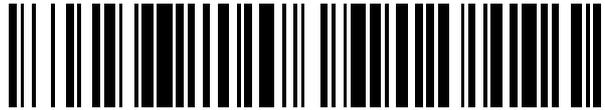


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 731**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/536** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2008 PCT/GB2008/004260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2009 WO09081165**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008 E 08865264 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2223114**

54 Título: **Calibrador para inmunoensayos**

30 Prioridad:

**24.12.2007 GB 0725239**

**26.12.2007 US 16689 P**

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

**04.11.2016**

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;  
MURRAY, ANDREA;  
CHAPMAN, CAROLINE y  
BARNES, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 588 731 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**

Calibrador para inmunoensayos

**5 Campo de la invención**

La invención se refiere generalmente al campo de los inmunoensayos. En particular, la invención se refiere al uso de un material calibrador para calibrar inmunoensayos para autoanticuerpos.

**10 Antecedentes de la invención**

La variación de un día al siguiente es inherente en cualquier inmunoensayo. Esta variación puede ser debida a numerosos factores variables incluyendo las condiciones ambientales, el envejecimiento del instrumento de medida o de los reactivos, los cambios de lotes en los reactivos y la variación biológica. En los estudios longitudinales, cuando se necesita comparar un resultado de ensayo en un día con otro medido en un día diferente, es necesario poder ajustar esta variación. La calibración del ensayo hace esto posible y puede también alertar al operario de problemas con la salida o la deriva diaria del instrumento.

En general, calibrar un inmunoensayo diseñado para medir un antígeno en suero es relativamente sencillo, ya que las formas recombinantes o sintéticas del antígeno producirse y cuantificarse fácilmente. Por tanto, se puede poner a disposición un material calibrador muy caracterizado y claramente definido.

Para ensayos diseñados para medir el nivel de autoanticuerpos humanos en una muestra de ensayo de un paciente, la identificación de un material calibrador adecuando está impedida por la especificidad diversa de los anticuerpos que se miden y la policlonalidad de la respuesta. Los presentes inventores han investigado el uso de anticuerpos monoclonales de ratón como calibradores para ensayos de autoanticuerpos. Sin embargo, estos requieren un sistema indicador diferente del utilizado para detectar autoanticuerpos humanos de tal manera que nunca se puede garantizar que la variación detectada sea una representación verdadera de la variación inherente en el ensayo del autoanticuerpo. Además, los anticuerpos monoclonales tienen una especificidad muy definida y carecen de la promiscuidad demostrada por las respuestas policlonales humanas. Esto significa que cambios sutiles en la estructura de captura del antígeno que dan como resultado una variación en el ensayo puede pasar desapercibidos. Si se deseara genomanipular un anticuerpo humanizado para su uso como un material calibrador se emplearía el mismo sistema indicador que el ensayo del autoanticuerpo, pero presentaría los mismos problemas de monoclonalidad que su homólogo murino.

Los inventores, por tanto, han tenido que buscar una nueva fuente de material de calibración que proporcionara una fuente de calibración a largo plazo en términos de tener suficiente volumen y también su capacidad para almacenarse durante un periodo prolongado de tiempo.

**40 Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la invención se refiere al uso de un material calibrador que comprende un fluido corporal de mamífero, y especialmente ser humano, para calibrar un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos, donde dicho material calibrador comprende un fluido, exudado o trasudado de drenaje.

En una realización, el material calibrador comprende fluido corporal humano.

El material calibrador comprende un fluido, exudado o trasudado de drenaje. Este material no contiene preferentemente ningún hemoproducto seleccionado entre el grupo que consiste en suero, sangre completa y plasma.

En una realización, el material calibrador comprende fluido corporal extraído de uno o más sujetos con cáncer.

En otra calibración, el material de calibración comprende fluido corporal extraído de una cavidad o espacio corporal donde está o estaba presente un tumor o con la que está o estaba asociado un tumor.

En determinadas realizaciones no limitantes, el material de calibración puede comprender fluido pleural o fluido de ascitis recogido de uno o más pacientes humanos con cáncer.

En una realización, el material de calibración contiene autoanticuerpos humanos naturales inmunológicamente específicos de una proteína marcadora tumoral y el inmunoensayo que se va a calibrar es un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos humanos naturales inmunológicamente específicos de una proteína marcadora tumoral.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para calibrar un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos que comprende:

