

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 096**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.1999** **E 05028132 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013** **EP 1731619**

54 Título: **Marcadores tumorales**

30 Prioridad:

11.05.1998 GB 9810040

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2014

73 Titular/es:

ONCIMMUNE LIMITED (100.0%)
Clinical Sciences Building City Hospital Hucknall
Road
Nottingham NG5 1PB, GB

72 Inventor/es:

ROBERTSON, JOHN FORSYTH RUSSELL;
GRAVES, CATHERINE ROSAMUND LOUISE y
PRICE, MICHAEL RAWLING

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 443 096 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

Marcadores tumorales

La invención se refiere a métodos para detectar o medir cuantitativamente la respuesta inmune de un mamífero a marcadores tumorales en circulación o marcadores tumorales expresados sobre la superficie de células tumorales, también a kits para realizar los métodos y al uso de estos métodos en la detección de cáncer, en el control del progreso de cáncer, en la detección de enfermedad recurrente en pacientes con cáncer que han experimentado previamente tratamiento anti-cáncer.

El desarrollo y progresión de cáncer en un paciente generalmente se encuentra asociado a la presencia de marcadores en el fluido corporal del paciente, reflejando estos "marcadores tumorales" diferentes aspectos de la biología del cáncer (véase, Fateh-Maghadam, A. & Steilber, P. (1993) *Sensible use of tumour markers*. Publicado por Verlag GmbH, ISBN 3-926725-07-9). A menudo se encuentra que los marcadores tumorales son formas alteradas de las proteínas de tipo silvestre expresadas por células "normales", en cuyo caso la alteración puede ser un cambio en la secuencia de aminoácidos primaria, un cambio en la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria o un cambio en la modificación post-traducciona, por ejemplo, glicosilación anormal. Como alternativa, las proteínas de tipo silvestre que se regulan positivamente o sobre-expresan en células tumorales, posiblemente como resultado de amplificación génica o regulación transcripcional anormal, también pueden ser marcadores tumorales.

Los ensayos establecidos para marcadores tumorales presentes en fluidos corporales tienden a centrarse en la detección de marcadores tumorales que reflejan una masa tumoral y como tales son de valor muy tarde en el proceso de enfermedad, por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedad metastásica. Los marcadores más ampliamente usados incluyen antígeno carcinoembrionario (CEA) y la glicoproteína llamada CA 15.3, ambas cuales han sido útiles principalmente como indicadores de enfermedad sistémica principal y de recaída después de terapia (Molina, R., Zanon, G., Filella, X. et al. *Use of serial carcinoembryonic antigen and CA 15.3 assays in detecting relapses in breast cancer patients*. (1995) *Breast Cancer Res Treat* **36**: 41-48). Estos marcadores son de uso limitado más pronto en la progresión de enfermedad, por ejemplo, en la exploración de pacientes asintomáticos. Por tanto, en la búsqueda de marcadores tumorales presentes en fluido corporal que sean de uso pronto en el proceso de enfermedad, la presente invención ha buscado identificar marcadores que no dependan de la masa tumoral *per se*.

Las diferencias entre una proteína de tipo silvestre expresada por células "normales" y una proteína marcadora de tumor correspondiente pueden, en algunos casos, conducir a que la proteína marcadora de tumor se reconozca por el sistema inmune de un individuo como "no propia" y por tanto provoque una respuesta inmune en ese individuo. Esto puede ser una respuesta inmune humoral (es decir, media por células B) que conduce a la producción de autoanticuerpos inmunológicamente específicos para la proteína marcadora de tumor. Los autoanticuerpos son anticuerpos de origen natural dirigidos contra un antígeno que el sistema inmune de un individuo reconoce como extraña incluso si ese antígeno realmente está originado en el individuo. Pueden estar presentes en la circulación como autoanticuerpos libres en circulación o en forma de complejos inmunes en circulación que constan de autoanticuerpos unidos a su proteína marcadora de tumor diana.

Como alternativa a la medida directa o detección de proteína marcadora de tumor en fluidos corporales, podrían desarrollarse ensayos para medir la respuesta inmune del individuo a la presencia de una proteína marcadora de tumor en términos de producción de autoanticuerpos. Dichos ensayos constituirían esencialmente detección indirecta de la presencia de la proteína marcadora de tumor. A causa de la naturaleza de la respuesta inmune, es probable que los autoanticuerpos puedan provocarse por una cantidad muy pequeña de proteína marcadora de tumor en circulación y métodos indirectos que dependen de la detección de la respuesta inmune a marcadores tumorales serán por consiguiente más sensibles que métodos para la medida directa de marcadores tumorales en fluidos corporales. Los métodos de ensayo basados en la detección de autoanticuerpos pueden, por lo tanto, ser de particular valor pronto en el proceso de enfermedad y posiblemente también en relación a la exploración de pacientes asintomáticos, por ejemplo, para identificar individuos "en riesgo" de desarrollar enfermedad.

Las proteínas marcadoras de tumor que se ha observado que provocan autoanticuerpos en suero incluyen una clase particular de proteína p53 mutante, descrita en la patente de Estados Unidos N° 5.652.115, que puede definirse por su capacidad de unirse a la proteína de choque térmico de 70kd (hsp70). Los autoanticuerpos contra p53 pueden detectarse en pacientes con varias afecciones benignas y malignas diferentes (descritas en el documento US 5.652.115) pero están en cada caso presentes en sólo un subconjunto de pacientes. Por ejemplo, un estudio que utiliza un ensayo ELISA para la detección de autoanticuerpos dirigidos contra la proteína p53 en el suero de pacientes con cáncer de mama informó de que se produjeron autoanticuerpos contra p53 por un 26% de los pacientes y un 1,3% de sujetos de control (Mudenda, B., Green, J. A., Green, B. et al. *The relationship between serum p53 autoantibodies and characteristics of human breast cancer*. (1994) *Br J Cancer* **69**: 4445-4449.). Una segunda proteína marcadora de tumor que se sabe que provoca autoanticuerpos en suero es la mucina epitelial MUC1 (Hinoda, Y. et al. (1993) *Immunol Lett*. **35**: 163-168; Kotera, Y. et al. (1994) *Cancer Res*. **54**: 2856-2860).

En la mayoría de los cánceres provocados por una acumulación progresiva de alteraciones genéticas, tales como cáncer de mama, la presencia de marcadores tumorales en fluidos corporales refleja el desarrollo y progresión de enfermedad pero ningún marcador único por sí mismo incluye todos los parámetros clínicamente importantes. Por ejemplo, las características de un marcador útil para el diagnóstico de cáncer pueden ser bastante diferentes de marcadores que proporcionan información acerca del pronóstico. Además, en cada situación clínica (es decir, diagnóstico o pronóstico) pueden ser necesarios diferentes marcadores cuando se trata con cáncer primario y cáncer secundario (metastático) y puede necesitarse un marcador diferente otra vez para proporcionar un método para medir la eficacia de un transcurso de tratamiento particular. Por lo tanto, las diferentes situaciones clínicas necesitan diferentes marcadores biológicos y, como se ha observado con p53, no todos los pacientes expresan el mismo conjunto de proteínas marcadoras de tumor. Por lo tanto, es difícil prever que uno cualquiera de los marcadores tumorales únicos sea universalmente aplicable a todos los pacientes en todas las fases de enfermedad.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de ensayo mejorado para la detección de marcadores tumorales presentes en los fluidos corporales que generalmente es más útil en todos los pacientes y en una diversidad de situaciones clínicas diferentes.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona un método para detectar cáncer en un sujeto mamífero detectando la respuesta inmune de dicho mamífero a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra de fluidos corporales de dicho mamífero con un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor distintos obtenidos de diferentes proteínas;
- (b) determinar la presencia o ausencia de complejos de dichos antígenos marcadores de tumor unidos a autoanticuerpos presentes en dicha muestra de fluidos corporales, siendo dichos autoanticuerpos inmunológicamente específicos para dichas proteínas marcadoras de tumor mediante lo cual, la presencia de dichos complejos es indicativa de la respuesta inmune a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor; y
- (c) donde los resultados obtenidos con los antígenos marcadores de tumor en el panel se usan en combinación.

El método de la invención, que puede mencionarse a continuación en este documento como “ensayo de panel”, utiliza un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor para controlar la respuesta inmune global de un individuo a un tumor u otro cambio carcinogénico/neoplásico. El método, por tanto, proporciona esencialmente un “perfil” de la respuesta inmune para ese individuo, que indica qué marcadores tumorales provocan una respuesta inmune que provoca la producción de autoanticuerpos. El método de la invención se prefiere para la detección de una respuesta inmune que provoca la producción de autoanticuerpos libres en circulación.

A causa de que el método de ensayo de la invención realizado sobre una muestra de fluidos corporales tomada del paciente es esencialmente no invasivo puede repetirse tan a menudo como sea crea necesario para construir un perfil de la respuesta inmune del paciente durante todo el transcurso de enfermedad. Como se usa en este documento, la expresión “fluidos corporales” incluye plasma, suero, sangre completa, orina, sudor, linfa, heces, fluido cerebro medular o aspirado de pezón. El tipo de fluido corporal usado puede variar dependiendo del tipo de cáncer implicado y el uso que se le quiere dar al ensayo. En general, se prefiere realizar el método sobre muestras de suero o plasma.

Como se ilustrará en los Ejemplos proporcionados a continuación, el uso de un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor para controlar la producción de autoanticuerpos es más sensible que el uso de marcadores únicos y proporciona una frecuencia mucho más baja de resultados negativos falsos. Las etapas reales para detectar autoanticuerpos en una muestra de fluidos corporales pueden realizarse de acuerdo con las técnicas de ensayo inmunológico conocidas *per se* en la técnica. Los ejemplos de técnicas adecuadas incluyen ELISA, radioinmunoensayos y similares. En términos generales, dichos ensayos usan un antígeno que puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. Se pone en contacto una muestra a ensayar con el antígeno y si están presentes autoanticuerpos específicos para la proteína marcadora de tumor en la muestra, reaccionarán inmunológicamente con el antígeno para formar complejos autoanticuerpo-antígeno que después pueden detectarse o medirse cuantitativamente. La detección de complejos autoanticuerpo-antígeno se realiza preferiblemente usando un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina humana, típicamente anti-IgG o anti-IgM humana, que reconocen las características generales comunes a todas las IgG o IgM humanas, respectivamente. El anticuerpo secundario habitualmente está conjugado con una enzima tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano (HRP) de modo que la detección de complejos autoanticuerpo/antígeno/anticuerpo secundario se consigue por la adición de un sustrato enzimático y la detección colorimétrica, quimioluminiscente o fluorescente posterior de los productos de la reacción enzimática.

El ensayo de panel de la invención usa un panel de antígenos relacionados con marcadores tumorales. El panel puede adaptarse para detectar un cáncer particular, o un cáncer en una fase particular de desarrollo. Los antígenos marcadores de tumor pueden ser de tipo silvestre o proteínas marcadoras de tumor mutantes aisladas de muestras de fluido biológico de individuos normales o de pacientes con cáncer o de líneas celulares que expresan la proteína

marcadora de tumor o pueden ser proteínas marcadoras de tumor recombinantes de longitud completa, formas oncogénicas virales de proteínas marcadoras de tumor o fragmentos antigénicos de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente. La expresión "fragmento antigénico" como se usa en este documento, significa un fragmento que es capaz de provocar una respuesta inmune.

El ensayo de panel puede realizarse en un formato multipocillo en el que cada uno de los dos o más antígenos se coloca en un pocillo distinto de una placa de ensayo multipocillo o, como alternativa, en un formato de recipiente único en el que el panel completo de antígeno se coloca en un único recipiente. El ensayo de panel puede realizarse en un formato cualitativo en el que el objetivo es simplemente la detección de la presencia o ausencia de autoanticuerpos o en un formato cuantitativo que proporciona una medida cuantitativa de la cantidad de autoanticuerpos presentes en una muestra.

Los marcadores preferidos para incluirlos en el panel de antígenos marcadores de tumor incluyen la proteína relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico c-erbB2 (Dsouza, B. *et al.* (1993) *Oncogene*. **8**: 1797-1806), la glicoproteína MUC1 (Batra, S. K. *et al.* (1992) *Int. J. Pancreatol.* **12**: 271-283) y las proteínas reguladoras de la transducción de señales/ciclo celular 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**: 1687-1983) y ras (o Ras) (Capella, G. *et al.* (1991) *Environ Health Perspectives*. **93**: 125-131), incluyendo las formas oncogénicas virales de ras que pueden usarse como antígenos para detectar autoanticuerpos anti-ras, y también BRCA1 (Scully, R. *et al.* (1997) *PNAS* **94**: 5605-10), BRCA2 (Sharan, S. K. *et al.* (1997) *Nature*. **386**: 804-810), APC (Su, L. K. *et al.* (1993) *Cancer Res.* **53**: 2728-2731; Munemitsu, S. *et al.* (1995) *PNAS* **92**: 3046-50), CA125 (Nouwen, E. J. *et al.* (1990) *Differentiation*. **45**: 192-8) y PSA (Rosenberg, R. S. *et al.* (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* **248**: 935-939). Como se ha mencionado anteriormente, los ensayos pueden formarse usando antígenos marcadores de tumor que son formas de estas proteínas aisladas de fluidos corporales humanos o de células cultivadas o fragmentos antigénicos de las mismas o proteínas recombinantes de longitud completa o truncadas o fragmentos antigénicos de las mismas.

Preferiblemente, los antígenos marcadores de tumor se marcan con biotina de modo que puedan unirse fácilmente a un soporte sólido, tal como una placa de ensayo multipocillo, por medio de la interacción biotina/avidina o biotina/estreptavidina. Los antígenos marcadores de tumor marcados con biotina pueden mencionarse en este documento como proteínas "biotiniladas". Para facilitar la producción de antígenos marcadores de tumor biotinilados para su uso en los métodos de ensayo de la invención, pueden expresarse ADNc que codifican una proteína marcadora de tumor recombinante de longitud completa, una versión truncada de la misma o un fragmento antigénico de la misma como una proteína de fusión marcada con una proteína o polipéptido final al que puede unirse el cofactor biotina mediante una reacción enzimática. Un sistema útil para la expresión de proteínas de fusión biotiniladas es el sistema PinPoint™ suministrado por Promega Corporation, Madison WI, USA. En la presente invención se ha descubierto sorprendentemente que con el uso de antígenos marcadores de tumor biotinilados como antígenos, estos son capaces de detectar autoanticuerpos en un porcentaje mucho más alto de pacientes que el observado usando un antígeno no biotinilado.

El método de ensayo de la invención puede emplearse en una diversidad de diferentes situaciones clínicas tales como, por ejemplo, en la detección de cáncer primario o secundario (metastático), en la búsqueda de un cambio neoplásico temprano o carcinogénico temprano en pacientes asintomáticos o identificación de individuos "en riesgo" de desarrollar cáncer (particularmente cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal o cáncer de próstata) en una población o individuos asintomáticos, o en la detección de enfermedad recurrente en un paciente previamente diagnosticado como que tiene células tumorales que ha experimentado tratamiento para reducir la cantidad de células tumorales.

El método de ensayo de la invención es adecuado para la detección de muchos tipos diferentes de cáncer, de los que algunos ejemplos son cáncer de mama, vejiga, colorrectal, próstata y ovario. El ensayo de la invención puede complementar métodos existentes de exploración y vigilancia. Por ejemplo, en el caso de cáncer de mama primario podría usarse para alertar a los médicos para que hagan biopsias de lesiones pequeñas sobre mamogramas que radiográficamente no parecen sospechosas o para producir imágenes de mama o para repetir imágenes anteriores a las programadas. En la clínica, el método de ensayo de la invención se espera que sea más objetivo y reproducible en comparación con técnicas de formación de imágenes actuales (es decir, mamografía y ultrasonidos), el éxito del cual puede depender del operario.

