento anti-cáncer, incluyendo terapia de anticuerpos, con los niveles naturales de autoanticuerpos antes y durante el curso del tratamiento en cualquier paciente o grupo de pacientes. Este conocimiento puede a su vez utilizarse para predecir cómo responderá otros pacientes (o el mismo paciente en el caso de tratamiento repetido) al mismo tratamiento.

5 Cuando los inmunoanálisis se usan en la detección de enfermedad recurrente, la presencia de un nivel aumentado de autoanticuerpos en el paciente, en comparación con un "control normal", se toma como una indicación de que la enfermedad ha reaparecido. El "control normal" puede consistir en niveles de autoanticuerpos presentes en individuos de control, preferiblemente emparejados por edad que no tienen ningún diagnóstico de cáncer basado en  
10 criterios clínicos, imagenológicos y/o bioquímicos. Alternativamente, el "control normal" puede ser un nivel de "referencia" establecido para el paciente concreto sometido a ensayo. El nivel de "referencia" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos presentes durante un periodo de remisión de la enfermedad basado en criterios clínicos, imagenológicos y/o bioquímicos.

15 El método de análisis de la invención se puede aplicar en la detección de muchos tipos diferentes de cáncer, cuyos ejemplos son el cáncer de mama, de vejiga, colorrectal, de próstata, de pulmón, de páncreas y de ovario. Los análisis pueden complementar los métodos de escrutinio y vigilancia existentes. Por ejemplo, en el caso de de cáncer de mama primarios se podrían utilizar inmunoanálisis para autoanticuerpos para alertar a los médicos de la realización de biopsias de pequeñas lesiones en los mamogramas que no parecen radiográficamente sospechosas o  
20 para llevar a cabo la obtención de imágenes de la mama o para repetir la toma de imágenes antes de lo previsto. En la medicina clínica, se espera que los métodos de análisis de la invención que sean más objetivos y reproducibles en comparación con las técnicas de imagenología actuales (es decir, mamografía y ultrasonido), cuyo éxito puede ser dependiente del operador.

25 Los "análisis de panel" se pueden adaptar teniendo en cuenta la aplicación clínica particular. Un panel de antígenos para la detección de autoanticuerpos contra al menos p53 y HER2-neu (c-erbB2) es particularmente útil para muchos tipos de cáncer y, opcionalmente, se puede complementar con otros marcadores que tienen una asociación conocida con el cáncer concreto, o una etapa del cáncer concreto, a detectar. Por ejemplo, para el cáncer de mama el panel podría incluir adicionalmente MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA y/o mamaglobina y/o  
30 EpCAM y/o EGFR y/o citoqueratinas y/o NY-ESO-1 y/o NY-BR-1 y/o anexina 11A y/o survivina mientras que para el cáncer de vejiga el panel podría opcionalmente incluir MUC 1 y/o c-myc, para cáncer colorrectal ras y/o APC y/o MUC2, para el cáncer de próstata PSA y/o BRCA-1 y/o BRCA2 y/o p62, para el cáncer de ovario BRCA1 y/o BRCA2 y/o CA125 y/o beta-HCG y/o calicreinas y/o APC y para el cáncer de pulmón livina y/o survivina y/o EpCAM y/o recoverina y/o citoqueratinas y/o 1-myc y o CEA y/o MUC 1 y/o recoverina, para el cáncer hepatocelular AFP y/o  
35 beta HCG y/o gp78 y/o p62 y/o survivina. Hay otras realizaciones preferidas en las que p53 o HER2-neu no son necesariamente esenciales.

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

40 p53 y MUC 1 con HER2-neu y/o c-myc, y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o NY-BR-1 y/o EpCAM y/o mamaglobina y/o survivina y/o anexina 11A y/o citoqueratinas y/o EpCAM opcionales; p53 y c-myc con HER2-neu y/o MUC1 y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o NY-BR-1 y/o EpCAM y/o mamaglobina y/o survivina y/o anexina 11A y/o citoqueratinas y/o EpCAM opcionales; p53 y BRCA1 con c-Erb2 y/o MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o NY-BR-1 y/o EpCAM y/o mamaglobina y/o survivina y/o anexina 11A y/o citoqueratinas y/o EpCAM opcionales; p53 y BRCA2 con HER2-neu y/o MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o NY-BR-1 y/o EpCAM y/o mamaglobina y/o survivina y/o anexina 11A y/o citoqueratinas y/o EpCAM opcionales; HER2-neu 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 NY-BR-1 y/o EpCAM y/o mamaglobina y/o survivina y/o anexina 11A y/o citoqueratinas y/o EpCAM; HER2-neu y c-myc con p53 y/o MUC1 y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o NY-BR-1 y/o EpCAM y/o mamaglobina y/o survivina y/o anexina 11A y/o citoqueratinas y/o EpCAM opcionales; HER2-neu 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 NY-BR-1 y/o EpCAM y/o mamaglobina y/o survivina y/o anexina 11A y/o citoqueratinas y/o EpCAM opcionales; HER2-neu y BRCA2 con p53 y/o MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o PSA y/o NY-ESO-1 y/o NY-BR-1 y/o EpCAM y/o mamaglobina y/o survivina y/o anexina 11A y/o citoqueratinas y/o EpCAM opcionales. Tales paneles también podrían incluir p53 y/o c-myc y/o NY-ESO-1 y/o BRCA2.

55 En el caso de cáncer colorrectal los paneles adecuados podrían seleccionarse por ejemplo entre los siguientes:

p53 y ras con HER2-neu y/o APC y/o MUC 2 opcionales; p53 y APC con HER2-neu y/o Ras y/o MUC2 opcionales; Ras y APC con p53 y/o HER2-neu y/o MUC2 opcionales. Tales paneles también podrían incluir CEA y/o 9-CA19.

60 En el caso de cáncer de próstata los paneles adecuados podrían seleccionarse por ejemplo entre los siguientes:

p53 y PSA con BRCA1 y/o BRCA2 y/o HER2-neu y/o p62;  
HER2-neu y PSA con p53 y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o p62 opcionales.

Tales paneles también podrían incluir PSMA y/o PSCA y/o calicreínas.

En el caso de cáncer de ovario los paneles adecuados podrían seleccionarse por ejemplo entre los siguientes:  
 5 p53 y CA125 con HER2-neu y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o APC opcionales;  
 HER2-neu y CA125 con p53 y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o APC opcionales.

Tales paneles también podrían incluir anexinas y/o CAGE y/o 4-5.

En el caso del cáncer de pulmón los paneles adecuados se pueden seleccionar entre:  
 10 p53 y NY-ESO-1, opcionalmente con marcadores adicionales;  
 HER2, anexinas, livina, survivina, recoverina, MUC 1, c-myc, 1-myc, CEA, beta HCG CAGE, y 4-5.

15 Cuando el método de la invención se utiliza para llevar a cabo un "análisis de panel" basado en dos o más antígenos marcadores de tumor derivados de proteínas diferentes, al menos uno de los antígenos del panel debe ser sometido a ensayo en un análisis de titulación cruzada de acuerdo con la invención, basado en un ensayo de dos o más diluciones de la muestra de ensayo frente a múltiples cantidades diferentes de antígeno para formar una serie de curvas de titulación, una para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada. Preferiblemente, cada uno de los antígenos que forman el panel se somete a ensayo de acuerdo con el análisis de titulación cruzada de la invención y una serie de curvas de titulación trazadas/calculadas para cada antígeno individual en el panel.

20 La invención también contempla que se pueda utilizar un análisis de titulación cruzada para la detección de al menos un anticuerpo anti-marcador tumoral combinado con un análisis diseñado para detectar al menos una *proteína marcadora de tumores* (que puede estar relacionada o no con el antígeno utilizado en el análisis de titulación cruzada) en la misma muestra del paciente. De este modo, los análisis para autoanticuerpos anti-marcadores tumorales y los análisis para proteínas marcadoras de tumores se puede llevar a cabo en paralelo en una única muestra del paciente.

25 En una realización adicional, el método de inmunoanálisis de la invención se puede utilizar en la selección de una vacuna contra el cáncer para su uso en un paciente concreto. En esta realización se somete a ensayo una muestra de fluido corporal tomada del paciente usando un panel de dos o más antígenos, cada uno correspondiente a una proteína marcadora de tumores diferente, para determinar la fuerza relativa de la respuesta inmunitaria del paciente a cada una de las proteínas marcadoras de tumores diferentes. La "fuerza de la respuesta inmunitaria" a una o varias proteínas marcadoras de tumores dadas se indica por la presencia y/o la cantidad de autoanticuerpos asociados con cáncer específicos para esa proteína marcadora de tumores detectada usando el inmunoanálisis;  
 35 donde los autoanticuerpos se cuantifican, a mayor nivel de auto-anticuerpos asociados al cáncer, más fuerte es la respuesta inmunitaria. La proteína o proteínas marcadoras de tumores identificadas por provocar la respuesta inmunitaria más fuerte o respuestas fuertes en el paciente (es decir, el nivel más alto de autoanticuerpos) es o son seleccionadas después para formar la base de una vacuna contra el cáncer para su uso en el paciente.

40 La utilidad del método de la invención no se limita a la detección de autoanticuerpos anti-tumorales, aunque el análisis es particularmente útil para este propósito. El cáncer es sólo un ejemplo de una enfermedad donde la detección de autoanticuerpos se puede usar como un marcador biológico para el estado de enfermedad/susceptibilidad a la enfermedad. Los autores de la presente invención han demostrado que se obtienen ventajas sustanciales mediante el uso de un enfoque de titulación cruzada para detectar autoanticuerpos en  
 45 muestras de pacientes. Por tanto, es razonable concluir que se obtendrán ventajas similares con el uso del enfoque de titulación cruzada para detectar autoanticuerpos que son marcadores biológicos para enfermedades distintas del cáncer. El método es aplicable por lo tanto a la detección de cualquier autoanticuerpo que sirva como un marcador biológico para un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, en cualquier enfermedad que se ha demostrado (o se puede demostrar) que está asociada con la producción de autoanticuerpos.

50 Otras aplicaciones del método de la invención incluyen, pero no están limitadas a, la detección de autoanticuerpos que son marcadores biológicos de enfermedades autoinmunitarias, tales como por ejemplo la artritis reumatoide, el lupus eritematoso generalizado (LEG), cirrosis biliar primaria (CBP), 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 de Tipo 1) o miastenia grave y el escrutinio de muestras de pacientes para la enfermedad renal o hepática que conduce a insuficiencia o fallo de cualquier órgano, y para el escrutinio de muestras de pacientes post-trasplante para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra el tejido enfermo (que se ha dejado in situ tras el trasplante) o contra el tejido trasplantado.

60 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para detectar un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en donde dicho anticuerpo está dirigido a una sustancia foránea introducida en dicho sujeto mamífero, comprendiendo el método:

1. (a) por separado poner en contacto dos o más diluciones diferentes de muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,
2. (b) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada combinación de muestra de ensayo y antígeno usada en la etapa (a),
3. (c) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en la etapa (a), en donde la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el análisis está indicada por una curva generalmente en forma de S o sigmoidea para lo menos dos diferentes concentraciones de la muestra de ensayo.