- (a) poner en contacto cada una de una pluralidad de diferentes diluciones de un material de calibración que comprende un fluido corporal de mamífero con un antígeno específico del autoanticuerpo que se va a detectar en el inmunoensayo, donde dicho fluido corporal es conocido por contener autoanticuerpos inmunológicamente específicos del antígeno, y donde el material calibrador comprende, fluido, exudado o trasudados;
- 5 (b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho antígeno y el autoanticuerpo presente en el material de calibración; y
- (c) representar gráficamente o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la dilución del material de calibración para cada dilución del material de calibración utilizado en la etapa (a), calibrando de esta forma un inmunoensayo utilizando dicho antígeno para la detección de dicho autoanticuerpo.
- 10 En una realización, el material calibrador comprende fluido corporal humano.
- El material calibrador comprende un fluido, exudado o trasudado de drenaje. Este material no contiene preferentemente ningún hemoproducto seleccionado entre el grupo que consiste en suero, sangre completa y plasma.
- 15 En una realización, el material calibrador comprende fluido corporal extraído de uno o más sujetos con cáncer.
- En otra calibración, el material de calibración comprende fluido corporal extraído de una cavidad o espacio corporal donde está o estaba presente un tumor o con la que está o estaba asociado un tumor.
- 20 En una realización, el material calibrador comprende fluido corporal de mamífero y, en particular, de ser humano, extraído de una cavidad o espacio corporal donde está o estaba presente un tumor o con el que está o estaba asociado un tumor.
- 25 En determinadas realizaciones no limitantes, el material de calibración puede comprender fluido pleural o fluido de ascitis recogido de uno o más pacientes humanos con cáncer.
- En una realización, el material de calibración contiene autoanticuerpos humanos naturales inmunológicamente específicos de una proteína marcadora tumoral y el inmunoensayo que se va a calibrar es un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos humanos naturales inmunológicamente específicos de una proteína marcadora tumoral.
- 30 Por tanto, en una realización específica no limitante, la invención proporciona un método para calibrar un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos marcadores antitumorales que comprende:
- 35 (a) poner en contacto cada una de una pluralidad de diferentes diluciones de un material de calibración que comprende fluido pleural o fluido de ascitis aislado de uno o más pacientes con cáncer con un antígeno marcador tumoral específico del autoanticuerpo marcador antitumoral, donde dicho fluido pleural o fluido de ascitis es conocido por contener autoanticuerpos inmunológicamente específicos de dicho antígeno, y donde el material calibrador comprende, fluido, exudado o trasudados de drenaje;
- 40 (b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho antígeno y el autoanticuerpo presente en el material de calibración; y
- (c) representar gráficamente o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la dilución del material de calibración para cada dilución del material de calibración utilizado en la etapa (a), calibrando de esta forma un inmunoensayo utilizando dicho antígeno para la detección de dicho autoanticuerpo.
- 45 En un tercer aspecto, la invención proporciona un kit de inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos, comprendiendo dicho kit un conjunto de patrones de calibración para su uso en la calibración de un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos, donde cada patrón de calibración de dicho conjunto comprende una dilución diferente de un fluido corporal de mamífero, siendo dicho fluido corporal de mamífero conocido por contener autoanticuerpos humanos y donde el fluido corporal de mamífero es un fluido, exudado o trasudado de drenaje, y un reactivo de inmunoensayo que comprende un antígeno inmunológicamente específico de dichos autoanticuerpos.
- 50 En una realización, el fluido corporal de mamífero es un fluido corporal humano.
- En una realización, el fluido corporal de mamífero no comprende ningún hemoproducto seleccionado entre el grupo que consiste en suero, sangre completa y plasma.
- 55 El fluido corporal de mamífero es un fluido, exudado o trasudado de drenaje.
- En una realización, el fluido corporal de mamífero es un fluido corporal extraído de uno o más sujetos con cáncer.
- En una realización, el fluido corporal de mamífero es un fluido extraído de una cavidad o espacio corporal donde está o estaba presente un tumor o con el que un tumor está o estaba asociado.
- 60
- 65

En una realización, el fluido corporal de mamífero comprende fluido pleural extraído de uno o más sujetos con cáncer, tales como pacientes humanos con cáncer.

5 En una realización, el fluido corporal de mamífero comprende fluido de ascitis extraído de uno o más sujetos con cáncer, tales como pacientes humanos con cáncer.

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

10 Figura 1: Inhibición específica de antígeno de autoanticuerpos humanos en fluidos pleurales procedentes de pacientes de cáncer de mama avanzado.

15 Figura 2: Especificidad de fluidos pleurales para antígenos asociados a cáncer recombinante demostrada mediante transferencia Western. (a) fluido B3280 específico de p53, (b) fluido B1564 específico de NY-ESO-1, (c) fluido PL-061 específico de BGU4-5 y Anexina 1, (d) fluido B3084 específico de p53, CAGE y NY-ESO-1. Banda 1 = marcadores de peso molecular, banda 2 = VOL, banda 3 = p53, banda 4 = c-myc, banda 5 = CAGE, banda 6 = NY-ESO-1, banda 7 = GBU4-5, banda 8 = IKBKE, banda 9 = Anexina 1, banda 10 = Anexina 2.