Como se ha mencionado anteriormente, el panel de antígenos marcadores de tumor puede adaptarse para que tenga relación con la aplicación particular. Un panel de al menos p53 y c-erbB2 es particularmente útil para muchos tipos de cáncer y puede suplementarse opcionalmente con otros marcadores que tienen una asociación conocida con el cáncer particular, o una fase del cáncer particular, a detectar. Por ejemplo, para cáncer de mama, el panel podría incluir MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA mientras que para cáncer de vejiga el panel podría incluir opcionalmente MUC1 y/o c-myc, para cáncer colorrectal ras y/o APC, para cáncer de próstata PSA y/o BRCA 1 o para cáncer de ovario BRCA1 y/o CA125. Hay otras realizaciones preferidas en las que p53 o c-erbB2 no son necesariamente esenciales. Por ejemplo, en el caso de cáncer de mama, los paneles adecuados podrían seleccionarse entre los siguientes:

p53 y MUC 1 con c-erbB2 y/o c-myc, y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA opcionales;
 p53 y c-myc con c-erbB2 y/o MUC1, y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA opcionales;
 p53 y BRCA1 con c-erbB2 y/o MUC1, y/o c-myc y/o BRCA2 y/o PSA opcionales;
 p53 y BRCA2 con c-erbB2 y/o MUC1, y/o c-myc y/o BRCA1 y/o PSA opcionales;
 c-erbB2 y MUC1 con p53 y/o c-myc, y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA opcionales;
 c-erbB2 y c-myc con p53 y/o MUC1, y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA opcionales;
 c-erbB2 y BRCA1 con p53 y/o MUC1, y/o c-myc y/o BRCA2 y/o PSA opcionales;
 c-erbB2 y BRCA2 con p53 y/o MUC1, y/o c-myc y/o BRCA1 y/o PSA opcionales;

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

p53 y ras con c-erbB2 y/o APC opcionales;
 p53 y APC con c-erbB2 y/o ras opcionales;
 Ras y APC con p53 y/o c-erbB2 opcionales;

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

p53 y PSA con BRCA1 y/o c-erbB2 opcionales;
 c-erbB2 y PSA con p53 y/o BRCA1 opcionales.

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

p53 y CA125 con c-erbB2 y/o BRCA1 opcionales;
 c-erbB2 y CA125 con p53 y/o BRCA1 opcionales.

Se describe un método para determinar la respuesta inmune de un paciente a dos o más proteínas marcadoras de tumor en circulación o a células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor e identificar cual de dichas dos o más proteínas marcadoras de tumor provoca la respuesta inmune más fuerte en el paciente, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de fluidos corporales de dicho paciente con un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor distintos, medir la cantidad de complejos formados por la unión de cada uno de dichos antígenos marcadores de tumor a autoanticuerpos presentes en la muestra de fluidos corporales, siendo dichos autoanticuerpos inmunológicamente específicos para dichas proteínas marcadoras de tumor y usar la medida obtenida como indicador de la fuerza relativa de la respuesta inmune a cada proteína marcadora de tumor e identificar mediante la misma cual de dichas dos o más proteínas marcadoras de tumor provoca la respuesta inmune más fuerte en el paciente.

El ensayo descrito anteriormente, que puede mencionarse a continuación en este documento como “ensayo de selección” es útil en la selección de un transcurso de tratamiento de vacuna en el que la proteína marcadora de tumor única identificada como que provoca la respuesta inmune más fuerte o una combinación de marcadores que provocan la respuesta inmune fuerte se usa como base de un tratamiento de vacuna anti-cáncer.

Los antígenos marcadores de tumor preferidos para su uso en el ensayo de selección son cualquiera de los antígenos marcadores de tumor mencionados anteriormente y preferiblemente los antígenos se marcan con biotina. Las etapas reales de detección de autoanticuerpos en una muestra de fluidos corporales pueden realizarse de acuerdo con técnicas de ensayo inmunológico conocidas, como se ha descrito anteriormente para el ensayo de panel.

También se describen métodos para la detección o medida cuantitativa de la respuesta inmune de un mamífero a una proteína marcadora de tumor en circulación o células tumorales que expresan la proteína marcadora de tumor donde la proteína marcadora de tumor es MUC1, c-erbB2, Ras, c-myc, BRCA1, BRCA2, PSA, APC, CA125 o p53, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto una muestra de fluidos corporales del mamífero con el antígeno marcador de tumor y determinar la presencia o ausencia de complejos del antígeno marcador de tumor unido a autoanticuerpos inmunológicamente específicos para la proteína marcadora de tumor o fragmento antigénico de la misma, mediante lo cual la presencia de dichos complejos es indicativa de la respuesta inmune a dicha proteína marcadora de tumor en circulación o células tumorales que expresan la proteína marcadora de tumor.

Los ensayos descritos anteriormente, que pueden mencionarse a continuación en este documento como “ensayos de marcador único”, usan un único tipo de marcador tumoral como antígeno en lugar de usar un panel de dos o más marcadores tumorales. Los ensayos de marcador único pueden usarse en cualquier situación clínica, por ejemplo, búsqueda de cambios neoplásicos tempranos o carcinogénicos en pacientes asintomáticos, identificación de individuos “en riesgo” de desarrollar cáncer, diagnóstico temprano y detección temprana de recurrencia en un paciente previamente diagnosticado como que tiene células tumorales, habiendo experimentado dicho paciente tratamiento para reducir la cantidad de dichas células tumorales o en la predicción de la respuesta de un paciente a un transcurso de tratamiento anti-cáncer, incluyendo cirugía, radioterapia, terapia inmune, vacunación etc.

Los ensayos de marcador único son particularmente útiles en situaciones en las que el marcador tumoral que provoca la respuesta inmune más fuerte en un paciente dado se ha identificado previamente, posiblemente usando el ensayo de selección descrito anteriormente. Por ejemplo, en una situación en la que se ha realizado un ensayo de selección inicial para establecer qué marcador tumoral provoca la respuesta inmune más fuerte en un paciente dado, puede realizarse un seguimiento posterior, detección de recurrencia o control del tratamiento usando un ensayo de marcador único sólo para detectar o medir autoanticuerpos contra ese marcador tumoral previamente identificado como que provoca una respuesta inmune fuerte en ese paciente.

Las etapas reales para detectar los autoanticuerpos en una muestra de fluidos corporales pueden realizarse de acuerdo con técnicas de ensayo inmunológico conocidas, como se ha descrito anteriormente para el ensayo de panel. Preferiblemente, la proteína marcadora de tumor usada como antígeno se marca con biotina de modo que pueda unirse fácilmente a un soporte sólido por medio de la interacción biotina/avidina o biotina/estreptavidina.

En un aspecto adicional más, la invención proporciona un método para detectar enfermedad recurrente en un paciente previamente diagnosticado como que tiene células tumorales, habiendo experimentado dicho paciente tratamiento para reducir la cantidad de dichas células tumorales detectando la respuesta inmune de dicho mamífero a proteínas marcadoras de tumor o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor, comprendiendo dicho método las etapas de

- (a) poner en contacto una muestra de fluidos corporales de dicho mamífero con un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor distintos derivados de diferentes proteínas;
- (b) determinar la presencia o ausencia de complejos de dichas antígenos marcadores de tumor unidos a autoanticuerpos presentes en dicha muestra de fluidos corporales, siendo dichos autoanticuerpos inmunológicamente específicos para dichas proteínas marcadoras de tumor, mediante lo cual la presencia de dichos complejos es indicativa de la respuesta inmune a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor; y
- (c) donde los resultados obtenidos con los antígenos marcadores de tumor en el panel se usan en combinación.

El método descrito anteriormente puede repetirse en varias ocasiones para proporcionar un control continuado para recurrencia de la enfermedad. El método es particularmente preferido para controlar pacientes previamente diagnosticados con cáncer de mama primario, cáncer colorrectal, cáncer de próstata o cáncer de vejiga, habiendo experimentado dichos pacientes tratamiento (por ejemplo, cirugía) para retirar o reducir el tamaño de sus tumores.

La invención también proporciona kits de ensayo adecuados para realizar los métodos para la detección de autoanticuerpos descritos en este documento. Dichos kits incluyen un panel o dos o más antígenos marcadores de tumor distintos a usar como antígeno en el ensayo y medios para poner en contacto el panel con una muestra de fluidos corporales.

La presente invención se entenderá adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplo y las Figuras adjuntas en las que:

Figura 1: muestra los resultados de ensayos para autoanticuerpos contra MUC1, p53 y c-erbB2 en muestras de suero tomadas de 21 pacientes diagnosticados con cáncer de mama primario. Recuadro A: autoanticuerpos anti-p53; Recuadro B: autoanticuerpos anti-c-erbB2 y Recuadro C: autoanticuerpos anti-MUC1. En cada caso, la línea de puntos representa el valor límite para la normalidad.

Figura 2: muestra los perfiles de reactividad de la proteína MUC1 aislada de orina humana normal (recuadro A), ABC MUC1 aislada del suero de pacientes con cáncer de mama avanzado (recuadro B) o MUC1 aislada de la línea celular de cáncer de mama humano ZR75-1 (recuadro C) con diversos anticuerpos anti-MUC1 monoclonales.

Figura 3: muestra el control continuo para enfermedad recurrente en tres pacientes con cáncer de mama post-operatorio. Los ensayos cuantitativos para autoanticuerpos anti-MUC1, anti-c-erbB2 y anti-p53 y para el marcador tumoral CA15-3 (TM) se realizaron sobre muestras de suero tomadas a intervalos de dos o tres meses después de la cirugía.

Figura 4: muestra el intervalo de niveles de autoanticuerpos encontrados en ensayos para autoanticuerpos contra c-erbB2, c-myc, MUC1 y p53 en individuos normales y pacientes con cáncer de mama primario temprano (PBC).

Figura 5: resume la proporción de detección para cáncer de mama primario en una análisis de niveles de autoanticuerpos en una serie de controles sanos y pacientes con cáncer de mama primario, PBC subdividido en Fase 1-es decir, nódulo linfático negativo y Fase 2-es decir nódulo linfático positivo y pacientes con cáncer metastásico a una confianza del 100%.

Figura 6: resume la proporción de detección para cáncer de mama primario en un análisis de niveles de autoanticuerpos en una serie de controles sanos y pacientes con PBC subdividido en Fase 1-es decir nódulo linfático negativo y Fase 2-es decir nódulo linfático positivo y pacientes con cáncer metastásico a una confianza del 95%.

Figura 7: muestra la sensibilidad para cáncer de mama primario en un análisis de niveles de autoanticuerpos en una serie de controles sanos y pacientes con cáncer de mama primario en Fase 1 o Fase 2 a una confianza del 95%.

Figura 8: muestra los niveles de autoanticuerpos contra MUC1, p53 y c-erbB2 en el suero de tres pacientes previamente diagnosticados con cáncer de mama medidos secuencialmente durante el seguimiento hasta que el paciente manifestó la enfermedad recurrente.

Figura 9: muestra los niveles de autoanticuerpos en muestras adicionales del segundo paciente de la Figura 9 (REC a los 36 meses) tomadas hasta recurrencia y durante el tratamiento para la recurrencia. Medidas secuenciales de marcadores tumorales establecidos que reflejan la masa tumoral (por ejemplo, CA15-3 y CEA) estuvieron en el intervalo normal durante todo este periodo (datos no mostrados).

Figura 10: muestra los niveles de autoanticuerpos en el seguimiento en muestras de suero post-operatorias de dos pacientes, uno de los cuales no desarrollo enfermedad recurrente (sin REC) y el otro sí (REC a los 36 meses).

Figura 11: resume las proporciones de detección en un análisis de niveles de autoanticuerpos (p53, MUC1, c-erbB2 y c-myc) en muestras de suero tomadas de pacientes con trastornos urológicos benignos y diversas fases de cáncer de vejiga.

* indica pacientes que eran benignos con respecto a la urología (es decir, no tuvieron una malignidad urológica), pero seis casos (todos con estado de autoanticuerpos positivo) tuvieron evidencia de otras malignidades.

** otras malignidades fueron: cáncer de mama, cáncer de piel, adenocarcinoma de inicio desconocido. Las evidencias de otras neoplasias constaron de: efusión pleural, quistes en los ovarios, pólipos en el colon.

Figura 12: resume la proporción de detección para cáncer colorrectal en un análisis de niveles de autoanticuerpos en el suero de controles sanos, pacientes, pólipos en el colon y pacientes con cáncer colorrectal a una confianza del 100% en comparación con un grupo predefinido de controles sanos.

Figura 13: resume la proporción de detección para cáncer colorrectal en un análisis de niveles de autoanticuerpos en suero de controles sanos, pacientes con pólipos en el colon y pacientes con cáncer colorrectal a una confianza del 95% en comparación con un grupo predefinido de controles sanos.

Figura 14: resume la proporción de detección en un análisis de niveles de autoanticuerpos en el suero de controles sanos, pacientes con cáncer de mama primario y mujeres asintomáticas que se sabe que son portadoras de BRCA1 mutante a una confianza del 100% en comparación con un grupo predefinido de controles sanos.

Figura 15: resume la proporción de detección para cáncer de próstata en un análisis de niveles de autoanticuerpos en el suero de controles sanos y pacientes con cáncer de próstata a una confianza del 95% en comparación con un grupo predefinido de controles sanos.

Ejemplos

Ejemplo 1-Aislamiento de ABC MUC1 de pacientes con cáncer de mama avanzado.

Método

Se purificó ABC MUC1 de sueros combinados tomados de 20 pacientes con cáncer de mama avanzado usando cromatografía de inmunoafinidad del siguiente modo:

Se conjugó el anticuerpo B55 anti-MUC1 monoclonal de ratón (también conocido como NCRC 11 y descrito por Ellis *et al.* (1984) *Histopathology*. 8: 501-516 y en la solicitud de Patente Internacional N° WO 89/01153) con perlas de CNBr-sepharose. Se diluyeron 1/10 los sueros combinados de pacientes diagnosticados con cáncer de mama avanzado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se incubaron con las perlas de sepharose conjugadas con anticuerpo (25 ml de sueros diluidos a un volumen de compactación de 1 ml de las perlas) durante una noche a 4°C con balanceo. Las perlas después se compactaron por centrifugación y se retiró el sobrenadante. Para lavar los componentes de suero no unidos, se resuspendieron las perlas en PBS, se balancearon durante 10 minutos, se compactaron por centrifugación y se retiró el sobrenadante. Esta secuencia de lavados se repitió 5

veces (o hasta que la A280 nm del sobrenadante fue aproximadamente ~0). Las perlas lavadas después se resuspendieron en glicina 0,25 M pH 2,5, se balancearon a temperatura ambiente durante 10 minutos, se compactaron por centrifugación y se retiró el sobrenadante. Este sobrenadante se ajustó a pH 7 por la adición de Tris y se almacenó a 4°C etiquetado como "fracción de glicina". Después las perlas se resuspendieron en 1 ml de dietilamina 25 mM (DEA) pH 11, se balancearon a temperatura ambiente durante 10 minutos, se compactaron por centrifugación y se retiró el sobrenadante. Este sobrenadante se volvió a ajustar a pH 7 por la adición de Tris y se almacenó a 4°C etiquetado como "fracción de DEA 25". Las perlas finalmente se resuspendieron en 1 ml de DEA 100 mM pH 11, se balancearon a temperatura ambiente durante 10 minutos, se compactaron por centrifugación y se retiró el sobrenadante. El sobrenadante final se volvió a ajustar a pH 7 por la adición de Tris y se almacenó a 4°C etiquetado como "fracción de DEA 100". El contenido en MUC1 de las tres fracciones (fracción de glicina, fracción de DEA 25 y fracción de DEA 100) se confirmó por ELISA usando el anticuerpo C595 anti-MUC1 monoclonal de ratón (disponible en el mercado de Serotec).

Ejemplo 2-Characterización inmunológica de ABC MUC1 aislada del suero de pacientes con cáncer de mama avanzado.