En este aspecto de la invención, la metodología de titulación cruzada se puede utilizar para evaluar la respuesta inmunitaria de un sujeto mamífero, y preferiblemente un sujeto humano, a cualquier sustancia foránea introducida en dicho sujeto.

En una realización, la sustancia foránea puede ser un agente terapéutico, tal como por ejemplo un fármaco o profármaco, una terapia con anticuerpo humano o vacuna. El método de la invención puede ser usado para evaluar si la administración de un agente terapéutico a un paciente desencadena una respuesta inmunitaria que conduce a la producción de anticuerpos específicos para un epítipo en el agente terapéutico, o un componente de un vehículo de liberación, excipiente, portador etc. administrado con el agente terapéutico.

Los antígenos usados en esta realización de la invención pueden ser sintéticos o de origen natural.

La naturaleza precisa del agente terapéutico no es limitante para la invención. En realizaciones no limitantes se puede utilizar el método de la invención para evaluar la respuesta inmunitaria a las pequeñas moléculas 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, portadores o vehículos de liberación.

En una realización útil el método de la invención se puede utilizar para evaluar la respuesta inmunitaria a una porción no diana de un agente terapéutico o vacuna. Por "no diana" se entiende una parte componente del agente terapéutico o vacuna administrados que, en el caso de un agente terapéutico, no contribuye directamente a la actividad terapéutica o, en el caso de una vacuna, no se pretende que provoque la producción de anticuerpos en el anfitrión. La porción no diana puede estar presente, por ejemplo, para facilitar la purificación del agente terapéutico o vacuna o se puede diseñar para que ayude a la liberación, la absorción o el redireccionamiento del agente terapéutico/vacuna. Los ejemplos de tales porciones "no diana" incluyen, pero no están limitadas a, conectores o marcadores comúnmente unidos a polipéptidos expresados recombinantemente, tales como marcas de biotina, etiquetas de histidina etc.

En otra realización de este aspecto de la invención, la sustancia foránea puede ser un agente infeccioso, tal como hongos, bacterias, virus o parásitos.

La invención se comprenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos experimentales no limitantes:

#### **Ejemplo 1 - Protocolo general para la titulación de antígeno mediante Concentración de Suero y de Antígeno Óptima (OSAAC) en un análisis de autoanticuerpos**

Las muestras de antígenos marcadores tumorales se pueden preparar mediante expresión recombinante, siguiendo métodos análogos a los descritos en el documento WO 99/58978.

Brevemente, los ADNc que codificaban los antígenos marcadores de interés se clonaron en el vector pET21 (Invitrogen), que había sido modificado para codificar una etiqueta de biotina y una etiqueta 6xhistidine para ayudar en la purificación de la proteína expresada. Los clones resultantes se cultivaron en una célula anfitriona bacteriana adecuada (en cuerpos de inclusión), las bacterias se lisaron y se desnaturalizaron y los antígenos expresados se recuperaron por medio de columnas de afinidad con quelato de níquel (Hi-Trap, asequible comercialmente de Amersham, siguiendo el protocolo del fabricante). Los antígenos expresados se renaturalizaron mediante diálisis en tampón apropiado y el rendimiento de la proteína expresada evaluó mediante SDS-PAGE, transferencia Western y ELISA y se cuantificó antes de su almacenamiento. A menos que se indique lo contrario, todos los antígenos utilizados en los siguientes ejemplos se prepararon mediante la expresión recombinante del vector pET21 modificado y por lo tanto se expresaron como proteínas de fusión que comprendían una etiqueta de biotilación N-terminal (derivada de pET21) y una etiqueta His C-terminal.

Los números de acceso GenBank para diversos ADNc marcadores (o las proteínas codificadas) son los siguientes:  
P53: B003596

c-myc: V00568  
HER2 (erbB-2) isoforma a: NP\_004439

- 5 1. 1. Los antígenos se diluyeron a concentraciones apropiadas en tampón carbonato 0,1 M, después se diluyeron seriadamente para formar un intervalo de titulación semi log (véase la tabla 1). Las diluciones del antígeno se dispensaron en 50µl/pocillo en las filas de una placa de microtitulación Falcon de acuerdo con la disposición de la placa utilizando una estación robótica de pipeteado Tecan Evolyzer. Las placas se cubrieron y se almacenaron a 4°C durante 48 h.
- 10 2. 2. Las placas se lavaron una vez en PBS + Tween 20 al 0,1% utilizando un lavador de placas automático, a continuación se secaron presionando sobre un pañuelo de papel.
3. 3. Las placas se bloquearon con tampón de incubación de alta concentración de sal (HSB, PBS + NaCl 0,5 M + caseína al 0,1%) a 200 µl/pocillo durante 90 minutos (almacenar cubiertas a 4°C).
- 15 4. 4. Durante la incubación de bloqueo, las muestras de suero se descongelaron, se sometieron a vórtice y se diluyeron seriadamente en una serie de semi log de 1/30 a 1/10.000 en HSB a temperatura ambiente en tubos.
5. 5. Las placas se vaciaron y se secaron presionando sobre un pañuelo de papel. Las muestras de suero diluidas se dispensaron a 50 µl/pocillo en todos los pocillos de la placa de microtitulación usando una pipeta multicanal electrónica para formar un intervalo de titulación semi log (véase tabla 1). Placas se cubrieron y se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente con sacudimiento.
- 20 6. 6. Etapa de lavado: las placas se lavaron tres veces en PBS + Tween 20 al 0,1% utilizando un lavador de placas automático, después se secaron presionando sobre un pañuelo de papel.
7. 7. Se dispensó anti-Ig humana de conejo conjugada 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 conjugada con HRP (1/1000 en HSB) en los pocillos de control que contenían anticuerpo anti-antígeno. Las placas se incubaron a continuación a temperatura ambiente durante 1 hora con sacudimiento.
- 25 8. 8. Las placas Se lavaron como en la etapa 6.
9. 9. Se añadió sustrato TMB preparado previamente a 50 µl/pocillo y la placa se incubó en el banco durante 10 min. Las placas se golpearon suavemente para mezclar.
- 30 10. 10. La densidad óptica de los pocillos se determinó a 650 nm utilizando un protocolo de lector de placas normalizado.

Tabla 1: Diseños de placas convencionales

|   | 1                     | 2                     | 3                         | 4                         | 5                         | 6                         | 7                         | 8                         | 9                         | 10                        | 11                        | 12                        |
|---|-----------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| A | antígeno<br>10 µg/ml  | antígeno<br>10 µg/ml  | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      | antígeno<br>10 µg/ml      |
|   | Suero a 1<br>en 30    | Suero a 1<br>en 100   | Suero a 1<br>en 300       | Suero a 1<br>en 1000      | Suero a 1<br>en 3000      | Suero a 1<br>en 10000     | Suero a 1<br>en 30000     | Suero a 1<br>en 100000    | Suero a 1<br>en 300000    | Suero a 1<br>en 1000000   | Suero a 1<br>en 3000000   | Suero a 1<br>en 10000000  |
| B | antígeno<br>3 µg/ml   | antígeno<br>3 µg/ml   | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       | antígeno<br>3 µg/ml       |
|   | Suero a 1<br>en 30    | Suero a 1<br>en 100   | Suero a 1<br>en 300       | Suero a 1<br>en 1000      | Suero a 1<br>en 3000      | Suero a 1<br>en 10000     | Suero a 1<br>en 30000     | Suero a 1<br>en 100000    | Suero a 1<br>en 300000    | Suero a 1<br>en 1000000   | Suero a 1<br>en 3000000   | Suero a 1<br>en 10000000  |
| C | antígeno<br>1 µg/ml   | antígeno<br>1 µg/ml   | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       | antígeno<br>1 µg/ml       |
|   | Suero a 1<br>en 30    | Suero a 1<br>en 100   | Suero a 1<br>en 300       | Suero a 1<br>en 1000      | Suero a 1<br>en 3000      | Suero a 1<br>en 10000     | Suero a 1<br>en 30000     | Suero a 1<br>en 100000    | Suero a 1<br>en 300000    | Suero a 1<br>en 1000000   | Suero a 1<br>en 3000000   | Suero a 1<br>en 10000000  |
| D | antígeno<br>0,3 µg/ml | antígeno<br>0,3 µg/ml | antígeno<br>0,03<br>µg/ml |
|   | Suero a 1<br>en 30    | Suero a 1<br>en 100   | Suero a 1<br>en 300       | Suero a 1<br>en 1000      | Suero a 1<br>en 3000      | Suero a 1<br>en 10000     | Suero a 1<br>en 30000     | Suero a 1<br>en 100000    | Suero a 1<br>en 300000    | Suero a 1<br>en 1000000   | Suero a 1<br>en 3000000   | Suero a 1<br>en 10000000  |
| E | antígeno<br>0,1 µg/ml | antígeno<br>0,1 µg/ml | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     | antígeno<br>0,1 µg/ml     |
|   | Suero a 1<br>en 30    | Suero a 1<br>en 100   | Suero a 1<br>en 300       | Suero a 1<br>en 1000      | Suero a 1<br>en 3000      | Suero a 1<br>en 10000     | Suero a 1<br>en 30000     | Suero a 1<br>en 100000    | Suero a 1<br>en 300000    | Suero a 1<br>en 1000000   | Suero a 1<br>en 3000000   | Suero a 1<br>en 10000000  |
| F | antígeno<br>0,03      | antígeno<br>0,03      | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          | antígeno<br>0,03          |

|   |                     |   |                     |   |                     |   |                     |   |                     |    |                     |    |
|---|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|----|---------------------|----|
|   | 1                   | 2 | 3                   | 4 | 5                   | 6 | 7                   | 8 | 9                   | 10 | 11                  | 12 |
|   | µg/ml               |    | µg/ml               |    |
|   | Suero a 1 en 30     |   | Suero a 1 en 100    |   | Suero a 1 en 300    |   | Suero a 1 en 1000   |   | Suero a 1 en 3000   |    | Suero a 1 en 10000  |    |
| G | antígeno 0,01 µg/ml |    | antígeno 0,01 µg/ml |    |
|   | Suero a 1 en 30     |   | Suero a 1 en 100    |   | Suero a 1 en 300    |   | Suero a 1 en 1000   |   | Suero a 1 en 3000   |    | Suero a 1 en 10000  |    |
| H | tampón carbonato    |    | tampón carbonato    |    |

5 Las curvas de titulación de antígeno se construyeron utilizando los valores medios de los duplicados para cada muestra de toda la gama de diluciones de suero. Un valor que corresponde al nivel de la unión no específica para cada dilución de suero se calculó restando un nivel de fondo (suero a 1/10.000 y sin antígeno) del valor obtenido para la unión sin antígeno para cada dilución de suero. Esto se usó a continuación para corregir la unión no específica en cada conjunto de duplicados.