Puede distinguirse ABC MUC1 aislada del suero de al menos 20 pacientes con cáncer de mama avanzado de MUC1 aislada de la orina de sujetos humanos normales (MUC1 de orina humana normal) de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 en base a la afinidad alterada por los siguientes anticuerpos anti-MUC1 monoclonales de ratón:

B55 (NCRC 11)
C595

BC4W154	Se puede obtener de Hybritech, Inc
DF3	Se puede obtener de Centocor
B27.29	Se puede obtener de Biomira, Inc
115D8	Se puede obtener de Centocor
27.1	Se puede obtener de Austin Research Institute
SM3	Se puede obtener de Imperial cáncer Research Fund
Ma552	Se puede obtener de CanAg
HMPV	Se puede obtener de Austin Research Institute
BC2	Se puede obtener de Austin Research Institute

MUC1 de orina normal está disponible del Dr. M.R. Price, Cancer Research Laboratories, The University of Nottingham, University Park, Nottingham. NG7 2RD, Reino Unido.

La afinidad de cada uno de los anticuerpos anteriores por ABC MUC1, MUC1 de orina humana normal y también la proteína MUC 1 purificada de la línea celular de cáncer de mama humano ZR75-1 (purificada de un sobrenadante de cultivo tisular por filtración en gel) se midió realizando los ensayos ELISA colorimétricos usando cada uno de los diferentes anticuerpos y anticuerpos anti-inmunoglobulina secundarios conjugados con HRP. Después de la adición del sustrato colorimétrico (TMB), se tomaron medidas de OD a 650 nm. Los resultados de los ensayos ELISA se presentan gráficamente en la Figura 2. Los valores de Kd para la unión de varios de estos anticuerpos a ABC MUC1 y MUC1 de orina humana normal se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1: valores Kd para la unión de anticuerpos monoclonales a ABC MUC1 y MUC1 de orina humana normal.

Monoclonal	Kd vs ABC MUC1	Kd vs MUC1 de orina
BC4W154	$2,4 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-9}$
115D8	1×10^{-8}	$3,38 \times 10^{-8}$
C595	$2,4 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-8}$

Ejemplo 3-Clonación de p53 biotinilado.

Método

Se clonó el ADNc disponible en el mercado para p53 (clon pBH53 de *E. coli*, depositado en la American Type Culture Collection con el número de acceso 79110) en el vector plasmídico PinPoint™ (Promega Corporation, Madison WI, USA) usando técnicas de biología molecular convencionales. El vector PinPoint™ está diseñado para facilitar la producción de proteínas de fusión que comprenden un dominio de biotinilación (que consta de un fragmento de una proteína vehículo biotina carboxilasa) fusionada en el extremo N-terminal a la proteína diana de interés. Por tanto se tuvo cuidado durante el procedimiento de clonación de asegurar que la fase de lectura de p53 se mantuviera en la proteína de fusión. Los procedimientos para la clonación en los vectores PinPoint™ se describen con detalle en los Promega Protocols y Applications Guide que se pueden obtener de Promega Corporation, Madison WI, USA.

Las proteínas de fusión expresadas a partir del vector PinPoint™ en *E. coli* se biotinilan por un sistema enzimático de las células hospedadoras *E. coli* y, por lo tanto, pueden purificarse o unirse a una placa de ensayo usando tecnología de avidina o estreptavidina convencional. Por ejemplo, los procedimientos para la purificación de la

proteína de fusión usando avidina unida covalentemente a una resina de polimetacrilato se describen en Promega Protocols y Applications Guide que se pueden obtener de Promega Corporation, Madison WI, USA.

Ejemplo 4-Clonación de c-erbB2.

Método

Se clonó el ADNc de longitud completa que codifica c-erbB2 a partir de la línea celular de cáncer de mama humano ZR75-1, que puede inducirse para regular positivamente la expresión de c-erbB2 por tratamiento con el fármaco anti-cáncer tamoxifeno.

Se indujeron dos matraces T25 de células ZR75-1 sub-confluentes (disponibles de la American Type Culture Collection y de la European Collection of Cell Cultures, número de depósito ATCC CRL1500) que habían crecido en RPMI más suero de ternera fetal al 10% para que expresaran c-erbB2 por una estimulación de 4 días con tamoxifeno a 7,5 μ M (véase, Warri *et al.* (1996) *Eur. J. Cancer.* **32A**: 134-140). Después las células se recogieron usando tripsina/EDTA y se lavaron tres veces con PBS.

Se extrajo en ARNm del sedimento celular usando un kit de purificación de ARNm Dynabead de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El ARNm después se usó como molde para la síntesis de la primera hebra de ADNc usando el kit de síntesis de ADNc de primera hebra con cebador de Pharmacia Ready-to-go™. Después se ligó con extremos romos el ADNc/ARNm en el sitio EcoRV del vector PinPoint™. Los productos de ligamiento después se transformaron en células de *E. coli* Top 10 F (Invitrogen) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante y las células transformadas crecieron durante una noche en placas de agar LB que contenían ampicilina. Las colonias de las *E. coli* transformadas se copiaron sobre filtros de nitrocelulosa y después crecieron durante 2 horas en agar LB que contenía ampicilina e IPTG (1 mM). Las colonias sobre el filtro de nitrocelulosa se fijaron y lisaron (15 minutos en presencia de vapor de cloroformo seguido por 18 horas en Tris/HCl 100 mM pH 7,8; NaCl 150 mM; MgCl₂ 5 mM; BSA al 1,5%; 1 μ g/ml de ADNasa 1; 40 μ g/ml de lisozima).

Se realizó la búsqueda de colonias que expresan proteína reactiva anti-c-erbB2 del siguiente modo:

1. Se lava el filtro de nitrocelulosa tres veces en TNT (Tris/HCl 10 mM pH 8; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0,05%) después se bloquea durante 60 minutos en TNT + proteína de leche seca al 5%.
2. Se incuba el filtro de nitrocelulosa durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo de ratón anti-c-erbB2 (Ab-3 de Oncogene Research Products, Calbiochem).
3. Se lava el filtro tres veces en TNT, después se incuba durante una noche a 4°C con conjugado de HRP anti-ratón.
4. Se lava el filtro tres veces en TNT, dos veces en TN (Tris/HCl 10 mM pH 8; NaCl 150 mM), después se visualizan las colonias que expresan proteína reactiva anti-c-erbB2 usando cloronaftol (6 mg de cloronaftol en TN + 6 μ l de H₂O₂ al 30%).
5. Después del desarrollo (aproximadamente 20 minutos de tratamiento con cloronaftol como se ha descrito en la etapa 4) se lava el filtro con agua y se deja secar al aire.

Las colonias identificadas como positivas para la expresión de c-erbB2 se cogieron e hicieron crecer durante una noche en cultivo líquido de LB + ampicilina y pequeñas cantidades de ADN plasmídico y se prepararon las proteínas a partir del cultivo para el análisis. Los plásmidos que contienen un inserto de ADNc de c-erbB2 se identificaron usando digestión con enzimas de restricción y PCR usando un par cebador específico para la secuencia de ADNc de c-erbB2 publicada, descrita por Yazici, H. *et al.* (1996) *Cancer Lett.* **107**: 235-239. Después podría usarse análisis de secuencia de ADN para confirmar 1) la presencia de un inserto de c-erbB2 y 2) que la fase de lectura de c-erbB2 se mantiene en la proteína de fusión biotinilada resultante. Las muestras de proteína preparadas a partir de los cultivos de *E. coli* que llevan un plásmido con un inserto de c-erbB2 se analizaron por SDS-PAGE y transferencia de western para asegurar que se estaba expresando la proteína correcta.

Ejemplo 5-Detección de la respuesta inmune de pacientes con cáncer de mama primario usando un ensayo de panel.

Métodos:

(A) Preparación de antígeno biotinilado

Se hicieron crecer *E. coli* transformadas con el plásmido PinPoint™ apropiado que expresa el antígeno biotinilado en un cultivo de una noche de 5 ml (LB + amp + biotina) y se usó el cultivo de una noche para inocular un cultivo de 150 ml. El cultivo de 150 ml se hizo crecer a OD 0,4-0,6, después se indujo la expresión de la proteína de fusión por la

adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo inducido se incubó a 25°C. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación y después se lisaron por sonicación suave en un tampón Tris/EDTA que contenía el inhibidor de proteasa PMSF. Los restos celulares se retiraron por centrifugación a ~50.000 g y el sobrenadante libre de partículas resultante se ensayó por ELISA con avidina para confirmar la presencia de proteína biotinilada.

5 (B) Método de ensayo de autoanticuerpos contra c-erbB2/p53

1. Se recubrieron placas de ensayo de microtitulación de 96 pocillos convencionales con avidina, usando 50 µl de una solución de 1 µg/ml por pocillo, y se dejaron secar al aire durante una noche. Las placas después se lavaron una vez con PBS/Tween para retirar los cristales de sal residuales, se bloquearon durante 60 minutos con una solución de PVP (polivinilpirrolidona 360) al 2% (p/v) en PBS y se lavaron tres veces usando PBS/Tween.

2. Se sembró en placas el sobrenadante libre de partículas que contenía el antígeno biotinilado apropiado (preparado como se ha descrito en la sección (1) anterior) a 50 µl por pocillo recubierto con avidina y después se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación para permitir que tuviera lugar la reacción de unión biotina/avidina. Las placas después se lavaron cuatro veces con PBS/Tween.

3. Las muestras de suero a ensayar para la presencia de autoanticuerpos (diluidos 1/50 y 1/100 en PBS) se sembraron en placas por triplicado (50 µl por pocillo) y después se incubaron durante 60 minutos con agitación para permitir la formación de cualquier complejo autoanticuerpo/antígeno. Después se lavaron las placas cuatro veces con PBS/Tween para retirar los componentes de suero no unidos.

4. Se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-IgG/IgM humana conjugado con HRP (obtenido de Dako y usado a una dilución recomendada por el fabricante) a cada pocillo y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación. Las placas después se lavaron otra vez cuatro veces con PBS/Tween.

5. Se añadieron 50 µl de TMB a cada pocillo y se tomaron cinéticamente medidas de OD a 650 nm para cada pocillo de la placa de ensayo durante un período de 10 minutos.

Para cada antígeno, se realizaron ensayos de control siguiendo el procedimiento descrito anteriormente pero usando una muestra de proteína inducida a partir de *E. coli* transformadas con un vector PinPoint™ de control que contenía un ADNc fuera de la fase de lectura en lugar del sobrenadante libre de partículas que contiene el antígeno biotinilado. Como será evidente para los especialistas en la técnica, la metodología anterior puede adaptarse para su uso en la detección de autoanticuerpos de cualquier especificidad con el uso de un antígeno biotinilado apropiado.

35 (C) Ensayo de autoanticuerpos contra MUC1

1. Se diluyó ABC MUC1 aislada del suero de pacientes con cáncer de mama avanzado de acuerdo con el método del Ejemplo 1 (las tres fracciones combinadas) de manera apropiada en PBS, se sembraron en una placa de ensayo de microtitulación de 96 pocillos a 50 µl por pocillo y se dejaron secar durante una noche. La placa después se lavó una vez con PBS/Tween para retirar los cristales de sal residuales, se bloqueó durante 60 minutos usando una solución de PVP al 2% (p/v) en PBS y se lavó tres veces con PBS/Tween.

2. Las muestras de suero a ensayar para la presencia de autoanticuerpos (diluidos 1/50 y 1/100 en PBS) se sembraron en placas por triplicado, añadiendo 50 µl por pocillo, y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación. La placa después se lavó cuatro veces con PBS/Tween.

3. Se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-IgG/IgM humana conjugado con HRP (obtenido de Dako y usado a una dilución recomendada por el fabricante) a cada pocillo y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación. Las placas después se lavaron otra vez cuatro veces con PBS/Tween.

4. Se añadieron 50 µl de TMB a cada pocillo y se tomaron cinéticamente medidas de OD a 650 nm para cada pocillo de la placa de ensayo durante un período de 10 minutos.

Resultados

Se ensayaron muestras de sangre pre-operatorias tomadas de 21 pacientes diagnosticados con cáncer de mama primario para la presencia de autoanticuerpos contra MUC1, p53 y c-erbB2. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 1 y se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Muestra	anti-p53	Predicción	anti-c-erbB2	Predicción	anti-MUC1	Predicción	Combinado
1	+	cáncer	-	normal	+	cáncer	CÁNCER
2	+/-	?	+/-	?	+/-	?	cáncer
3	+	cáncer	+/-	?	+	cáncer	CÁNCER
4	+	cáncer	+	cáncer	+	cáncer	CÁNCER
5	+	cáncer	+	cáncer	+/-	?	CÁNCER
6	-	normal	+	cáncer	+/-	?	cáncer
7	+	cáncer	+	cáncer	+	cáncer	CÁNCER
8	+/-	?	+	cáncer	+/-	?	CÁNCER
9	+	cáncer	+	cáncer	+	cáncer	CÁNCER
10	+	cáncer	+	cáncer	-	normal	CÁNCER
11	+/-	?	+	cáncer	+	cáncer	CÁNCER
12	-	normal	+	cáncer	-	normal	cáncer
13	+	cáncer	-	normal	+	cáncer	CÁNCER
14	+/-	?	+	cáncer	+	cáncer	CÁNCER
15	+	cáncer	-	normal	+	cáncer	CÁNCER
16	-	normal	-	normal	+/-	?	?
17	+/-	?	-	normal	+	cáncer	cáncer
18	+	cáncer	+	cáncer	+	cáncer	CÁNCER
19	+	cáncer	+	cáncer	+	cáncer	CÁNCER
20	+	cáncer	-	normal	+	cáncer	CÁNCER
21	+	cáncer	+/-	?	-	normal	cáncer

La Figura 1 muestra los resultados de los ensayos para autoanticuerpos específicos para MUC1, c-erbB2 y p53. Para cada conjunto de datos la línea de puntos representa el valor límite para la normalidad. Para los propósitos de este estudio, los pacientes de control normales fueron mujeres que no tenían evidencia clínica y/o mamográfica de cáncer de mama en el momento de tomar la muestra de suero. Para establecer el valor límite para la normalidad, se realizaron ensayos de control en un total de 30 pacientes normales. Los valores por debajo de la línea de puntos pertenecen al intervalo de control normal y se valoraron como negativos (-) en la Tabla 2 mientras que los valores por encima de la línea de puntos se valoraron como positivos (+). Los valores que fueron difíciles de valorar como negativos o positivos con un grado razonable de seguridad se valoraron +/-.

Los pacientes con valor positivo en al menos dos de los ensayos se identificaron como fuertemente positivos para cáncer de mama (indicado "CÁNCER" en la Tabla 2); los pacientes con valor positivo en al menos uno de los ensayos se identificaron como probables para cáncer de mama (indicado "cáncer" en la Tabla 2).

Los resultados presentados ilustran el valor predictivo de los tres ensayos de autoanticuerpos tanto cuando se usan individualmente como cuando se usan como un panel. El uso de un ensayo único para predecir cáncer de mama proporcionó aproximadamente un 40% de los resultados como falsos negativos. Sin embargo, combinando los resultados de los tres ensayos sólo un paciente apareció como un falso negativo (<5%), el 71% de los pacientes se valoraron como fuertemente positivos para cáncer de mama (es decir, positivos en al menos dos ensayos) y el 23% de los pacientes se valoraron como probables para cáncer de mama (es decir, positivos en al menos un ensayo). Los resultados también muestran que un grupo de pacientes que se habían diagnosticado todos con cáncer de mama primario tienen perfiles serológicos diferentes en términos de la respuesta inmune a su cáncer. Por tanto, ninguno de los tres ensayos de autoanticuerpo por separada serían útiles en todos los pacientes con cáncer de mama primario.

Ejemplo 6-Clonación de un antígeno ras.

Método

Se clonó el ADNc que codifica una forma oncogénica mutante de ras (denominada K-ras) a partir de la línea celular KNRK (MSV transformado de Kirsten de riñón de rata, véase Aaronson, S.A. y Weaver, C.A. (1971) J. Gen. Virol. 13: 245-252; número de acceso de la ATCC CRL 1569). Se extrajo el ARNm del sedimento celular usando un kit de purificación de ARNm Dynabead de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La síntesis de ADNc, clonación en el sitio de EcoRV del vector PinPoint™ y la transformación de *E. coli* se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 4. Después se identificaron los clones que expresan ras por búsqueda de la expresión usando el anticuerpo anti-ras F234-4.2 de Calbiochem.

Ejemplo 7 Clonación de c-myc.Método

- 5 Se clonó el ADNc que codifica c-myc humano a partir de la línea celular de cáncer de mama T47-D (European Collection of Animal Cell Cultures número de acceso 85102201). Se extrajo el ARNm del sedimento celular usando un kit de purificación de ARNm Dinabead de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La síntesis de ADNc, clonación en el sitio EcoRV del vector PinPoint™ y la transformación de *E. coli* se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 4. Después se identificaron los clones que expresan c-myc por búsqueda de la expresión usando el anticuerpo anti-c-myc 4111.1 de Unilever.

Ejemplo 8 Ensayo para autoanticuerpos contra ras y c-myc

- 15 Se prepararon antígenos c-myc y ras biotinilados a partir de *E. coli* transformadas con el vector plasmídico PinPoint™ apropiado que expresa c-myc biotinilado o ras biotinilado, como se ha descrito en el Ejemplo (5), parte (A). Los ensayos para autoanticuerpos contra c-myc y ras después se realizaron de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo (5), parte (B).

20 Ejemplo 9 Método para detectar enfermedad recurrente en un paciente previamente diagnosticado como que tiene células tumorales

- Se seleccionó un grupo de nueve pacientes previamente diagnosticado con cáncer de mama primario. Las muestras de suero pre-operatorias se tomaron de cada uno de estos pacientes antes de cirugía para la retirada del cáncer de mama primario. Las muestras de suero de seguimiento después se tomaron después de la operación a intervalos de 2 ó 3 meses y durante el mismo periodo de tiempo los pacientes se ensayaron clínicamente para los signos de enfermedad recurrente. Ninguno de los pacientes recibió ninguna terapia post-operatoria hasta que se diagnosticó clínicamente la recurrencia. Las muestras de suero pre-operatorias y post-operatorias de cada uno de los pacientes se ensayaron para la presencia de autoanticuerpos contra MUC1, c-erbB2 y p53, usando los métodos de ensayo descritos anteriormente en el Ejemplo 5, y también para la presencia de la proteína marcadora de tumor en suero usada habitualmente CA15-3. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 3, en las páginas 29 y 30 y los resultados para tres de los nueve pacientes se presentan gráficamente en la Figura 3.

Los signos clínicos de enfermedad recurrente se valoraron del siguiente modo:

- | | | |
|----|------|---|
| 35 | LN | enfermedad recurrente en los nódulos linfáticos |
| | LR | recurrencia local |
| 40 | METS | metástasis distante presente |

Resultados

- 45 En cada uno de los pacientes se observó que permanecía al menos una clase de autoanticuerpo por encima del nivel normal. Esto sugiere la presencia continuada del marcador tumoral (inmunógeno) y por tanto la presencia continuada de tumor. Los niveles en suero de la proteína marcadora de tumor CA15-3 no se consideraron predictivos de enfermedad recurrente.

Tabla 3

Paciente	Fecha de la muestra	CA 15-3	Anti-p53	Predicción	Anti-erbB2	Predicción	Anti MUC1	Predicción	Previsto	Recurrencia	Fecha de la primera recurrencia	DFI (meses)
0001	12/88	11	-		+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	03/87	12	-		+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	05/87	13	-			Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	08/87	22	+/-	?	+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
0002	11/87	56	+/-	?	+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	METS		
	12/87	79	+/-	?	+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	METS		11
	01/87	16	-		+	Cáncer	+/-	?	Cáncer	-		
	05/87	8	-		+	Cáncer	+/-	?	Cáncer	-		
	08/87	10	-		+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	11/87	12	+/-	?	+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	02/88	16	-		+	Cáncer		Cáncer	CÁNCER	-	febrero de 1989	23
	02/87	10	-		+	Cáncer	-		Cáncer	-		
0003	05/87	7	+	Cáncer	+	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	08/87	8	+	Cáncer	+	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	11/87	12	+	Cáncer	+	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	02/88	12	+	Cáncer	+	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	05/88	11	-		+	Cáncer	-		Cáncer	-	diciembre de 1989	34
	02/87	8	+	Cáncer	++	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	04/87		+	Cáncer	+	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	06/87	4	+	Cáncer	+	Cáncer	-		CÁNCER	-		
0005	12/87	0,4	+	Cáncer	++	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	03/88	7	++	Cáncer	++	Cáncer	-		CÁNCER	-	febrero de 1993	71
	03/87	16	+/-	?	+	Cáncer	-		Cáncer	-		
	06/87	13	+/-	?	+	Cáncer	-		Cáncer	-		
	09/87	14	+	Cáncer	+	Cáncer	+/-	?	CÁNCER	-		
	12/87	17	+/-	7	+	Cáncer	+/-	?	CÁNCER	-		
	03/88	16								-		
	05/88									LN		15
0006	05/87	12	-		+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	07/87	15	-		+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	09/87	9	+/-	?	+	Cáncer	+/-	?	Cáncer	LR		4
	11/87	12	-		+	Cáncer	+/-	?	Cáncer	-		
	03/88	15	-		+/-	?	-			-		
	05/88	13	-		+/-	?	-			-	noviembre de 1988	
	06/87	26	+	Cáncer	++	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	08/87	28	+	Cáncer	+	Cáncer	-		CÁNCER	-		
0007	10/87	42		Cáncer	++	Cáncer	-		CÁNCER	-		
	12/87	105	+	Cáncer	++	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	METS	diciembre de 1987	6

Paciente	Fecha de la muestra	CA 15-3	Anti-p53	Predicción	Anti c-erbB2	Predicción	Anti MUC1	Predicción	Previsto	Recurrencia	Fecha de la primera recurrencia	DFI (meses)
0008	06/87	48	+	Cáncer	+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	08/87	30	+	Cáncer	+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	10/87	17	+	Cáncer	+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	01/88	14	+	Cáncer	+	Cáncer	+	Cáncer	CÁNCER	-		
	05/88	22	+	Cáncer	+	Cáncer	+/-	?	CÁNCER	LR	mayo de 1988	11
0009	05/87	17	-			?	-			-		
	08/87	17	-		+	Cáncer	-		Cáncer	-		
	11/87	18	-		+	Cáncer	-		Cáncer	LR		6
	01/88	31	-		+	Cáncer	+/-	?	Cáncer	METS		8

Ejemplo 10 Análisis retrospectivo de una serie bien caracterizada de controles sanos y pacientes con cáncer de mama temprano

Los métodos descritos anteriormente para detectar auto-anticuerpos contra MUC1, p53, c-erbB2 y c-myc se usaron para realizar un estudio retrospectivo sobre una gran cantidad de sueros de cáncer de mama temprano (fase 1 y 2) así como una gran cantidad de muestras de suero de control de individuos sin evidencias de malignidad (grupo de control). Las muestras de suero de pacientes se tomaron todas en un periodo pre-operatorio de 4 semanas. En el mismo momento, se ensayaron las muestras de suero para la presencia de antígeno en circulación (MUC1 y c-erbB2) usando kits de marcadores tumorales convencionales (usados normalmente sólo en enfermedad avanzada). Esto permitiría una evaluación de si los ensayos de autoanticuerpos son más sensibles que los ensayos de antígeno convencionales. Como se usa en este documento, las expresiones cáncer de mama temprano o primario significan que el tumor primario tiene un diámetro de menos de 5 cm. Cáncer de mama temprano en Fase 1 se define como nódulo linfático negativo; cáncer de mama temprano en Fase 2 se define como nódulo linfático positivo.

En total, las muestras de suero pre-operatorias de 200 pacientes diagnosticados con cáncer mama primario y 100 muestras de control normales se ensayaron para autoanticuerpos contra MUC1, p53, c-erbB2 y c-myc. Los resultados se resumen en las Tablas 4-7 y Figuras 4-7.

La Figura 4 representa el intervalo de niveles de autoanticuerpos encontrados para cada ensayo en individuos normales y pacientes con cáncer de mama temprano. Es evidente que los pacientes con cáncer tienen un nivel considerablemente más alto de autoanticuerpos en circulación contra estos marcadores que los individuos normales. Usando el intervalo para los individuos normales es posible ajustar un "límite" por encima del cual no deben coincidir los valores normales. Por lo tanto, las muestras con niveles de autoanticuerpos por encima de este límite pueden considerarse positivas para cáncer. Los puntos límite determinados de este modo se usaron para valorar los resultados del estudio retrospectivo en pacientes con cáncer de mama temprano.

Los resultados presentados en las Tablas 4-7 y Figuras 5-7 demuestran el valor predictivo de los cuatro ensayos de autoanticuerpos tanto individualmente como cuando se usan en combinación como un panel de ensayos. La Tabla 4 indica la sensibilidad aumentada de combinar los resultados de varios ensayos. Usando un ensayo solamente, se detecta menos del 50% de los cánceres, sin embargo, el poder de detección aumenta según se añaden más ensayos al panel hasta la combinación de los cuatro ensayos que permite que se detecte un 82% de los cánceres primarios. La Figura 7 muestra el porcentaje de muestras que son positivas en 0 de 4 ensayos hasta 4 de 4 ensayos. Esto proporciona una buena evidencia de que el ensayo de panel es más poderoso en la detección de cáncer que uno cualquiera de los ensayos de marcador único ya que no todos los pacientes con cáncer tienen autoanticuerpos surgidos contra todos los marcadores.

Las Tablas 5-7 resumen las proporciones de detección en cáncer de mama en fase 1, fase 2 y temprano (es decir fase 1 y 2) para diversas combinaciones de ensayos de autoanticuerpos. El uso de un ensayo de autoanticuerpos único para predecir cáncer de mama proporciona aproximadamente un 60-70% de los resultados como falsos negativos en el grupo en fase 1; y un 50-60% en fase 2. Sin embargo, combinando los resultados de los cuatro ensayos, el 76% de cánceres en fase 1 y el 89% de fase 2 fueron positivos en uno o más ensayos. La proporción de detección global para cáncer de mama temprano (es decir, cánceres tanto en fase 1 como en fase 2) que usan este sistema fue del 82%. Tanto en cáncer en fase 1 como en fase 2, el ensayo de los autoanticuerpos contra MUC1 pareció añadir un poder predictivo a cualquier combinación de ensayos.

Los resultados para este estudio se obtuvieron usando un límite de confianza del 100%, en otras palabras, para considerar un resultado positivo éste tiene que estar por encima del límite para las lecturas en el intervalo normal. Este intervalo normal se evaluó previamente a partir de una gran cantidad de individuos normales y después se confirmó usando el grupo de control de 100 individuos normales mencionado anteriormente. Por lo tanto, en el grupo de control normal, ninguna de las muestras se encontró que fuera positiva, lo que significa que la sensibilidad del panel de ensayos de autoanticuerpos fue del 100% para la detección de cáncer de mama temprano (Figura 5).

Las Figuras 6 y 7 muestran las proporciones de detección que se pueden conseguir si se reduce la especificidad de un nivel de confianza del 100% (sin falsos positivos) hasta un nivel de confianza del 95%, donde se espera algún grado de detección de falsos positivos. En este caso, el punto límite se define como el valor medio más dos veces la desviación típica del intervalo de muestra normal. Usando este punto límite, se determinó que aproximadamente un 5% de las muestras normales como positivas para cáncer (es decir, falsos positivos); mientras que la detección de cáncer primario aumentó hasta aproximadamente un 94% (es decir, un 6% de falsos negativos). Otra vez, el porcentaje más alto del grupo de muestra fue positivo en sólo 1 de los 4 ensayos, sin embargo, el porcentaje de muestras que fueron positivas en los 4 ensayos aumentó considerablemente.

Como el estudio anterior se realizó retrospectivamente, los datos clínicos estuvieron disponibles con respecto al diagnóstico inicial así como los datos clínicos con respecto al resultado post-operatorio (es decir, datos de seguimiento). Esto permitió el análisis del valor de pronóstico de los datos obtenidos de los ensayos de autoanticuerpos. La Tabla 8 muestra las correlaciones entre niveles en suero de auto-anticuerpos contra MUC1, p53, c-erbB2 y c-myc y varios factores clínicos. Por ejemplo, la presencia de autoanticuerpos contra cualquiera de

las 4 proteínas asociadas a tumor (MUC1, p53, c-erbB2 o c-myc) parece correlacionarse con el desarrollo de una recurrencia. En otras palabras, aquellos pacientes que tenían autoanticuerpos tenían más probabilidad de continuar hasta desarrollar una recurrencia de su enfermedad. En el caso de autoanticuerpos contra MUC1, c-myc y c-erbB2, fue mucho más probable que esto fuera metástasis distante, ya que sólo los autoanticuerpos contra p53 no se asociaron con el desarrollo tardío de metástasis distante con cualquier significancia estadística. De hecho, la presencia de autoanticuerpos contra p53 fue el indicador más débil de una recurrencia tardía de enfermedad; además, los autoanticuerpos contra p53 se correlacionaron con el intervalo libre de enfermedad.

La Tabla 9 presenta un análisis de si el grado de positividad de autoanticuerpos puede ser de valor en la predicción de qué tumor en fase 1 continuará hasta desarrollar recurrencia. En el presente momento, hay poco que pueda indicar en el momento del diagnóstico si un paciente con un tumor en fase 1 (es decir, sin evidencias de propagación del tumor al sistema linfático) continuará hasta desarrollar enfermedad recurrente. Como puede observarse en la Tabla 9, de aquellos pacientes con tumores en fase 1 del grupo de muestra que continuó hasta desarrollar la enfermedad recurrente, el 71% fueron positivos en dos o más ensayos de autoanticuerpo. De los pacientes con tumores en fase 1 que aún no tenían recurrencia, sólo el 30% fueron positivos en dos o más ensayos de autoanticuerpos.

Tabla 4: Sensibilidad de los ensayos de autoanticuerpos en la detección de cáncer de mama temprano.

	% de PBC positivas
Ensayo de marcador único	35-47
Ensayo de dos marcadores	51-60
Ensayo de tres marcadores	63-76
Ensayo de cuatro marcadores	82

Tabla 5: Sensibilidad de ensayos de panel de autoanticuerpos en la detección de cáncer de mama en fase 1

	p53	c-erbB2	c-myc	MUC1
p53	38	48	58	59
c-erbB2		31	50	51
c-myc			41	55
MUC1				38
p53/c-erbB2			61	66
p53/c-myc				73
c-erbB2/c-myc				65
p53/c-erbB2/c-myc				76

Tabla 6: Sensibilidad de ensayos de panel de autoanticuerpos en la detección de cáncer de mama en fase 2.

	p53	c-erbB2	c-myc	MUC1
p53	40	56	55	73
c-erbB2		42	56	73
c-myc			33	69
MUC1				56
p53/c-erbB2			65	84
p53/c-myc				80
c-erbB2/c-myc				84
p53/c-erbB2/c-myc				89

Tabla 7: Sensibilidad de ensayos de panel de autoanticuerpos en la detección de cáncer de mama primario

	p53	c-erbB2	c-myc	MUC1
p53	38	51	57	64
c-erbB2		35	53	59
c-myc			37	60
MUC1				47
p53/c-erbB2			63	73
p53/c-myc				76
c-erbB2/c-myc				72
p53/c-erbB2/c-myc				82

Tabla 8: Correlaciones entre el nivel de autoanticuerpos en suero y diversos factores clínicos

FACTOR	MUC1	p53	c-erbB2	c-myc
recurrencia	√	1√4	√	√
recurrencia local	1√2	1√2	1√2	1√4
metástasis distante	√	X	√	√
fase	X	X	X	X
grado	X	X	X	X

historia familiar	X	X	X	X
intervalo libre de enfermedad	X	√	X	X
edad	X	X	X	X
estado menopáusico	X	X	X	X
Clave:				
√	Buena correlación			
1√2	Correlación moderada			
1√4	Correlación débil			
X	Sin correlación			

Tabla 9: Análisis del grado de positividad en ensayos de autoanticuerpos para tumores de cáncer de mama en fase 1 recurrentes y no recurrentes

	Autoanticuerpos no negativos detectados	Autoanticuerpos positivos para un marcador	Autoanticuerpos positivos para 2-4 marcadores
Recurrente	12%	17%	71%
No recurrente	22%	48%	30%

5 Ejemplo 11 Detección de autoanticuerpos en la aplicación secuencial de muestras de suero para el control de la progresión de la enfermedad

Este estudio se realizó para evaluar si los ensayos de autoanticuerpos podrían ser útiles en la detección temprana de enfermedad recurrente.