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

10 Los siguientes datos se obtuvieron de un estudio piloto para evaluar la sensibilidad y la reproducibilidad de un panel de análisis de titulación cruzada de autoanticuerpos (OSAAC) en cáncer de mama primario (PBC). El estudio incluyó suero de 14 mujeres sin evidencia de cáncer y muestras de suero pre-operatorias de 14 mujeres con cáncer de mama primario. Muestras normales y de cáncer se emparejaron por edades.

15 El análisis se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo dado en el ejemplo 1 usando los antígenos p53 y c-myc. Tuvieron que ser retiradas del estudio dos muestras normales (una para p53) ya que demostraron niveles extremadamente altos y sostenidos de unión a autoanticuerpos a través de un intervalo de concentraciones de suero y antígeno.

20 La Figura 1 muestra ejemplos de curvas obtenidas cuando se utilizó el análisis de titulación cruzada para medir autoanticuerpos p53 y c-myc en suero. Se puede observar que para algunas muestras (por ejemplo, muestras 17179 y 18781), se obtuvieron intervalos de titulación dando las señales más fuertes los sueros más concentrados como se esperaba. Sin embargo en otras muestras (por ejemplo, muestras 19150 y 18057), las curvas fueron esencialmente plana pero con una señal creciente a medida que aumentaba la concentración de suero. Se consideró que esto se debía a la unión no específica de las inmunoglobulinas del suero y se compensó por la corrección de la unión no específica como se ha descrito anteriormente.

30 Los niveles de autoanticuerpos se expresan como la densidad óptica (650 nm) debida a la unión al antígeno de ensayo menos la debida a la unión no específica. Se calculó el corte normal como el percentil 95<sup>o</sup> (media + 2 desviaciones típicas) del grupo normal. Las muestras se consideraron positivas si mostraban niveles por encima del corte en al menos 2 diluciones de suero entre 1/30 y 1/1000 y 2 concentraciones de antígeno entre 10 µg/ml y 1 µg/ml. Las muestras positivas se identifican en la tabla 2.

35 Tabla 2: Positividad de las mediciones de AAb en sueros normales y de cáncer de mama. Una muestra se consideró positiva si el valor corregido de la unión no específica era mayor que la media + 2 DT de las muestras normales sometidas a ensayo en al menos dos concentraciones de antígeno Y dos diluciones de suero.

| Antígeno     | Muestras de suero positivas |                     |       |
|--------------|-----------------------------|---------------------|-------|
|              | Normal                      | PBC                 |       |
| p53          | J001                        | 17179               | 18781 |
|              |                             | 18237               | 19502 |
|              |                             | 18927               | 19622 |
|              |                             | asociación p53 + ve |       |
| <b>Total</b> | <b>1/14 (7%)</b>            | <b>7/14 (50%)</b>   |       |
| c-myc        | J001                        | 17179               | 18781 |

| Antígeno     | Muestras de suero positivas |                   |                     |
|--------------|-----------------------------|-------------------|---------------------|
|              | Normal                      | PBC               |                     |
|              | J041                        | 18237             | 18964               |
|              |                             |                   | asociación p53 + ve |
| <b>Total</b> |                             | <b>2/14 (14%)</b> | <b>5/14 (36%)</b>   |

**Ejemplo 3 - Análisis de la sensibilidad y especificidad de los ensayos de titulación cruzada en comparación con titulación de antígeno solo**

- 5 Las mediciones de autoanticuerpos (AAb) se realizaron en 14 mujeres con cáncer de mama primario (PBC) usando tanto un análisis de titulación cruzada (OSAAC) como un método de titulación de antígeno solo en el que las mediciones de autoanticuerpos se realizaron únicamente a una dilución de suero de 1/100. Las muestras se consideraron positivas cuando superaron los niveles de corte, tanto a 10 como 3 µg/ml en una curva de titulación del antígeno. La Tabla 2 de más abajo muestra una comparación directa de los dos métodos:
- 10 Tabla 3: Comparación del método de titulación del antígeno de cálculo de las sensibilidades de AAb en sólo una dilución de suero en comparación con el análisis de OSAAC.

| Antígeno | Método de titulación antígeno | Análisis OSAAC |             |
|----------|-------------------------------|----------------|-------------|
| p53      | sensibilidad                  | 5/14 (36%)     | 7/14 (50%)  |
|          | especificidad                 | 13/14 (93%)    | 13/14 (93%) |
| c-myc    | sensibilidad                  | 3/14 (21%)     | 5/14 (36%)  |
|          | especificidad                 | 12/14 (86%)    | 12/14 (86%) |

- 15 Se puede observar que mediante el uso de una serie de curvas de titulación de antígeno en las que se varían tanto la concentración de antígeno como la concentración de suero, se obtuvieron tanto una sensibilidad mayor como al menos especificidad tan buena en comparación con las curvas de titulación en las que se varía solo la concentración de antígeno.

- 20 Se ha demostrado que el análisis de titulación cruzada (OSAAC) para la medición de autoanticuerpos es superior a un ensayo basado en la titulación del antígeno frente a una sola dilución de suero en términos de sensibilidad para la detección de cáncer de mama primario. Este es el caso tanto de los anticuerpos tanto p53 como c-myc y no hay ninguna razón para suponer que este no sea el caso para una serie de antígenos. Sin estar limitado por la teoría, el solicitante considera que hay numerosas razones para la mayor sensibilidad observada en los análisis basados en la titulación cruzada de antígeno y muestra de ensayo.

- 25 1. (i) El formato de análisis un intervalo dinámico mucho más amplio. Esto proporciona el alcance para detectar tanto los anticuerpos de baja afinidad a concentraciones altas de antígeno, así como los anticuerpos de alta abundancia que de otro modo se acoplarían a la alta concentración de antígeno.
- 30 2. (ii) Se pueden detectar anticuerpos de baja abundancia que pueden estar enmascarados por altos niveles de unión no específica a una concentración de suero baja.
3. (iii) Los criterios estrictos para definir una muestra como positiva (por encima de la media + 2 DT de una población normal para al menos 2 concentraciones de antígeno y 2 diluciones de suero) aplicados aquí significan que el técnico puede estar más convencido de que una medición positiva es un verdadero positivo.

35 **Ejemplo 4 - Detección de sueros de cáncer de mama primario mediante titulación cruzada de antígenos**

- 40 Se utilizaron en este estudio sueros de mujeres con cáncer de mama primario (PBC, n = 8 (los 6 sueros PBC fueron los mismos entre todos los antígenos y 2 sueros PBC fueron específicos para cualquiera de las proteínas p53 o ECD6)) y de mujeres que no tienen evidencia de enfermedad maligna (n = 10). El análisis se realizó por duplicado utilizando una modificación del protocolo general descrito en el Ejemplo 1. Brevemente se recubrió un conjunto de placas de microtitulación con proteínas antigénicas: p53, ECD6 (también conocido como el dominio externo HER2), o un fragmento 3' de ECD6 recombinantes. El antígeno ECD6 comprende los aminoácidos 1 a 647 de la secuencia de aminoácidos de HER2 (erbB-2) completa mostrada con el acceso NM\_004439 fusionada a una secuencia de biotilación N-terminal y una etiqueta His C-terminal. El antígeno del fragmento 3' de ECD6 comprende los aminoácidos 361 a 647 de la secuencia de aminoácidos de HER2 (erbB-2) completa mostrada en el acceso NM\_004439, fusionada de nuevo a una secuencia de biotilación N-terminal y una etiqueta His C-terminal.

5 Los antígenos se titularon seriadamente para cada placa a concentraciones (de arriba abajo) de 160 nM, 50 nM, 16 nM, 5 nM, 1,6 nM, 0,5 nM, 0,16 nM. Se incluyó un control "sin antígeno" de tampón solo como fila inferior de cada placa. Se dejó que los antígenos se adsorbieran durante 48 horas, después de lo cual las placas se lavaron y se bloquearon durante 90 min con PBS que contenía caseína (0,1% p/v) y NaCl (0,5 M).

10 Durante la incubación de bloqueo se preparó un conjunto de titulaciones de suero seriadas en tubos, a diluciones de 1:1600, 1:800, 1:400, 1:200, 1:100 y 1:50. Tras la eliminación del tampón de bloqueo, estas se añadieron a las placas recubiertas de antígeno (diluciones 1:1600, 1:800, 1:400, 1:200, 1:100 y 1:50 añadidas a través de las placas de izquierda a derecha) y se incubaron durante 90 min. El resto del análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 1. (El diseño de la placa se resume en la Figura 2)

15 Se construyeron curvas de titulación de antígeno utilizando los valores medios de los duplicados para cada muestra de todo el intervalo de diluciones de suero. Se alcanzó un valor correspondiente al nivel respuesta de autoanticuerpos restando el fondo no específico (respuesta del suero frente al antígeno 0,16 nM).

**Resultados**

20 En las Figuras 3 a 7 se muestran curvas de titulación representativas. Se puede observar que para algunas muestras (por ejemplo, muestras 20642 y 20620 para ECD6), se obtuvo un intervalo de titulaciones dando las señales más fuertes los sueros más concentrados como se esperaba. Sin embargo en otras muestras (por ejemplo, muestras MVV272 y EA0220 para el fragmento 3' ECD6), las curvas fueron esencialmente planas pero con una señal creciente a medida que aumentaba la concentración de suero. Se consideró que esto se debía a la unión no específica de inmunoglobulinas del suero.

25 Los cortes positivos se calcularon como la media + 2 DT de la población normal. Las muestras se consideraron positivas si mostraban niveles por encima del corte en ambas rondas y a concentraciones de antígeno 160 Nm o 50 nM. La Tabla 4 demuestra que una dilución de suero de 1:100 utilizada actualmente para la detección de autoanticuerpos no es siempre óptima. Además, la tabla muestra que hay una variación inter-antígeno de la dilución de suero óptima. El nivel más alto de sensibilidad para ECD6 fue del 75% cuando el suero se diluyó 1:50. Esto era lo contrario para el fragmento 3' de ECD6 donde 1:50 tuvo una sensibilidad de 0%. Esto fue debido en parte al aumento de la señal frente al fragmento 3' de ECD6 en las muestras normales analizadas (por ejemplo, muestras MMV272 y EA0220).

35 **Tabla 4:** Sensibilidad del análisis de autoanticuerpos frente a 8 muestras de PBC analizadas para cada antígeno. Una muestra se consideró positiva si el valor corregido de la unión no específica era superior a la media + 2 DT de las muestras normales sometidas a ensayo a cualquiera de las dos concentraciones de antígeno.

|            | Dilución de suero |       |       |       |       |       |
|------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 1:1600            | 1:800 | 1:400 | 1:200 | 1:100 | 1:50  |
| p53        | 0%                | 25%   | 37,5% | 37,5% | 37,5% | 37,5% |
| ECD6       | 25%               | 37,5% | 50%   | 50%   | 50%   | 75%   |
| 3' de ECD6 | 37,5%             | 37,5% | 37,5% | 37,5% | 12,5% | 0%    |

40 La Tabla 5 resume la especificidad del análisis donde el suero se diluye a diferentes concentraciones. No se observó diferencia en la especificidad del análisis utilizando las muestras analizadas en este ensayo.