10 Los niveles de auto-anticuerpos contra MUC1, p53 y c-erbB2 en el suero de pacientes previamente diagnosticados con cáncer de mama se midieron secuencialmente durante el seguimiento hasta que el paciente manifestó enfermedad recurrente. Los resultados se resumen en las Figuras 8-10. Los tres pacientes continuaron hasta desarrollar enfermedad recurrente. En los tres pacientes, los niveles de autoanticuerpos fueron indicativos de la presencia de cáncer. Sin embargo, no hay evidencias a partir de este grupo de que los niveles de autoanticuerpos disminuyan después de la retirada del tumor primario. La Figura 10 muestra los niveles de autoanticuerpos después de la operación de un paciente con enfermedad no recurrente y en un paciente con enfermedad recurrente. Los niveles de autoanticuerpos en el paciente con enfermedad no recurrente permanecieron por debajo del punto límite durante el periodo de recogida de muestras (48 meses). En el segundo paciente, cuya enfermedad recurrió a los 36 meses, se observó que los niveles de autoanticuerpos aumentaban gradualmente hacia el punto límite, surgiendo autoanticuerpos contra c-erbB2 por encima del límite. Además, como puede observarse en la Figura 9, cuando se añadieron muestras secuenciales adicionales al análisis, 3 de los 4 ensayos llegaron a ser positivos para cáncer y estos niveles después disminuyeron otra vez una vez se emprendió tratamiento de la recurrencia. Estos datos mantienen la utilidad del ensayo de autoanticuerpos en la detección temprana de enfermedad recurrente.

25 Ejemplo 12 Análisis de una serie de pacientes con cáncer de vejiga y trastornos urológicos benignos.

Las muestras de suero se recogieron a partir de un grupo de 80 pacientes con cáncer de vejiga/trastornos urológicos benignos y se analizaron para la presencia de autoanticuerpos contra MUC1, p53, c-erbB2 y c-myc usando los métodos de ensayo descritos anteriormente.

Los datos resumidos en la Tabla 10 muestran las sensibilidades de un ensayo único para el intervalo de detección de cáncer de vejiga del 15-50% (en oposición al 35-47% para cáncer de mama). La sensibilidad de detección usando los 4 ensayos fue del 80%, similar al encontrado para cáncer de mama temprano.

35 La Figura 11 muestra el desglose de la proporciones de detección entre trastornos benignos urológicos ("benigno") y las tres fases de cáncer de vejiga. Después de investigación adicional de los datos clínicos relevantes llegó a ser evidente que 6 de los pacientes en el grupo "benigno" tuvieron evidencias de otras malignidades. Estas malignidades distintas fueron cáncer de pulmón, cáncer de piel y adenocarcinoma. Las evidencias de otras malignidades fueron: efusión pleural, quistes en los ovarios y pólipos en el colon. Las muestras de suero de estos 6 pacientes se valoraron como positivas para cáncer usando el panel de ensayos de autoanticuerpos, que ilustra la aplicación general del ensayo de panel para la detección de cánceres. Además, se sabe que algunos pacientes con enfermedad en fase PT1/2 y PT3/4 habían recibido previamente terapia sistémica.

45 Tabla 10: Sensibilidad de ensayos de autoanticuerpos en la detección de cáncer de vejiga.

	% de positivos
Ensayo de marcador único	15-50
Ensayo de dos marcadores	28-73
Ensayo de tres marcadores	46-76
Ensayo de cuatro marcadores	80

Tabla 11: Sensibilidad de ensayos de panel de autoanticuerpos en la detección de cáncer de vejiga.

	p53	c-erbB2	c-myc	MUC1
p53	50	73	73	73
c-erbB2		17	28	36
c-myc			15	35
MUC1				24
p53/c-erbB2			76	76
p53/c-myc				75
c-erbB2/c-myc				46
p53/c-erbB2/c-myc				80

Ejemplo 135 Sensibilidad de ensayo de autoanticuerpos en el diagnóstico de cáncer colorrectal.

Se realizó un ensayo de autoanticuerpos como se ha descrito previamente sobre muestras de suero de pacientes con cáncer colorrectal usando los antígenos de tumor c-myc, p53, c-erbB2 y K-ras individualmente y como panel. Los paneles se muestran en las Figuras 12 y 13. Como se ha demostrado previamente, la sensibilidad aumentada se muestra cuando se usa un panel de antígenos.

Ejemplo 1415 Uso de BRCA1 en ensayo de panel para la detección de cáncer de mama.

Se clonó un antígeno BRCA1 adecuado para su uso en la detección de autoanticuerpos anti-BRCA1 a partir de la línea celular de cáncer de mama MCF7 usando una estrategia de RT-PCR. Brevemente, se transcribió de forma inversa el ARNm aislado de células MCF7 para proporcionar una primera hebra de ADNc. Estos ADNc se usaron como molde para PCR usando un par cebador diseñado para amplificar un producto que cubre las primeras 1500 pares de bases del ADNc de BRCA1 pero que incluye una mutación por falta de coincidencia conocida que conduce a un codón de parada temprano y por lo tanto la producción de proteína truncada. También se incorporaron diferentes sitios para la digestión con enzimas de restricción en los cebadores de PCR directo e inverso para facilitar la clonación en el producto de PCR. Los cebadores de PCR fueron los siguientes:

5' -GAC AGG ATC CGG ATG GAT TTA TCT GCT CTT CGC GTT G

25 5' -GCG GCC GCC CTC ATG TAG GTC TCC TTT TAC GC

El producto de PCR obtenido usando estos cebadores después se clonó en el vector PinPoint™ y se usó para transformar células de *E. coli* Top 10 F, como se ha descrito anteriormente en este documento. Los clones que expresan la proteína de fusión del antígeno BRCA1 truncado fusionado en fase de lectura con el dominio de biotinylation N-terminal después se identificaron por búsqueda de expresión, de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, usando el anticuerpo MAB4132 de Chemicon.

El antígeno BRCA1 truncado biotinilado después se prepara a partir de *E. coli* transformadas con el vector plasmídico PinPoint™ apropiado que expresa la proteína de fusión, como se describe en el Ejemplo (5), parte (A). El ensayo para autoanticuerpos contra BRCA1 después se realiza de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo (5), parte (B).

La Figura 14 muestra los resultados de un estudio en el que se realizaron los ensayos descritos anteriormente para autoanticuerpos contra c-myc, p53, c-erbB2, MUC1 y BRCA1 individualmente, como un panel y como un panel sin BRCA1 para detectar autoanticuerpos en muestras de suero tomadas de individuos normales, pacientes diagnosticados con cáncer de mama primario y portadores de una mutación en BRCA1. Como se demostró previamente, se muestra una sensibilidad aumentada cuando se usa un panel de marcadores.

Ejemplo 1545 Uso de un ensayo de panel de autoanticuerpos para detectar cáncer de próstata, que incorpora PSA.

Se clonó el ADNc que codifica PSA humano a partir de la línea celular T47-D usando un protocolo similar al descrito anteriormente para la clonación de c-erbB2. Brevemente, la células T47-D se estimularon primero con Apigenina a 10-5 M como se describe por Rosenberg *et al.* (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* **248**: 935-039. Después se extrajo el ARNm y la síntesis de ADN c, ligamiento en PinPoint™ y transformación de *E. coli*. se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se identificaron los clones que expresan PSA usando un anticuerpo anti-PSA. Se

preparó un antígeno PSA biotinilado a partir de *E. coli* transformadas con el vector PinPoint™ que expresa PSA biotinilada de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo (5), parte (A). El ensayo para autoanticuerpos contra PSA después se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo (5), parte (B).

- 5 Se realizó un ensayo de autoanticuerpos usando los métodos descritos anteriormente sobre pacientes con cáncer de próstata usando c-myc, p53, c-erbB2, PSA y MUC1 individualmente y como un panel. Los resultados se muestran en la Figura 15 y confirman la sensibilidad aumentada de dicho panel para la detección de cáncer de próstata.

Ejemplo 15

- 10 Otros antígenos marcadores de tumor
- Puede purificarse por afinidad CA125 a partir de la línea celular de cáncer de ovario OVRCA-3 (disponible de la ATCC) usando Mab VK-8, como se describe por Lloyd, K.O. *et al.* (1997) *Int. J. Cancer*. **71**: 842-850.
- 15 La proteína APC se expresa por la línea celular de cáncer colorrectal SW480 (disponible de la ATCC) como se describe por Munemitsu, S. *et al.* (1995) *PNAS* **92**: 3046-3050.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar cáncer en un sujeto mamífero detectando la respuesta inmune de dicho mamífero a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) poner en contacto una muestra de fluidos corporales de dicho mamífero con un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor distintos obtenidos de diferentes proteínas;
 - (b) determinar la presencia o ausencia de complejos de dichos antígenos marcadores de tumor unidos a autoanticuerpos presentes en dicha muestra de fluidos corporales, siendo dichos anticuerpos inmunológicamente específicos para dichas proteínas marcadoras de tumor; mediante lo cual la presencia de dichos complejos es indicativa de la respuesta inmune a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor; y
 - (c) donde los resultados obtenidos con los antígenos marcadores de tumor en el panel se usan en combinación.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos dos o más antígenos marcadores de tumor está marcado con una proteína o péptido final.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que al menos uno de dichos antígenos marcadores de tumor está marcado con biotina.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos uno de dichos dos o más antígenos marcadores de tumor se seleccionan entre MUC1, p53, c-erbB2, Ras, c-myc, BRCA1, BRCA2, PSA, APC o CA125.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los autoanticuerpos detectados son indicativos de cáncer, preferiblemente cáncer de mama, vejiga, colorrectal, próstata u ovario.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o reivindicación 5, en el que dicho panel comprende al menos p53 y c-erbB2.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de vejiga y el panel incluye también MUC1 y c-myc.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer colorrectal y el panel también incluye Ras y/o APC.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de próstata y el panel también incluye PSA y/o BRCA1.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de mama y el panel incluye MUC-1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de ovario y el panel también incluye BRCA1 y/o CA125.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cáncer es cáncer colorrectal y el panel se selecciona entre los siguientes:
 - p53 y Ras opcionalmente con c-erbB2 y/o APC,
 - p53 y APC opcionalmente con c-erbB2 y/o Ras, o
 - Ras y APC opcionalmente con p53 y/o c-erbB2.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cáncer es cáncer de próstata y el panel se selecciona entre los siguientes:
 - p53 y PSA opcionalmente con BRCA1 y/o c-erbB2, o c-erbB2 y PSA opcionalmente con p53 y/o BRCA1.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cáncer es cáncer de ovario y el panel se selecciona entre los siguientes:
 - p53 y CA125 opcionalmente con c-erbB2 y/o BRCA1, o c-erbB2 y CA125 opcionalmente con p53 y/o BRCA1.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cáncer es cáncer de mama y el panel se selecciona entre los siguientes:

p53 y MUC1 con c-erbB2 y/o c-myc, y/o
BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA opcionales,
p53 y c-myc con c-erbB2 y/o MUC1 y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA opcionales,
p53 y BRCA1 con c-erbB2 y/o MUC1 y/o c-myc y/o BRCA2 y/o PSA opcionales,
5 p53 y BRCA2 con c-erbB2 y/o MUC1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o PSA opcionales,
c-erbB2 y MUC1 con p53 y/o c-myc, y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA opcionales,
c-erbB2 y c-myc con p53 y/o MUC1 y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA opcionales,
c-erbB2 y BRCA1 con p53 y/o MUC1 y/o c-myc y/o BRCA2 y/o PSA opcionales, o
10 c-erbB2 y BRCA2 con p53 y/o MUC1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o PSA opcionales.

16. Un kit de ensayo adecuado para realizar el método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho kit de ensayo un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor distintos y un medio para poner en contacto dicho panel con una muestra de fluidos corporales.

17. El uso método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la detección de cáncer de mama, vejiga, colorrectal, próstata u ovario.

18. Un método para detectar enfermedad recurrente en un paciente previamente diagnosticado como portador de células tumorales, habiendo experimentado dicho paciente tratamiento para reducir la cantidad de células tumorales detectando la respuesta inmune de dicho mamífero a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra de fluidos corporales de dicho mamífero con un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor distintos obtenidos de diferentes proteínas;
- 25 (b) determinar la presencia o ausencia de complejos de dichos antígenos marcadores de tumor unidos a autoanticuerpos presentes en dicha muestra de fluidos corporales, siendo dichos anticuerpos inmunológicamente específicos para dichas proteínas marcadoras de tumor;
- mediante lo cual la presencia de dichos complejos es indicativa de la respuesta inmune a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor; y
- 30 (c) donde los resultados obtenidos con los antígenos marcadores de tumor en el panel se usan en combinación.

19. Un método para identificar aquellos individuos que están en riesgo aumentado de desarrollar cáncer en una población de individuos asintomáticos detectando la respuesta inmune de dicho mamífero a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor, comprendiendo dicho método las etapas de:

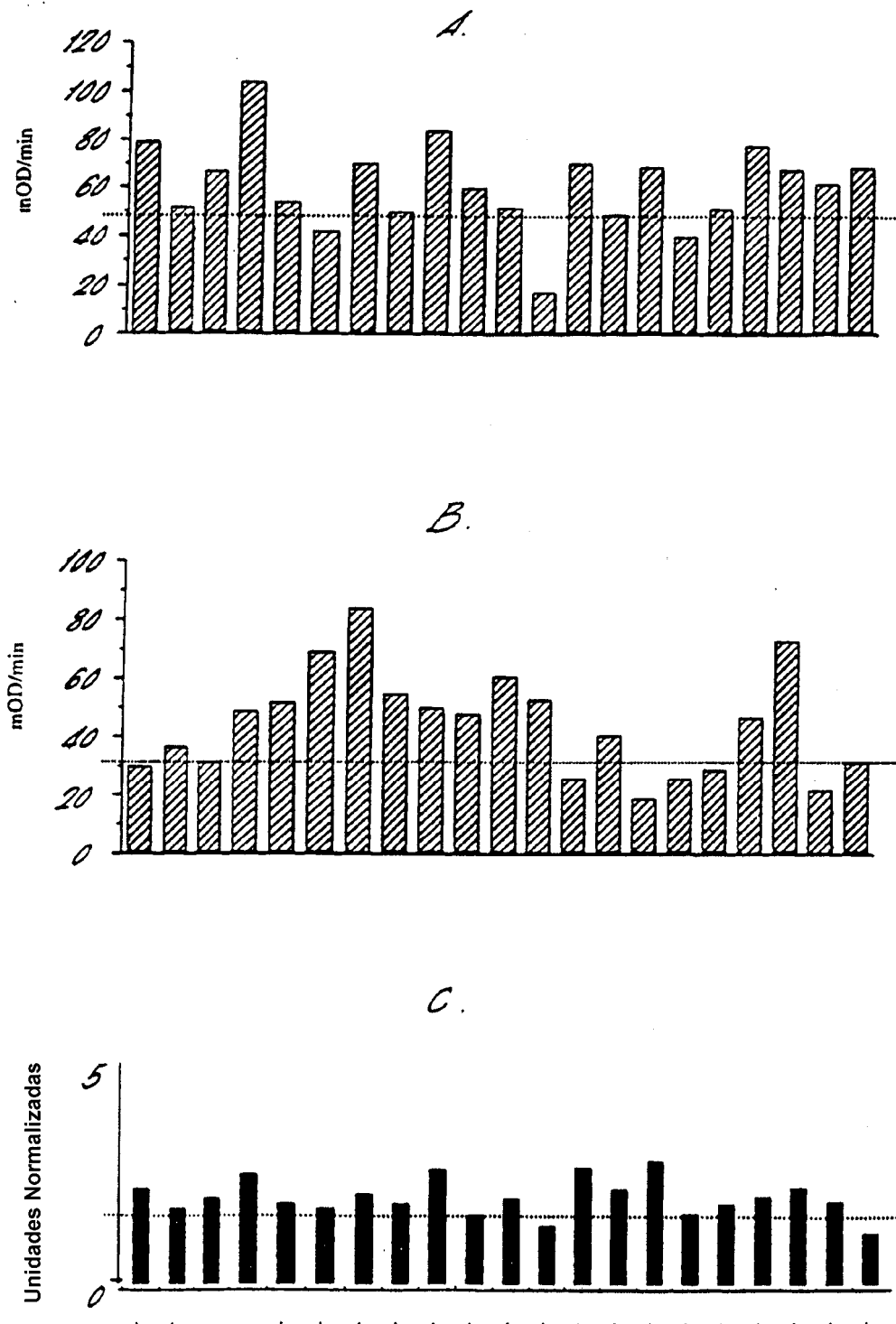
- (a) poner en contacto una muestra de fluidos corporales de dicho mamífero con un panel de dos o más antígenos marcadores de tumor distintos obtenidos de diferentes proteínas;
- 40 (b) determinar la presencia o ausencia de complejos de dichos antígenos marcadores de tumor unidos a autoanticuerpos presentes en dicha muestra de fluidos corporales, siendo dichos anticuerpos inmunológicamente específicos para dichas proteínas marcadoras de tumor;
- mediante lo cual la presencia de dichos complejos es indicativa de la respuesta inmune a proteínas marcadoras de tumor en circulación o células tumorales que expresan dichas proteínas marcadoras de tumor; y
- 45 (c) donde los resultados obtenidos con los antígenos marcadores de tumor en el panel se usan en combinación.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en que aquellos individuos están en riesgo aumentado de desarrollar cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer colorrectal o cáncer de ovario.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en la determinación del perfil de marcadores tumorales de un individuo que padece cáncer.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicho perfil de marcadores tumorales se determina secuencialmente en dicho individuo como una indicación del transcurso de enfermedad.

FIG. 1.



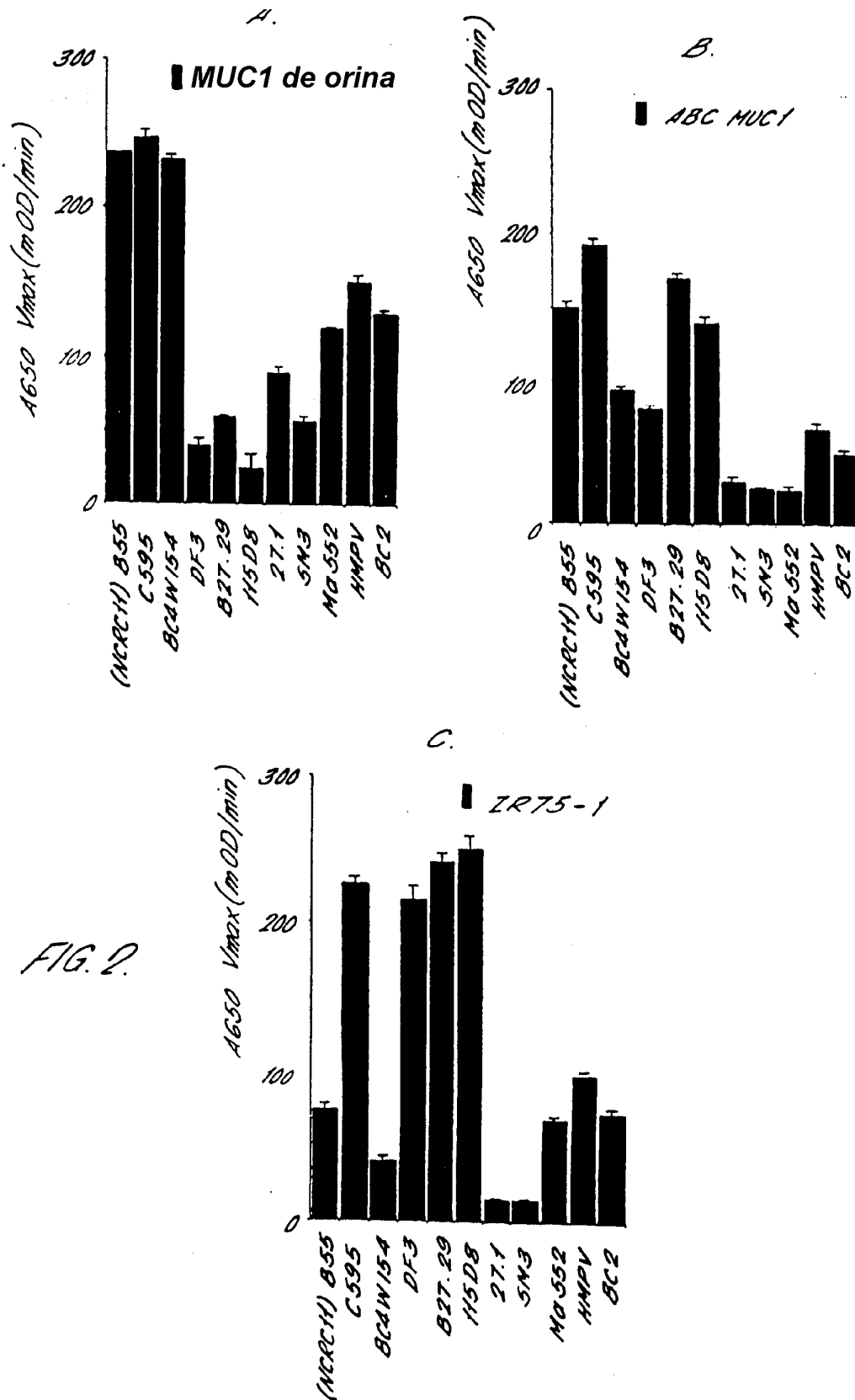


FIG. 3.

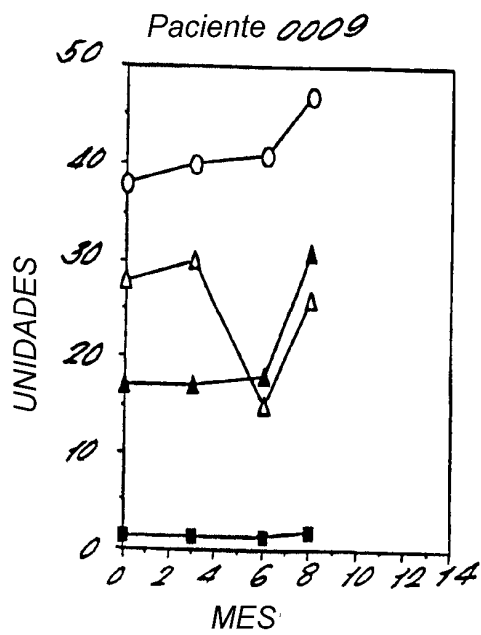
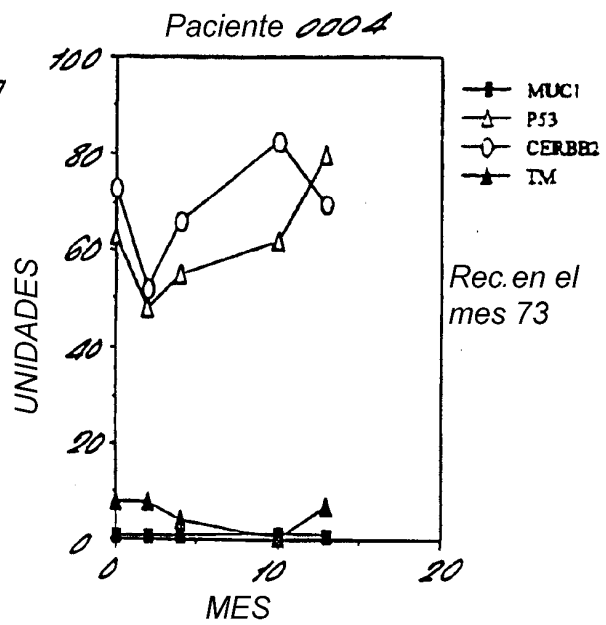
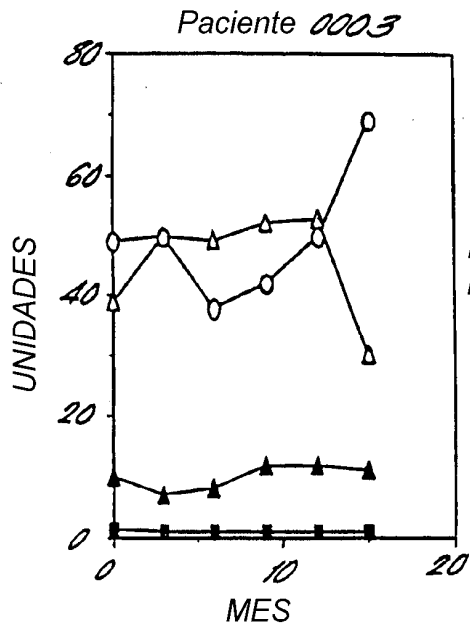
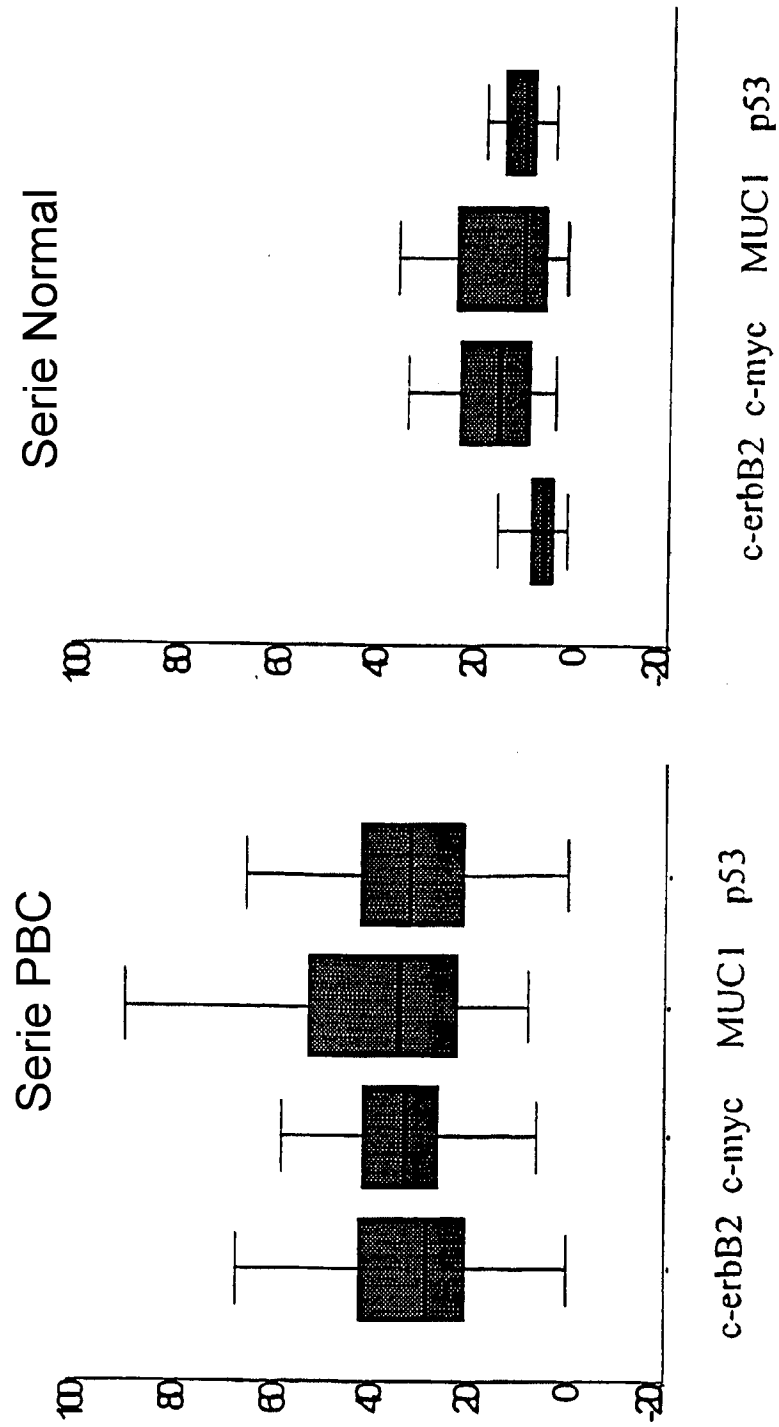


FIG. 4.



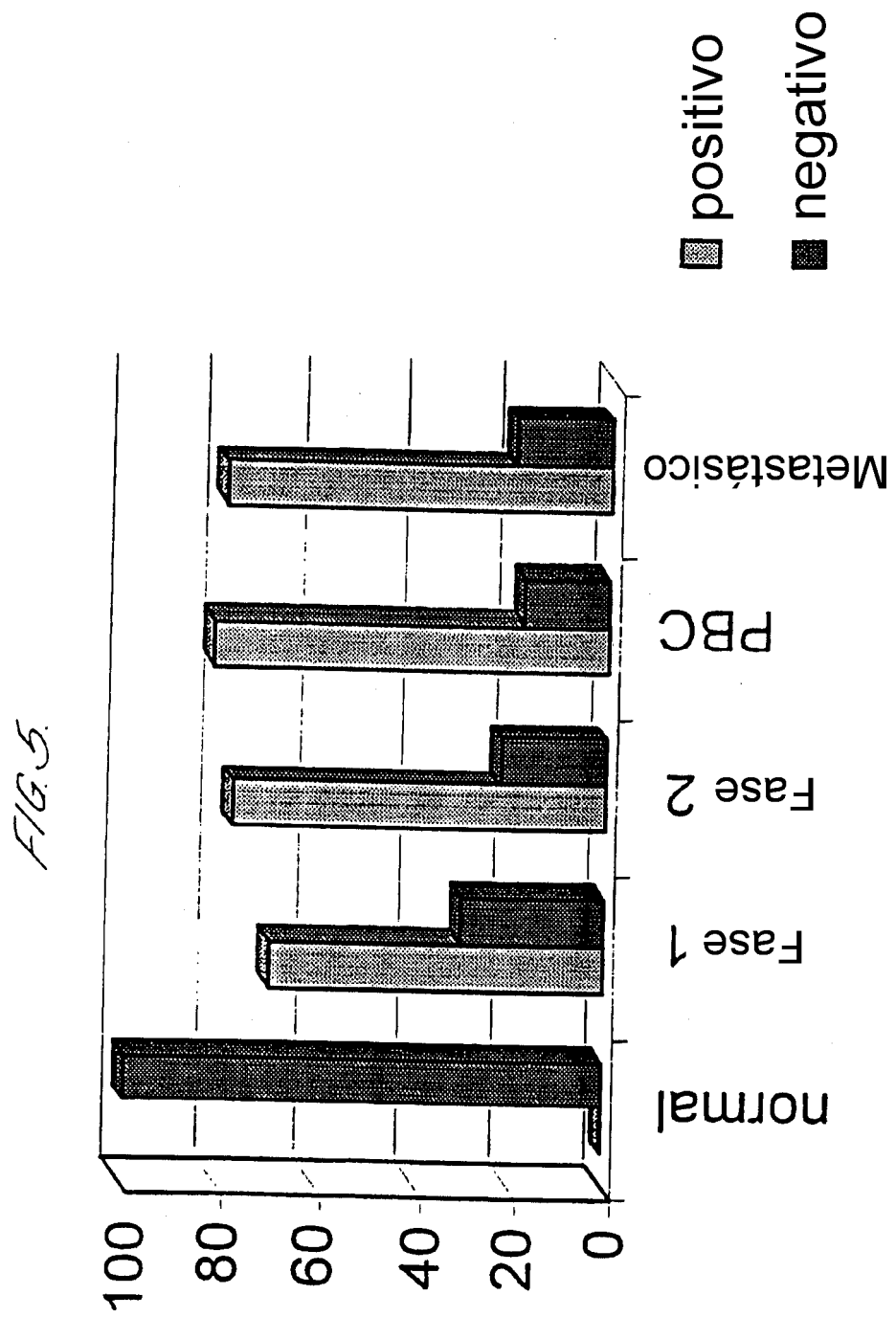


FIG. 6.