45 **Tabla 5:** Especificidad del análisis de autoanticuerpos con las 10 muestras de PBC. Una muestra se consideró positiva si el valor corregido de la unión no específica era superior a la media + 2 DT de las muestras normales sometidas a ensayo a cualquiera de dos concentraciones de antígeno.

|            | Dilución de suero |       |       |       |       |      |
|------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|------|
|            | 1:1600            | 1:800 | 1:400 | 1:200 | 1:100 | 1:50 |
| p53        | 100%              | 100%  | 100%  | 100%  | 100%  | 100% |
| ECD6       | 100%              | 100%  | 100%  | 100%  | 100%  | 100% |
| 3' de ECD6 | 100%              | 100%  | 100%  | 100%  | 100%  | 100% |

5 En la Tabla 6 la dilución óptima de suero se compara con los 6 sueros de PBC que se analizaron frente a todos los antígenos. La dilución óptima de suero es la dilución más alta en la que se puede detectar una respuesta de autoanticuerpos. A modo de ejemplo, el suero 20628 se pudo diluir a 1:800 y se pudo detectar una respuesta (es decir, autoanticuerpos) contra p53, pero se necesitó diluir el mismo suero a 1:50 para la detección de los autoanticuerpos para ECD6. La dilución óptima para este antígeno sería por lo tanto 1:50 de manera que todas las respuestas de autoanticuerpos positivas pudieran ser identificadas.

10 **Tabla 6:** Dilución inter-individuo óptima de las 6 muestras de suero PBC que se analizaron frente a todos los antígenos. Donde se muestra la dilución más baja que se requirió para detectar una respuesta de autoanticuerpos contra cualquiera de P53, ECD6 o fragmento 3' ECD6.

| Suero | Dilución óptima por antígeno |        |         | Dilución óptima |
|-------|------------------------------|--------|---------|-----------------|
|       | P53                          | ECD6   | ECD6 3' |                 |
| 20593 | -                            | -      | -       | -               |
| 20641 | -                            | 1:50   | -       | 1:50            |
| 20620 | -                            | 1:1600 | 1:1600  | 1:1600          |
| 20639 | -                            | -      | -       | -               |
| 20628 | 1:800                        | 1:50   | -       | 1:50            |
| 20642 | 1:400                        | 1:400  | -       | 1:400           |

15 La Tabla 7 resume el aumento de la sensibilidad de ensayo general para la detección del cáncer de mama primario cuando se usa el método de titulación cruzada para detectar autoanticuerpos contra cada uno de los antígenos sometidos a ensayo.

20 **Tabla 7:** Sensibilidad y especificidad del análisis utilizando tanto ECD6 como el fragmento 3' de ECD6 si se utiliza el análisis de titulación cruzada en lugar de suero diluido a 1:100 para las 6 muestras de suero de PBC analizadas frente a todos los antígenos.

|               | Titulación Cruzada | Suero a 1:100 |
|---------------|--------------------|---------------|
| Sensibilidad  | 66,7%              | 33,3%         |
| Especificidad | 100%               | 100%          |

### Conclusiones

25 Se ha demostrado que el análisis OSAAC para la medición de autoanticuerpos es superior a la titulación del antígeno solo en términos de sensibilidad para la detección de cáncer de mama primario. Este es el caso para los autoanticuerpos p53, ECD6 y 3' de ECD6 y no hay ninguna razón para suponer que esto no sea cierto para todos los autoanticuerpos marcadores tumorales. Parece que esto es debido al hecho de que este formato de análisis tiene un intervalo dinámico mucho más amplio. Esto proporciona el alcance para detectar tanto autoanticuerpos de baja afinidad a elevadas concentraciones de antígeno, como autoanticuerpos de alta abundancia que de otro modo se acoplarían a la elevada concentración de antígeno.

30 Además, parece posible que los autoanticuerpos de baja abundancia que pueden estar enmascarado por los altos niveles de unión no específica puedan ser detectado a una baja concentración de suero.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método detectar un anticuerpo en una muestra de ensayo desconocida, en donde la muestra de ensayo comprende un fluido corporal de dicho sujeto mamífero y donde dicho anticuerpo es un marcador biológico de estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, cuyo método comprende:
- (a) preparar dos o más diluciones diferentes de dicha muestra de ensayo y llevar a cabo las siguientes etapas (i) y (ii) con respecto a cada dilución de la muestra de ensayo:
- (i) poner en contacto la dilución de la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,
- (ii) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (i),
- (b) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en la etapa (a), y
- (c) determinar la presencia o ausencia de dicho estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad basándose en la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo y la cantidad de antígeno sometidos a ensayo, en donde un resultado positivo para determinar la presencia del anticuerpo en la muestra de ensayo se puntúa por comparación con un resultado de corte obtenido a partir de un grupo control de sujetos normales.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia o ausencia de dicho estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad se determina basándose en los valores colectivos de la cantidad de unión específica para todas las diluciones de las muestras de ensayo y las cantidades de antígenos sometidas a ensayo.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la presencia o ausencia de dicho estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad se determina mediante la evaluación de las curvas obtenidas en la etapa (b) para determinar la presencia de una o más curvas generalmente en forma de S o sigmoidea.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la presencia de dicho anticuerpo en la muestra de ensayo se indica por la presencia de una curva generalmente en forma de S o sigmoidea para al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo.
5. Un método para detectar un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en donde dicho anticuerpo es un marcador biológico de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, cuyo método comprende:
- (a) preparar dos o más diluciones diferentes de dicha muestra de ensayo y llevar a cabo las siguientes etapas (i) y (ii) con respecto a cada dilución de la muestra de ensayo:
- (i) poner en contacto la dilución de la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,
- (ii) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (i),
- (b) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en la etapa (a), en donde la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el análisis se indicado mediante una curva generalmente en forma de S o sigmoidea por lo menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo es un autoanticuerpo.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el autoanticuerpo es específico para una proteína marcadora de tumores.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el antígeno comprende una proteína marcadora de tumoreses o un fragmento antigénico o epítipo del mismo.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la proteína marcadora de tumores se selecciona del grupo que consiste de MUC1, MUC16, c-myc, EGFR, p53, ras, BRCA1, BRCA2, APC, HER2-neu, PSA, CEA, CA19.9, NY-ESO-I, 4-5, CAGE, PSMA, PSCA, EpCAM, citoqueratina, recoverina, calicreína, anexina, AFP, b-HCG, GRP78, CA125, mamaglobina, raf, NY-BR-I, livina, survivina, MUC2, endostatina, Bcl-2, BIRC7, HSP70, No55, uPA, tetranectina, prolactina, osteopontina, HE4, TATI, inhibina, vimentina, cox-1 y COX-2.
10. El uso del método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en
- (a) el diagnóstico, pronóstico o seguimiento del cáncer, o

- 5 (b) el escrutinio de una población de sujetos humanos asintomáticos para identificar los sujetos que tienen riesgo creciente de desarrollar cáncer, en donde las muestras que se van a someter a ensayo usando el método son muestras de fluido corporal tomadas de los sujetos, y en donde los sujetos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos, en comparación con los individuos de control normales, se identifican por tener riesgo de desarrollar cáncer, o
- 10 (c) la detección del cambio neoplásico temprano o cancerígeno temprano en un sujeto asintomático humano, en donde la muestra que se va a someter a ensayo usando el método es una muestra de fluido corporal tomada del sujeto, y en donde la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos, en comparación con los individuos de control normales, se toma como una indicación de cambio neoplásico temprano o cancerígeno temprano en el sujeto, o
- 15 (c) el escrutinio de una población de sujetos humanos asintomáticos para identificar a aquellos sujetos que han desarrollado un cáncer, en donde las muestras que se va a someter a ensayo usando el método son muestras de fluido corporal tomadas de los sujetos, y en donde los sujetos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos, en comparación con los individuos de control normales, se diagnostican por tener un cáncer, o
- 20 (e) el ensayo sobre una población de sujetos humanos asintomáticos para identificar aquellos sujetos que han desarrollado un cáncer, en donde las muestras que se va a someter a ensayo usando el método son muestras de fluido corporal tomadas de los sujetos, y en donde los sujetos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos, en comparación con los individuos de control normales, se diagnostican por tener un cáncer, o
- 25 (f) el seguimiento del progreso del cáncer u otra enfermedad neoplásica en un paciente, en donde la muestra que se va a someter a ensayo usando el método es una muestra de fluido corporal tomada de un paciente humano, y en donde la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos, en comparación con un control normal, se toma como una indicación de la presencia de cáncer en el paciente, o
- 30 (g) la detección de una enfermedad recurrente en un paciente humano previamente diagnosticado de cáncer, cuyo paciente ha experimentado tratamiento contra el cáncer para reducir la cantidad de cáncer presente, en donde la muestra que se va a someter a ensayo usando el método es una muestra de fluido corporal tomada del paciente, y en donde la presencia de un nivel creciente de autoanticuerpos en el paciente, en comparación con un control normal, se toma como una indicación de que la enfermedad ha reaparecido, o
- 35 (h) la evaluación del pronóstico del cáncer, en donde la muestra que se va a someter a ensayo usando el método es una muestra de fluido corporal tomada de un paciente humano, y en donde la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos, en comparación con un control normal, se toma como una indicación del pronóstico del paciente a partir de su cáncer, o
- 40 (i) la predicción de la respuesta al tratamiento contra el cáncer, en donde la muestra que se va a someter a ensayo usando el método es una muestra de fluido corporal tomada de un paciente humano, y en donde la comparación del nivel de autoanticuerpos en dicho paciente con una relación previamente establecida entre los niveles de autoanticuerpos y el resultado probable del tratamiento se utiliza para proporcionar una indicación de si el paciente responderá a tal tratamiento contra el cáncer, o
- 45 (j) el seguimiento de la respuesta de un paciente de cáncer humano al tratamiento contra el cáncer, en donde la muestra que se va a someter a ensayo usando el método es una muestra de fluido corporal tomada del paciente, y en donde un cambio en el nivel de autoanticuerpos después del tratamiento se toma como una indicación de que el paciente ha respondido o no al tratamiento.
- 45 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 en la predicción de la respuesta al tratamiento contra el cáncer, en donde el tratamiento contra el cáncer es la vacunación, la terapia anti-factor de crecimiento o de transducción de la señal, radioterapia, terapia endocrina, terapia con anticuerpos humanos o quimioterapia.
- 50 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el seguimiento de la respuesta de un paciente de cáncer humano al tratamiento contra el cáncer, en donde el tratamiento es la vacunación, la terapia anti-factor de crecimiento o de transducción de la señal, radioterapia, terapia endocrina, terapia con anticuerpos humanos o quimioterapia y un cambio en el nivel de autoanticuerpos después del tratamiento se toma como una indicación de que el paciente ha respondido positivamente al tratamiento.
- 55 13. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo es un autoanticuerpo característico de o asociado con una enfermedad autoinmunitaria.
- 60 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado (LEG), cirrosis biliar primaria (CBP), tiroiditis autoinmune, tiroiditis de Hashimoto, gastritis autoinmune, anemia perniciosa, adrenalitis autoinmune, enfermedad de Addison, hipoparatiroidismo autoinmune, diabetes autoinmune o miastenia grave.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo es un autoanticuerpo característico de o asociado con enfermedad renal o hepática que conduce a insuficiencia o fallo de cualquier órgano.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está dirigido a un epítopo presente en el tejido trasplantado en el sujeto mamífero.
- 5 17. Un método para detectar un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en donde dicho anticuerpo está dirigido a una sustancia foránea introducida en dicho sujeto mamífero, comprendiendo el método:
- 10 (a) preparar dos o más diluciones diferentes de dicha muestra de ensayo y llevar a cabo las siguientes etapas (i) y (ii) con respecto a cada dilución de la muestra de ensayo:  
 (i) poner en contacto la dilución de la muestra de ensayo con una pluralidad de cantidades diferentes de un antígeno específico para dicho anticuerpo,  
 (ii) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (i),
- 15 (b) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo utilizada en la etapa (a), y en donde la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el análisis está indicada por una curva generalmente en forma de S o sigmoidea para al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo.
- 20 18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el sujeto mamífero es un ser humano.
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en donde la sustancia foránea es un agente terapéutico.
- 25 20. Un método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el agente terapéutico es un fármaco, profármaco, o terapia con anticuerpos.
21. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en donde la sustancia foránea es una vacuna.
- 30 22. Un método de acuerdo con la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en donde la sustancia foránea es una porción no diana de un agente terapéutico o vacuna.
23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la porción no diana es la biotina.
- 35 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en donde la sustancia foránea es un agente infeccioso tal como hongos, bacterias, virus o parásitos.
25. Un método de detección de dos o más anticuerpos en una muestra de ensayo que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, en donde al menos uno de dichos anticuerpos es un marcador biológico de un estado de enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad, cuyo método comprende:
- 40 (a) preparar dos o más diluciones diferentes de dicha muestra de ensayo y llevar a cabo las siguientes etapas (i) y (ii) con respecto a cada dilución de la muestra de ensayo:  
 (i) poner en contacto la dilución de la muestra de ensayo con dos o más conjuntos de antígenos, en donde cada uno de dichos conjuntos de antígenos es específico para uno de dichos anticuerpos que van a ser detectados en la muestra de ensayo y en donde cada conjunto de antígenos comprende una pluralidad de cantidades diferentes del mismo antígeno,  
 (ii) detectar la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno para cada cantidad de antígeno en cada conjunto de antígenos utilizados en la etapa (i),
- 45 (b) trazar o calcular una curva separada de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada dilución de la muestra de ensayo con cada conjunto de antígenos utilizado en la etapa (a), en donde la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpo reactivo con uno cualquiera de los conjuntos de antígenos utilizado en el análisis se indica por una curva generalmente en forma de S o sigmoidea para al menos dos diluciones diferentes de la muestra de ensayo con ese conjunto de antígenos.
- 50 26. Un método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde al menos uno de dichos dos o más anticuerpos es un autoanticuerpo.
- 55 27. Un método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde al menos uno de dichos dos o más anticuerpos es un autoanticuerpo específico para una proteína marcadora de tumores.
- 60