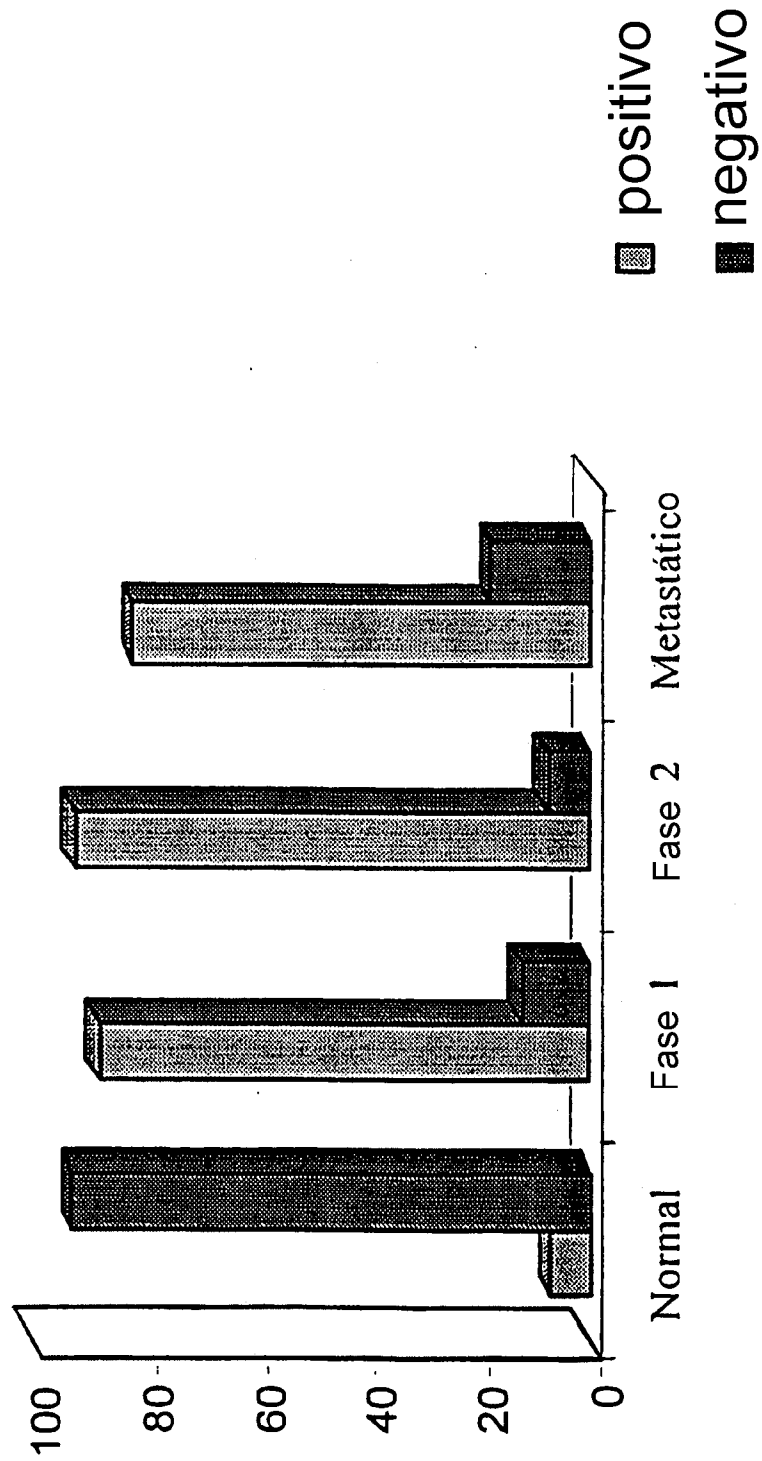
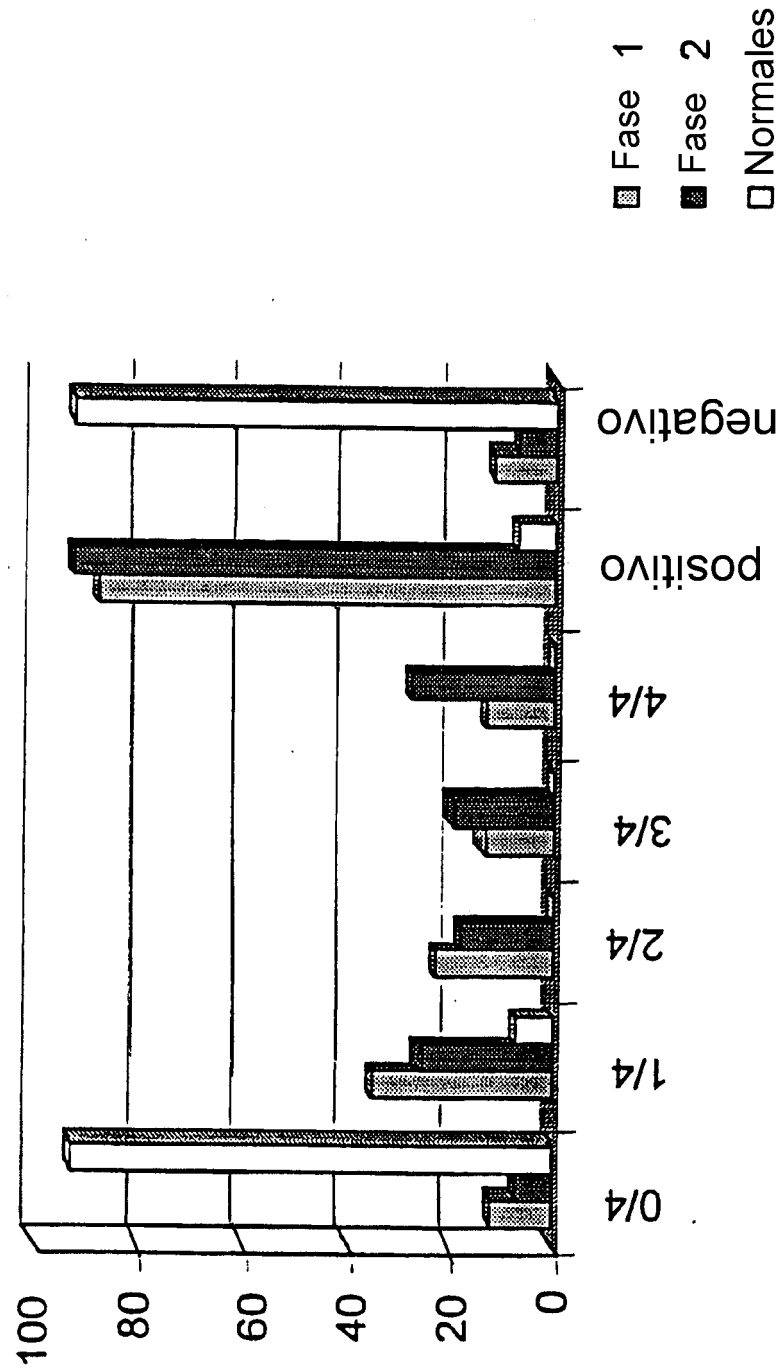


FIG. 7



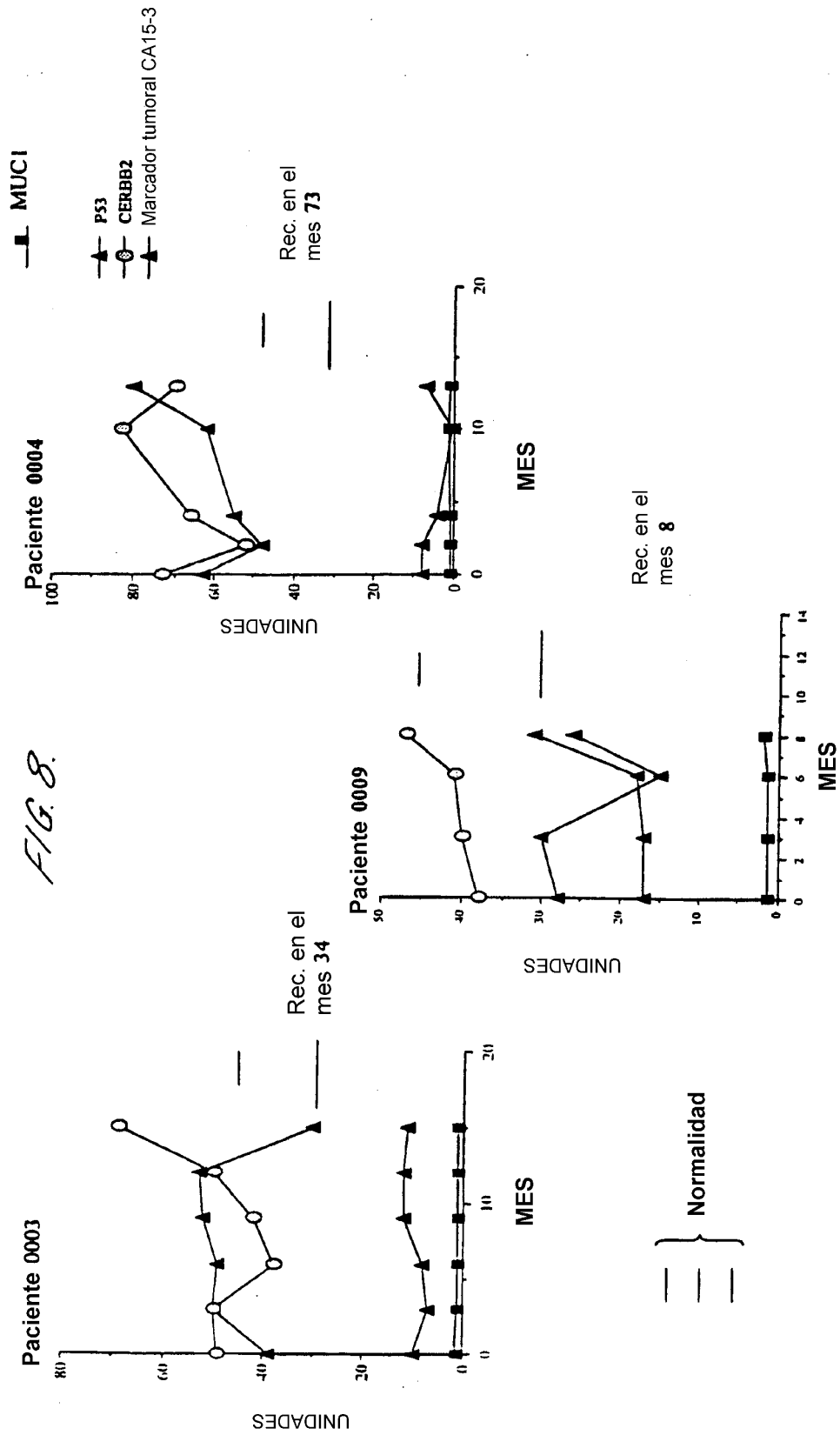


FIG. 9

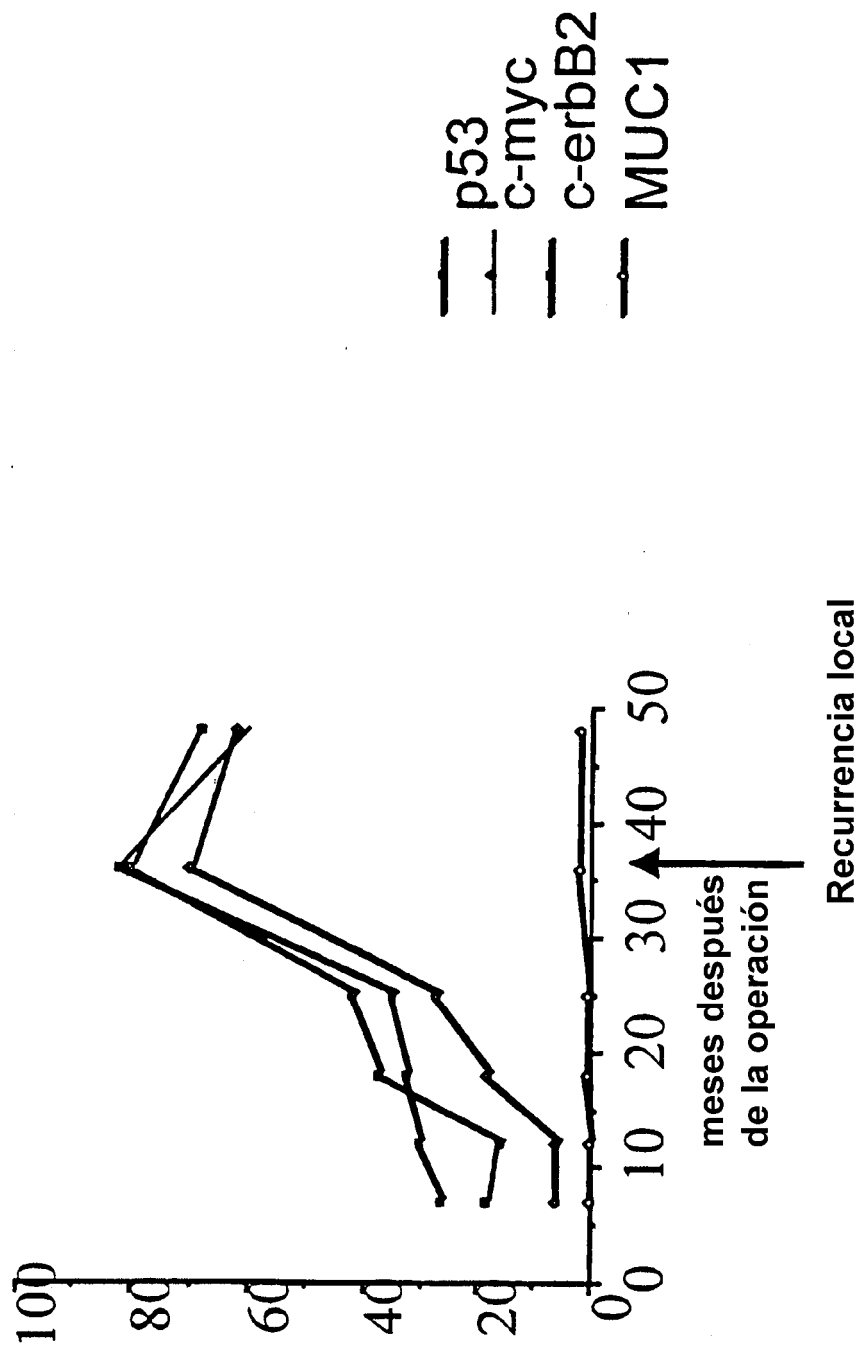
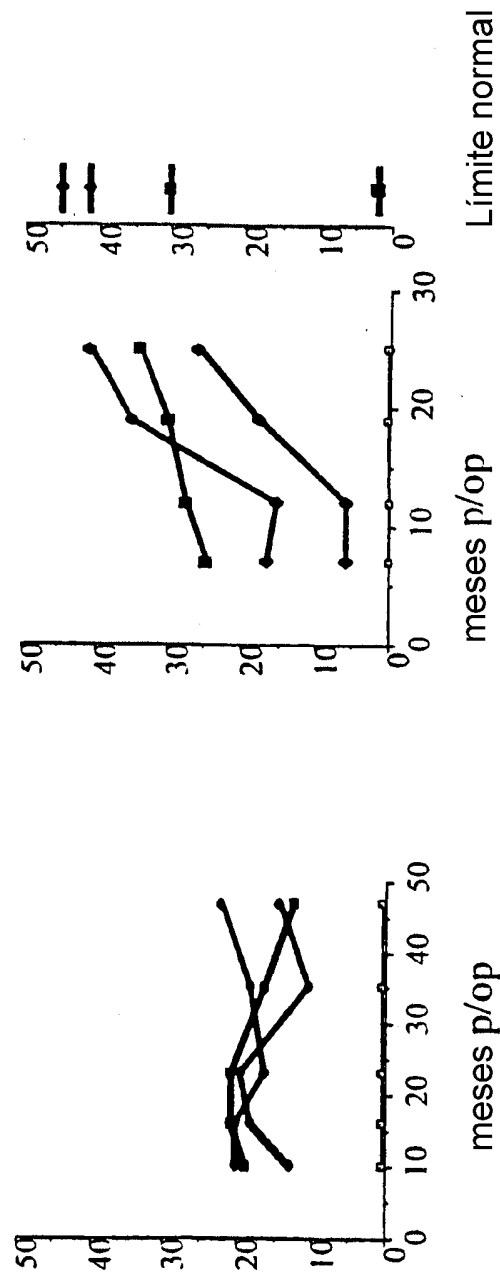