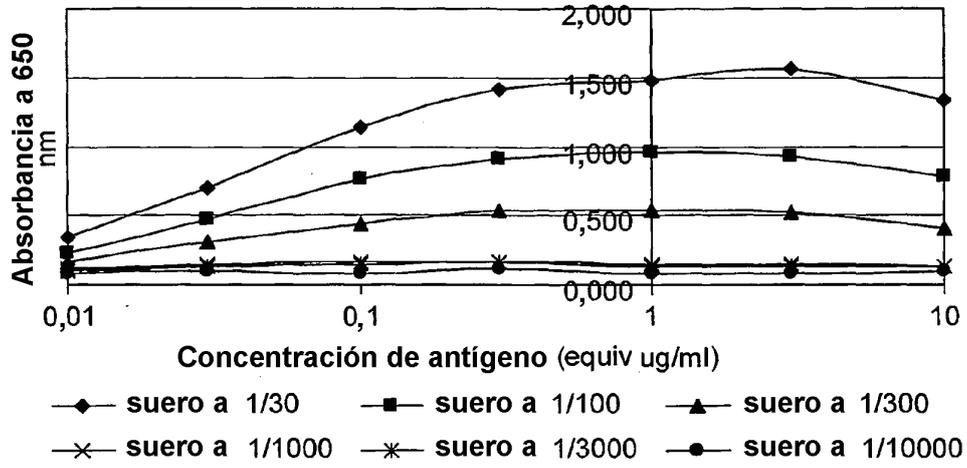


FIG. 1a

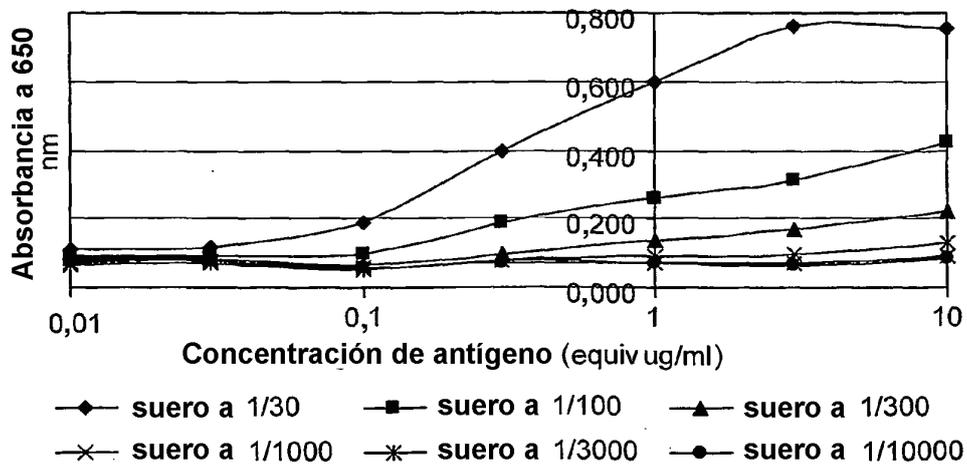


FIG. 1b

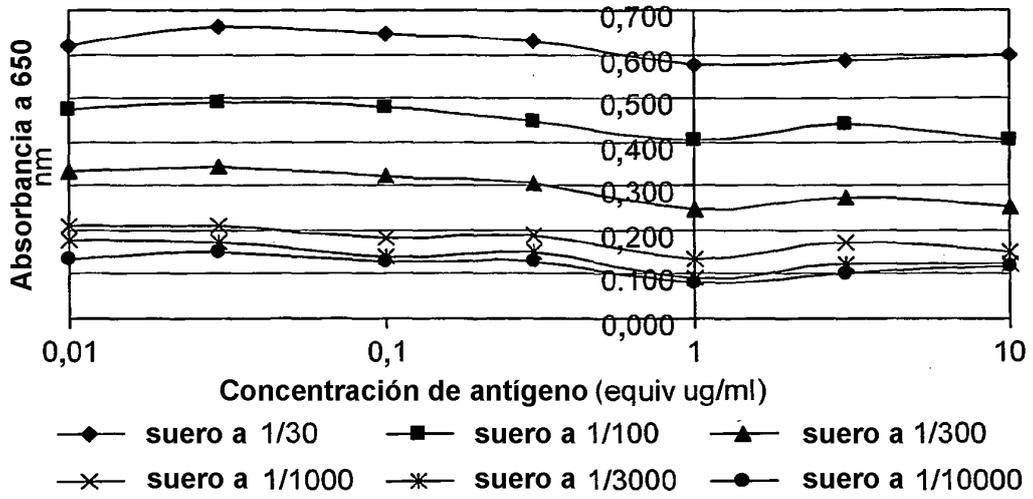


FIG. 1c

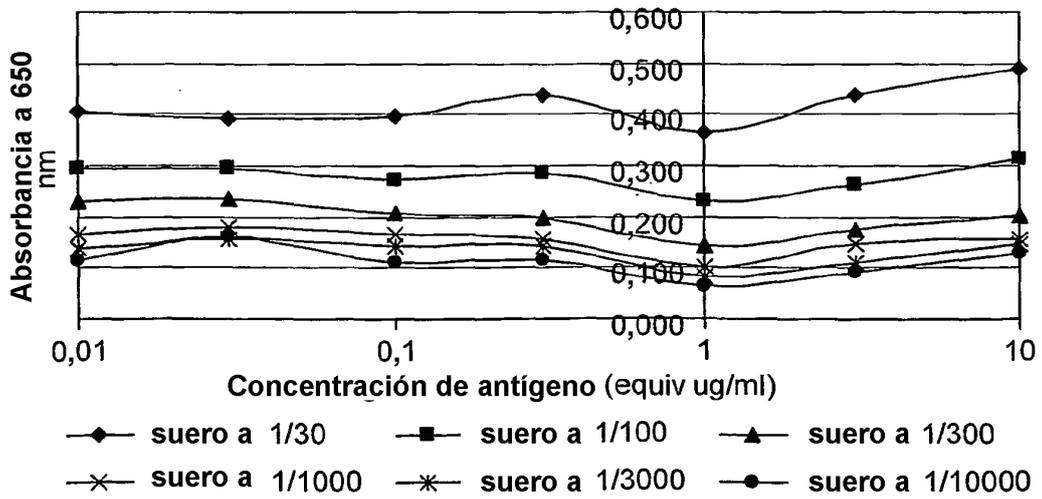


FIG. 1d

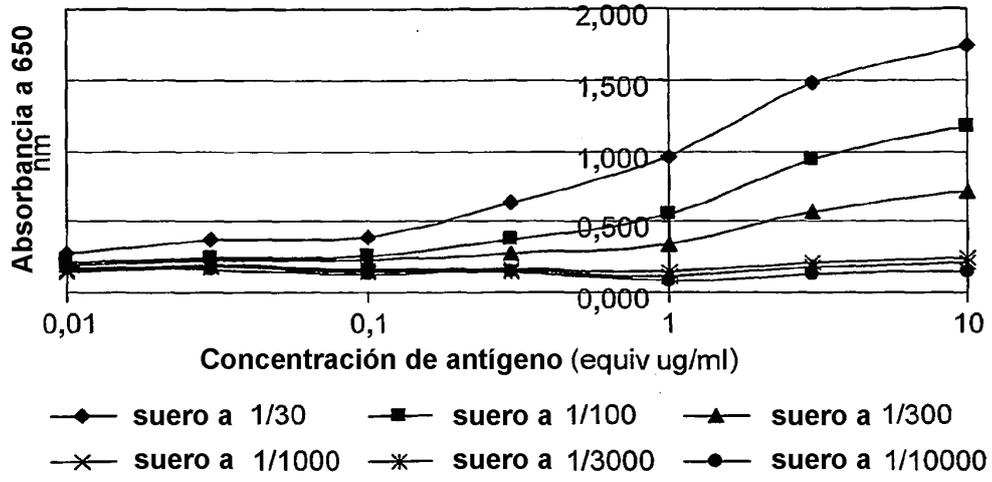


FIG. 1e

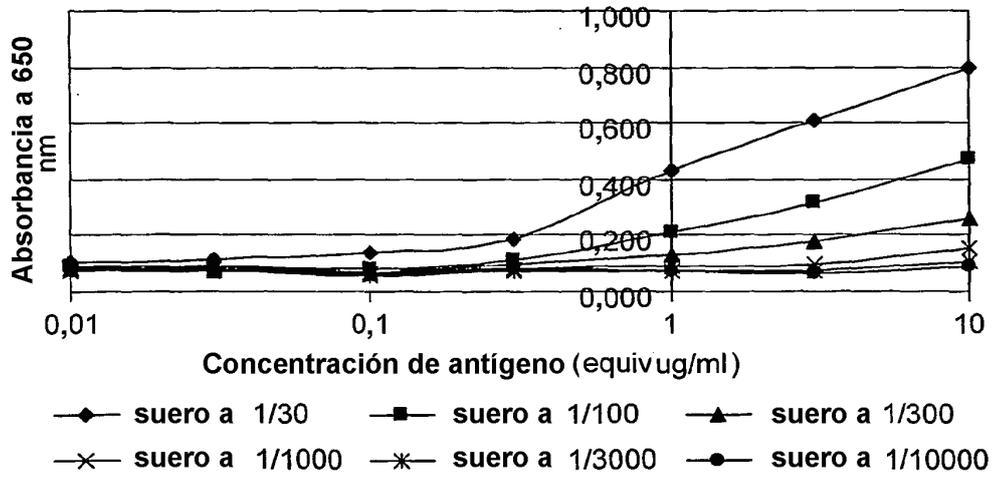


FIG. 1f

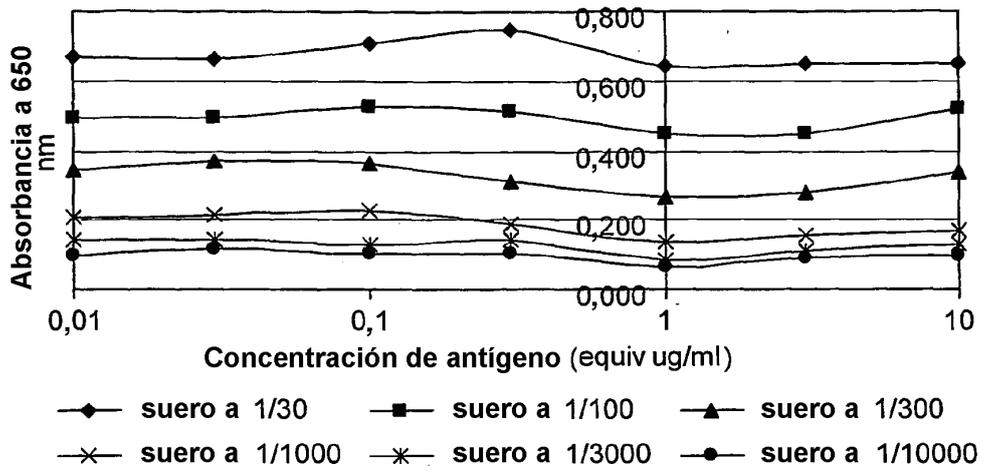


FIG. 1g

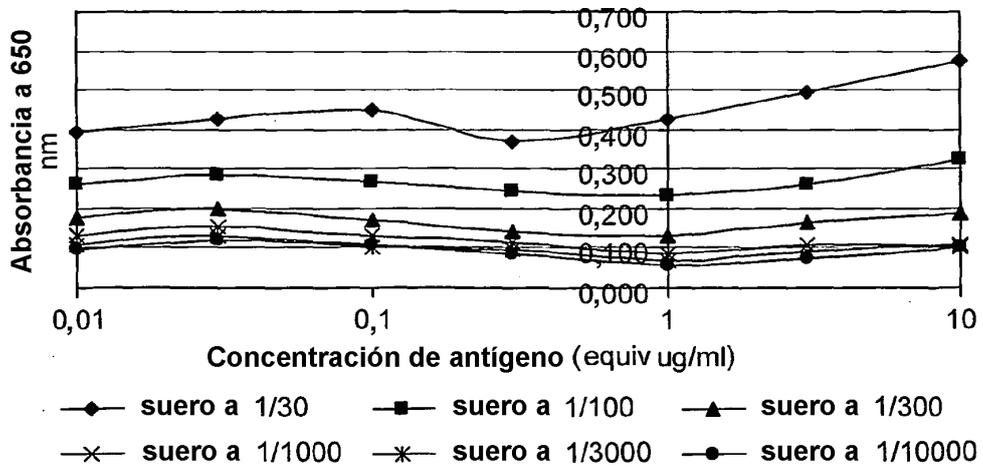


FIG. 1h

|   |   |        |       |       |          |         |      |   |   |    |    |    |
|---|---|--------|-------|-------|----------|---------|------|---|---|----|----|----|
|   | 1 | 2      | 3     | 4     | 5        | 6       | 7    | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | A |        |       |       | antígeno | 160 nm  |      |   |   |    |    |    |
|   | B |        |       |       | antígeno | 50 nm   |      |   |   |    |    |    |
|   | C |        |       |       | antígeno | 16 nm   |      |   |   |    |    |    |
|   | D |        |       |       | antígeno | 5 nm    |      |   |   |    |    |    |
|   | E |        |       |       | antígeno | 1,6 nm  |      |   |   |    |    |    |
|   | F |        |       |       | antígeno | 0,5 nm  |      |   |   |    |    |    |
|   | G |        |       |       | antígeno | 0,16 nm |      |   |   |    |    |    |
|   | H |        |       |       | tampón   |         |      |   |   |    |    |    |
|   | 1 | 2      | 3     | 4     | 5        | 6       | 7    | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| B | A |        |       |       |          |         |      |   |   |    |    |    |
|   | B |        |       |       |          |         |      |   |   |    |    |    |
|   | C |        |       |       |          |         |      |   |   |    |    |    |
|   | D | 1:1600 | 1:800 | 1:400 | 1:200    | 1:100   | 1:50 |   |   |    |    |    |
|   | E |        |       |       |          |         |      |   |   |    |    |    |
|   | F |        |       |       |          |         |      |   |   |    |    |    |
|   | G |        |       |       |          |         |      |   |   |    |    |    |
|   | H |        |       |       |          |         |      |   |   |    |    |    |