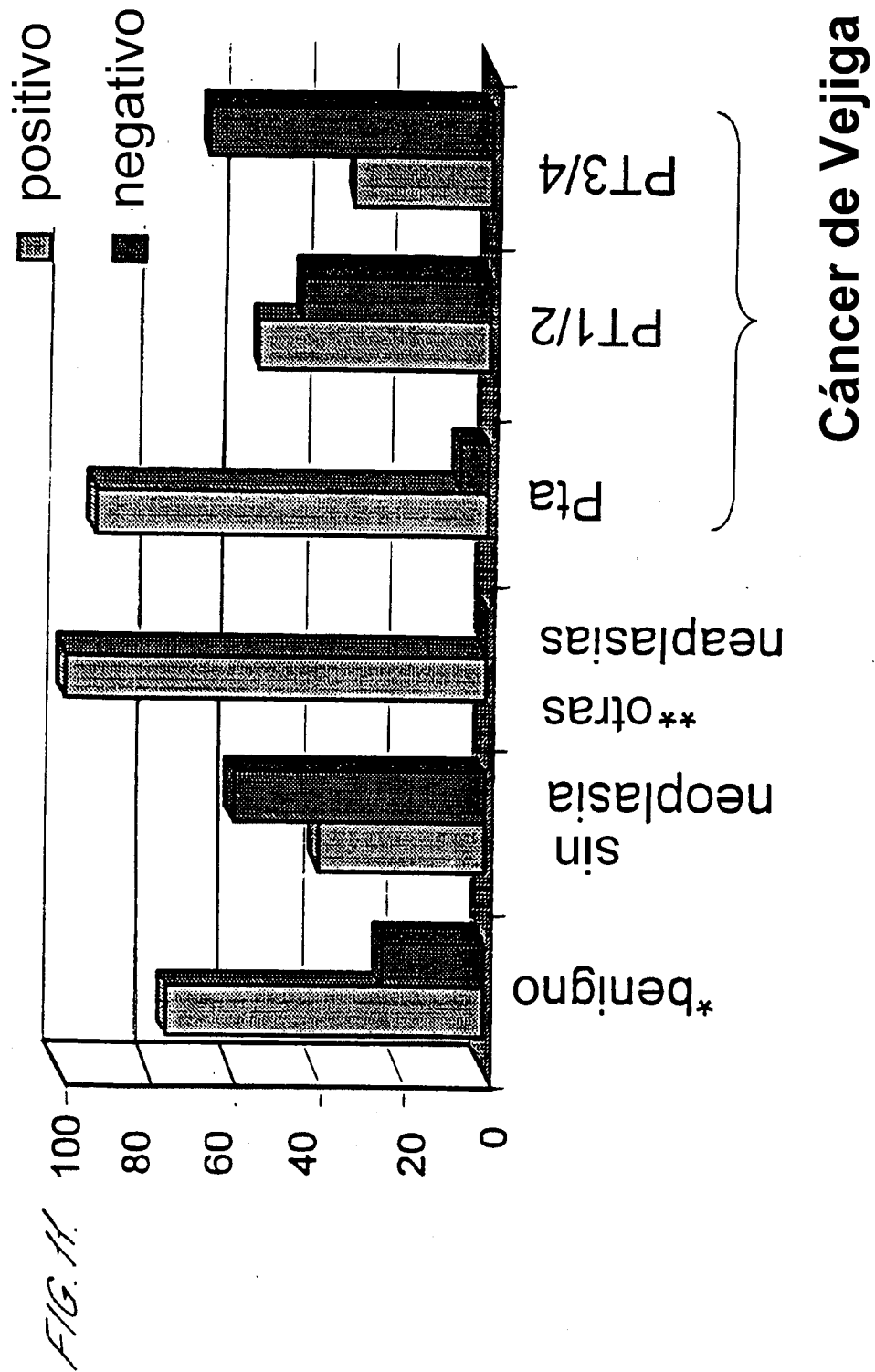
FIG. 10.

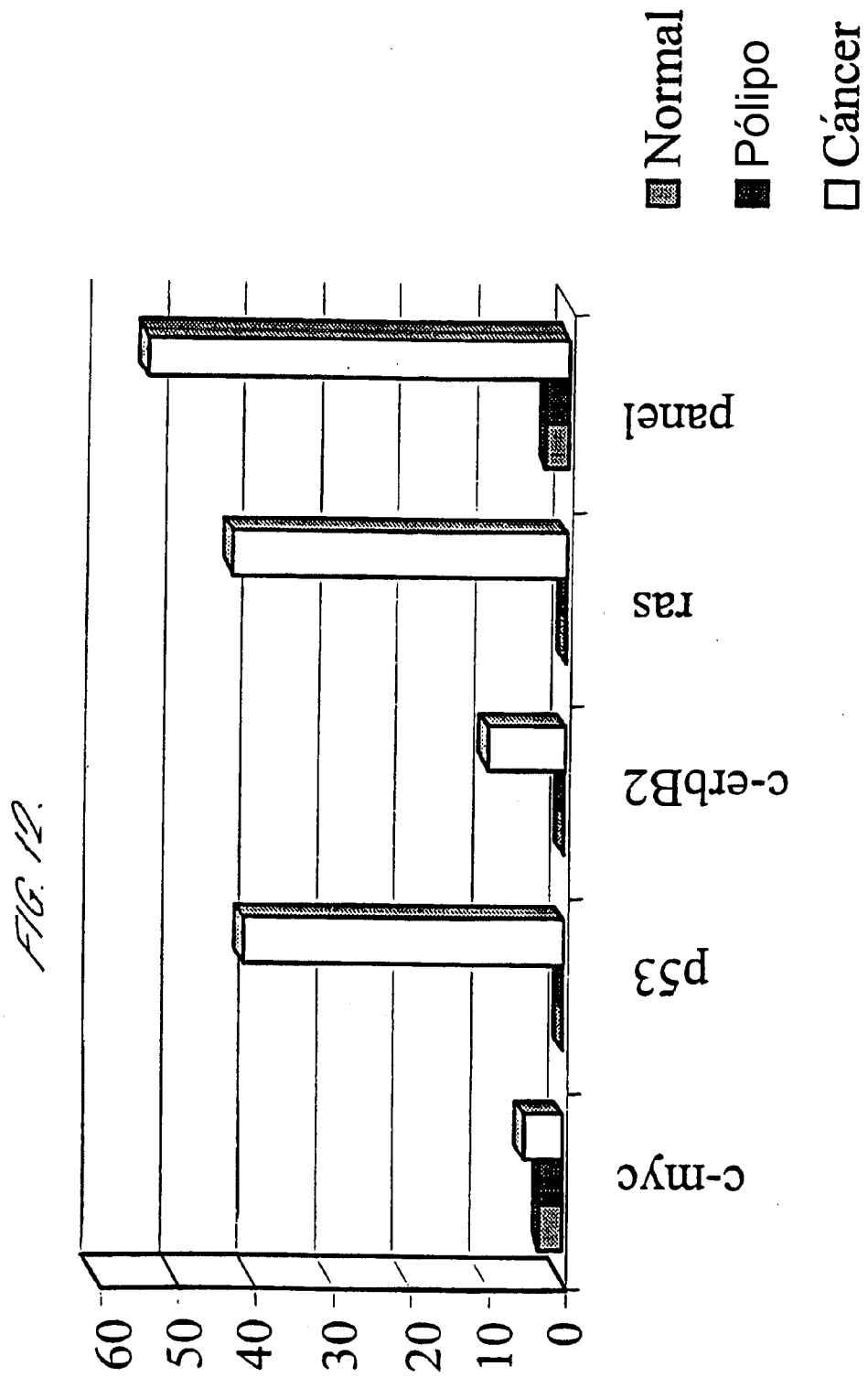


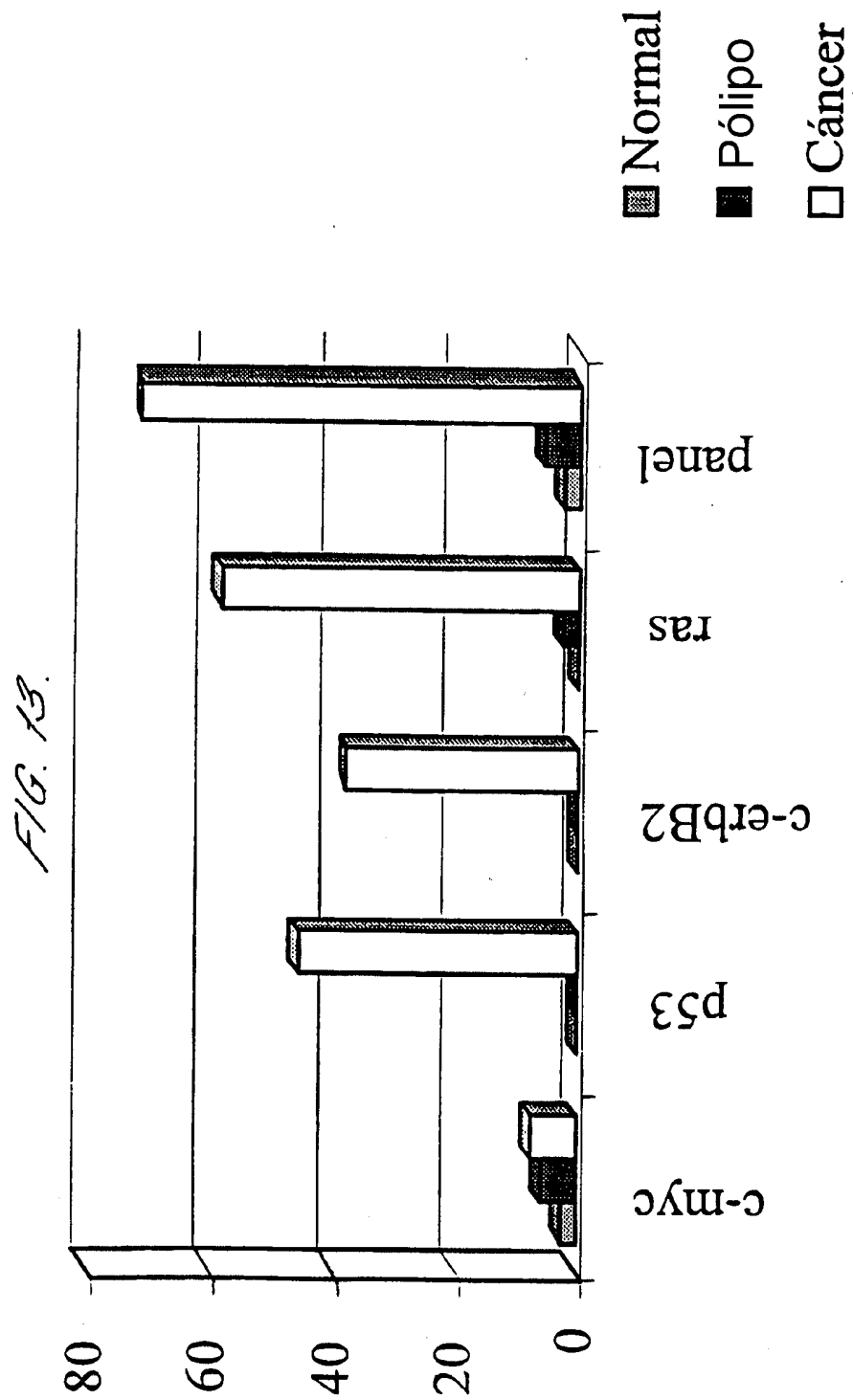
No Rec.

Rec. a 36/12

- MUC1
- p53
- c-erbB2
- c-myc







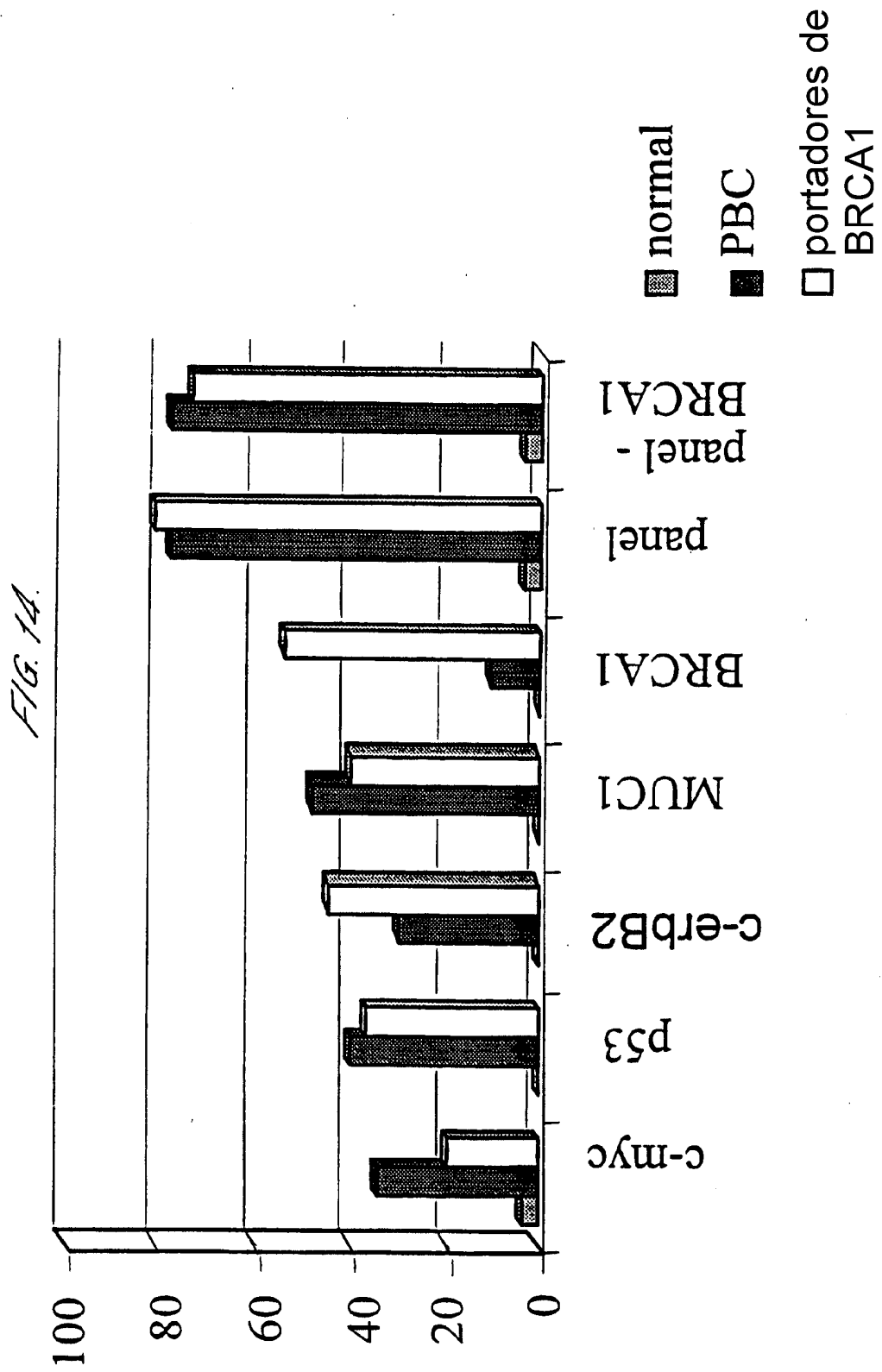


FIG. 15.