FIG. 2

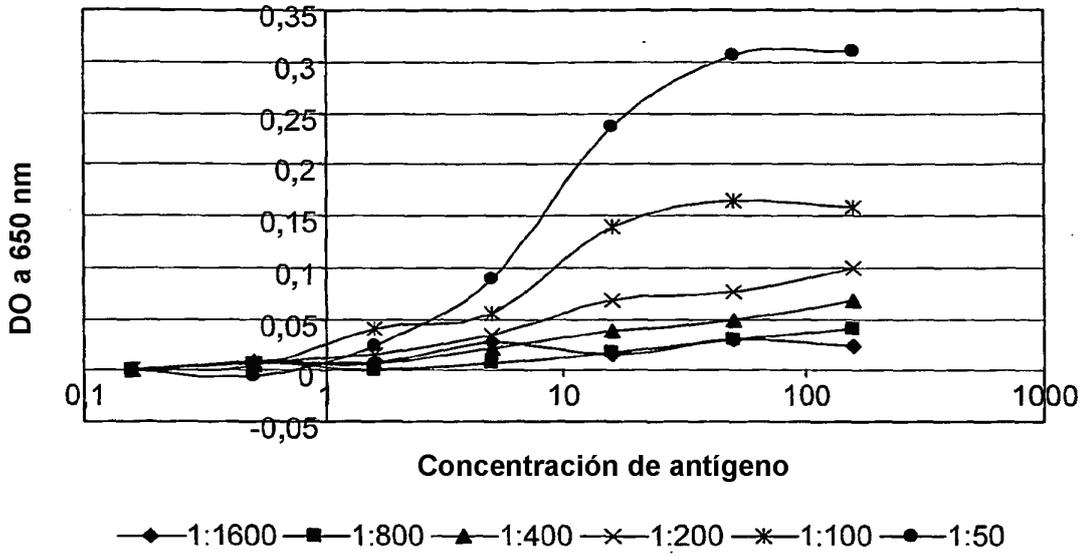


FIG. 3a

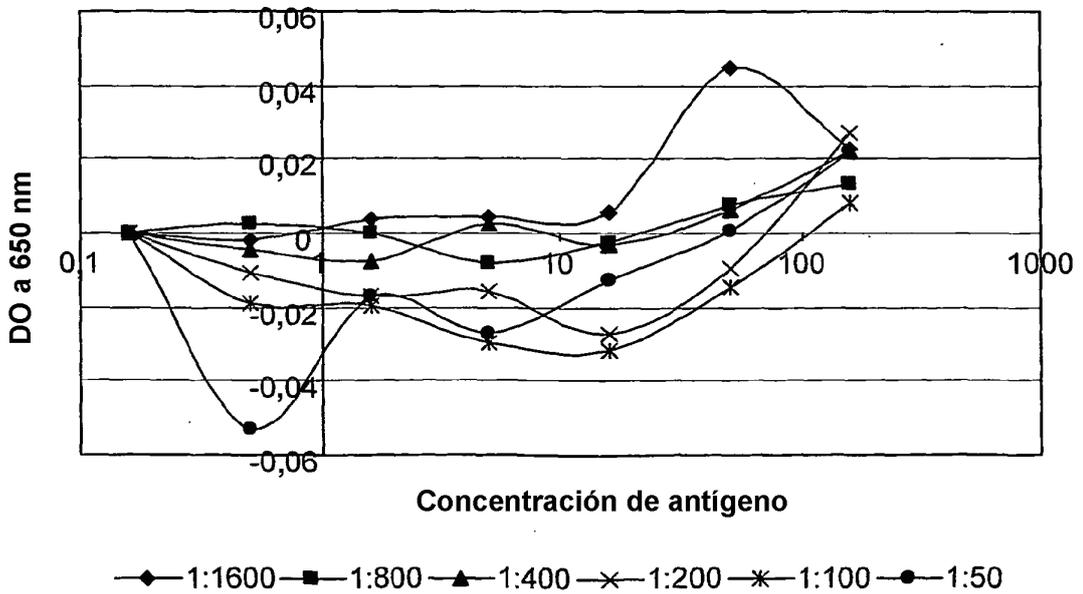


FIG. 3b

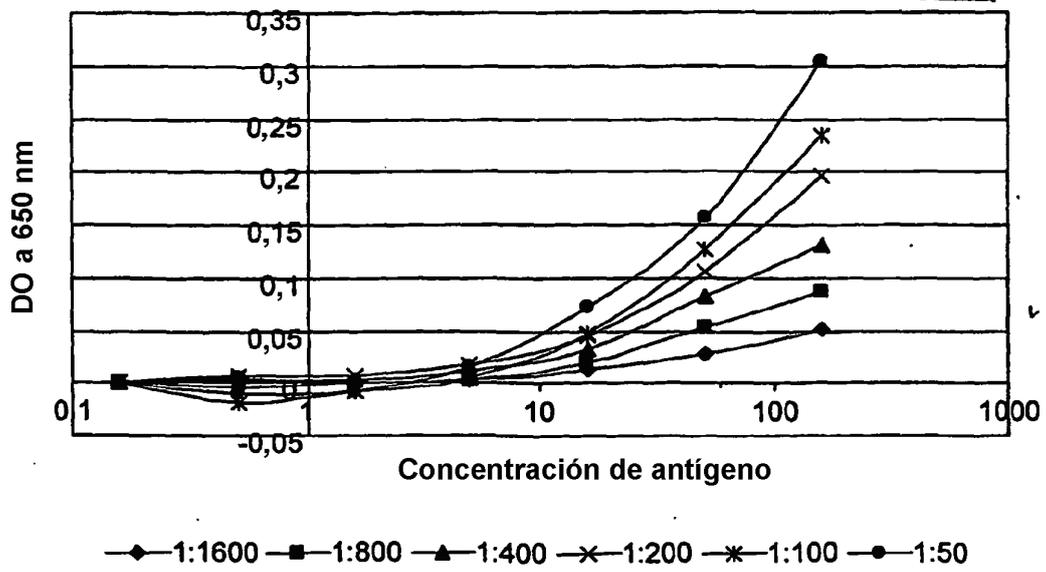


FIG. 4a

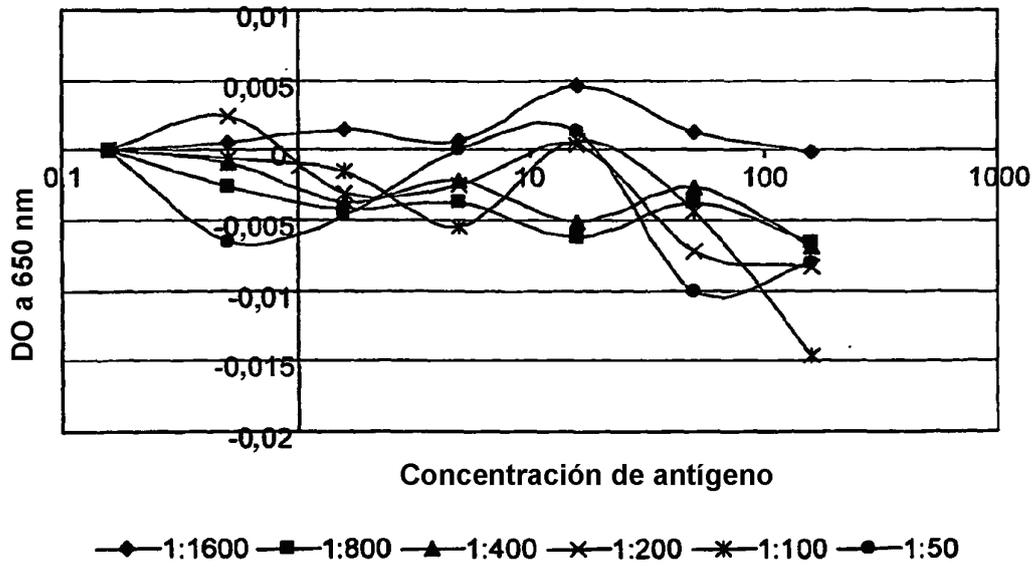


FIG. 4b

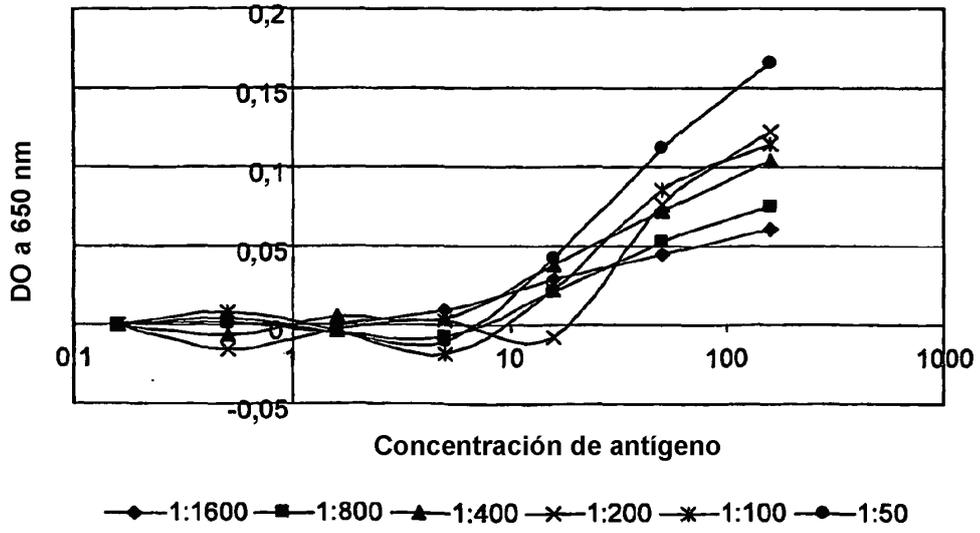


FIG. 5a

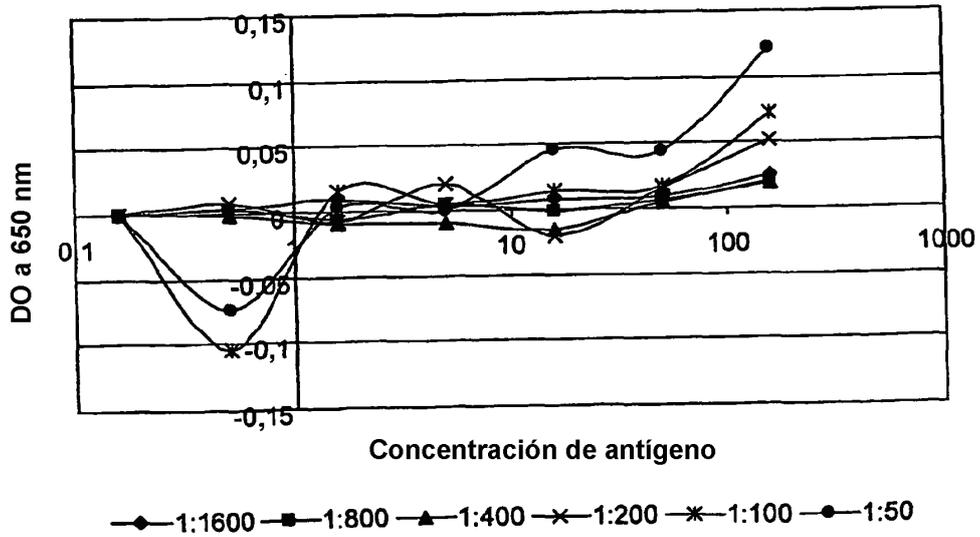


FIG. 5b

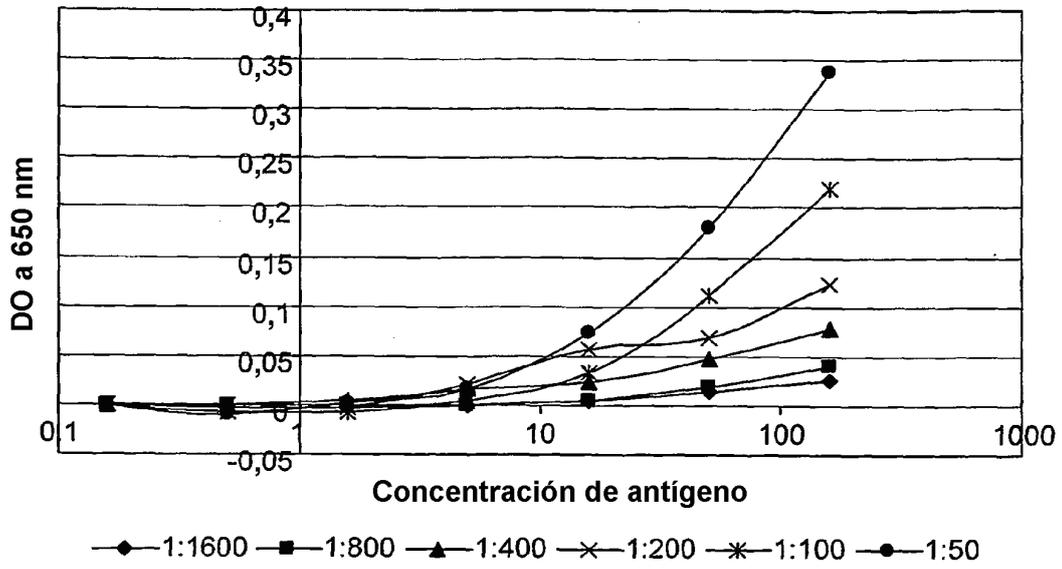


FIG. 6a

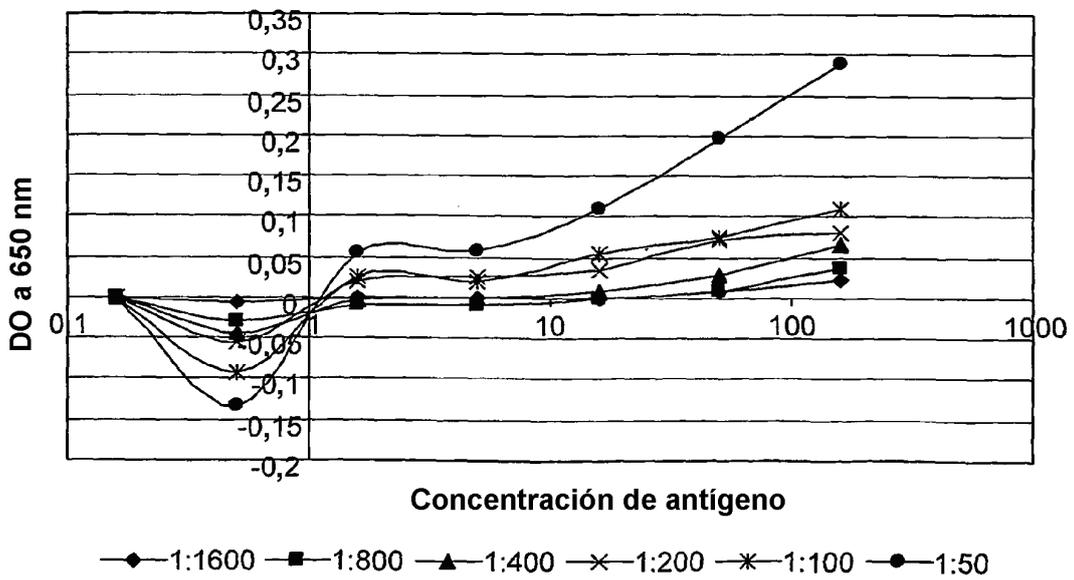


FIG. 6b

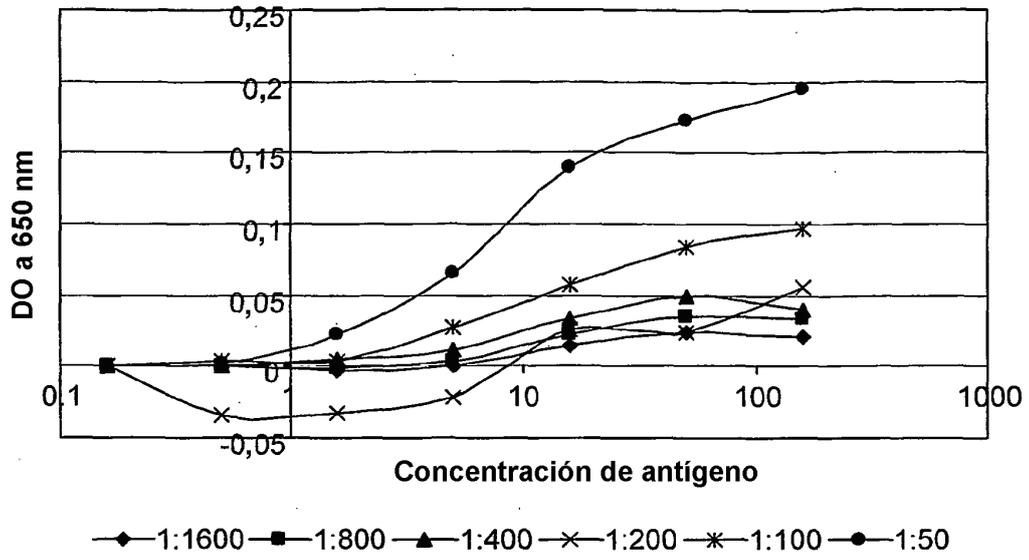


FIG. 6c

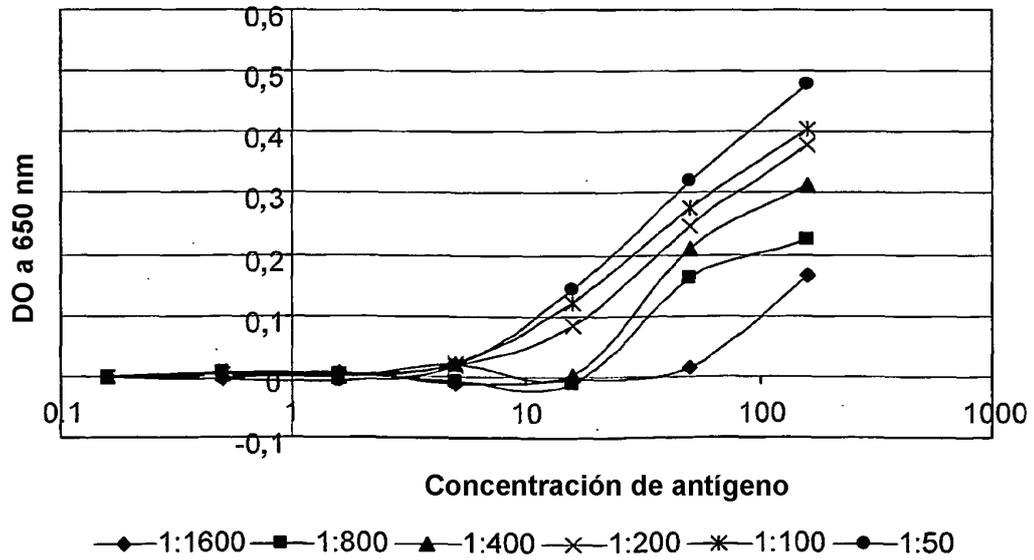


FIG. 7a

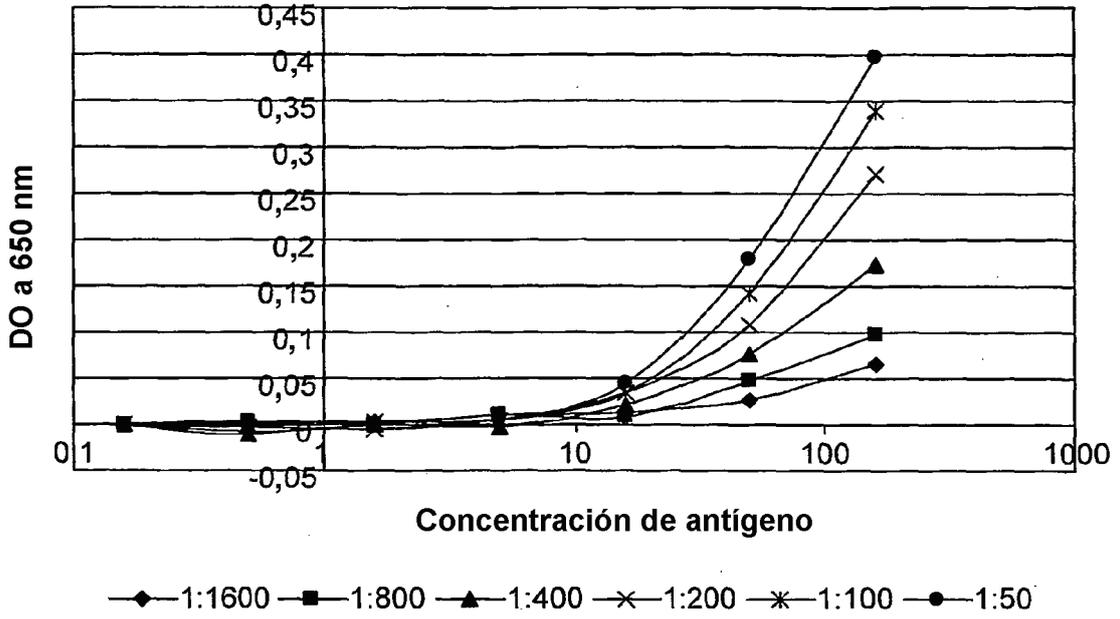


FIG. 7b

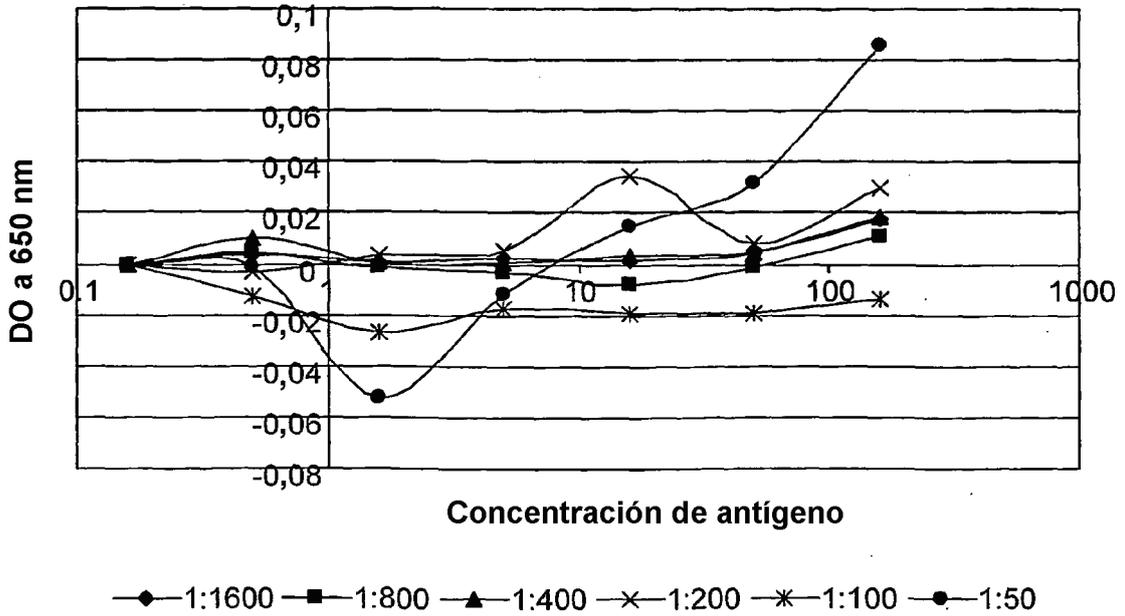


FIG. 7c

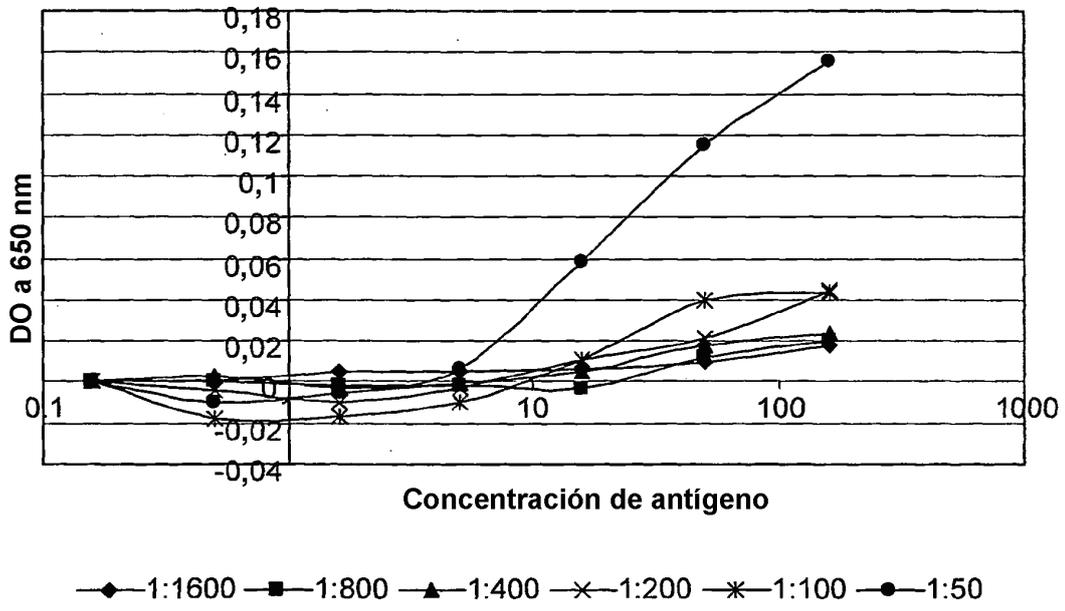


FIG. 7d