20 Figura 3: Unión del suero a proteínas bacterianas contaminantes en proteínas recombinantes demostrada mediante transferencia Western. (a), (b). Banda 1 = marcadores de peso molecular, banda 2 = Anexina X1a, banda 3 = BRCA2, banda 4 = c-myc, banda 5 = ECD6, banda 6 = IKBKE, banda 7 = NY-ESO-1, banda 8 = p53, banda 9 = PSA, banda 10 = VOL.

25 Figura 4: Esta figura representa gráficamente las diluciones del fluido del paciente frente a la valoración de la concentración nM de NYESO revestido sobre la placa.

30 Figura 5: Reproducibilidad de las curvas de calibración producidas utilizando fluidos de drenaje. La curva representa el promedio de diez análisis, representándose la variación interensayo por la desviación estándar que se muestra como barras de error. Se muestra la reactividad a p53 (a), c-myc (b), ECD6 (c), NYESO (d), BRCA2 (e) PSA (f) y Anexina X1a (g).

35 Figura 6: Reactividad de C3/C4 de fluido pleural del paciente (a) y un combinado 83255/83258 de fluido pleural del paciente (b) frente a 160 nM de NYESO en 5 análisis donde la dilución log del fluido se representa gráficamente frente a la DO registrada. Los datos se corrigieron para la unión no específica sustrayendo la señal obtenida procedente de la unión al antígeno del control negativo, VOL.

40 Figura 7: Reactividad del combinado 83255/83258 de fluido pleural del paciente (a) y un combinado C3/C4 de fluido pleural del paciente (b) frente a 160 nM de p53 en 5 análisis donde la dilución del fluido registrada se representa gráficamente frente a la densidad óptica registrada. Los datos se corrigieron para la unión no específica sustrayendo la señal obtenida procedente de la unión al antígeno del control negativo, VOL.

45 Figura 8: Reactividad del combinado 83255/83258 de fluido pleural del paciente (a) y un combinado C3/C4 de fluido pleural del paciente (b) frente a 160 nM de BRCA2 en 5 análisis donde la dilución del fluido registrada se representa gráficamente frente a la DO registrada. Los datos se corrigieron para la unión no específica sustrayendo la señal obtenida procedente de la unión al antígeno del control negativo, VOL.

50 Figura 9: Reactividad del combinado 83255/83258 de fluido pleural del paciente (a) y un combinado C3/C4 de fluido pleural del paciente (b) frente a 160 nM de c-myc en 5 análisis donde la dilución del fluido registrada se representa gráficamente frente a la DO registrada. Los datos se corrigieron para la unión no específica sustrayendo la señal obtenida procedente de la unión al antígeno del control negativo, VOL.

55 Figura 10: Reactividad del combinado 83255/83258 de fluido pleural del paciente (a) y un combinado C3/C4 de fluido pleural del paciente (b) frente a 160 nM de PSA en 5 análisis donde la dilución del fluido registrada se representa gráficamente frente a la DO registrada. Los datos se corrigieron para la unión no específica sustrayendo la señal obtenida procedente de la unión al antígeno del control negativo, VOL.

60 Figura 11: Reactividad del combinado 83258/83255 de fluido pleural del paciente (a) y un combinado C3/C4 de fluido pleural del paciente (b) frente a 160 nM de ECD6 en 5 análisis donde la dilución del fluido registrada se representa gráficamente frente a la DO registrada. Los datos se corrigieron para la unión no específica sustrayendo la señal obtenida procedente de la unión al antígeno del control negativo, VOL.

65 Figura 12: Reactividad del combinado 83255/83258 de fluido pleural del paciente (a) y un combinado C3/C4 de fluido pleural del paciente (b) frente a 160 nM de Anexina X1a en 5 análisis donde la dilución del fluido registrada se representa gráficamente frente a la DO registrada. Los datos se corrigieron para la unión no específica sustrayendo la señal obtenida procedente de la unión al antígeno del control negativo, VOL.

Figura 13: Efecto de la calibración sobre la reproducibilidad de las muestras del control. Los autoanticuerpos contra p53 se midieron en 8 sueros del control en 5 ocasiones diferentes. Los valores brutos de DO se muestran en (a). Se analizó simultáneamente una curva del calibrador y esta se utilizó para extrapolar los valores de las muestras del control (b).

5

Figura 14: Efecto de la calibración sobre la reproducibilidad de las muestras del control. Se midieron los autoanticuerpos contra c-myc en 8 sueros del control en 5 ocasiones diferentes. Los valores brutos de DO se muestran en (a). Se analizó simultáneamente una curva del calibrador y esta se utilizó para extrapolar los valores de las muestras del control (b).

10

Figura 15: Efecto de la calibración sobre la reproducibilidad de las muestras del control. Los autoanticuerpos contra ECD6 se midieron en 8 sueros del control en 5 ocasiones diferentes. Los valores brutos de DO se muestran en (a). Se analizó simultáneamente una curva del calibrador y esta se utilizó para extrapolar los valores de las muestras del control (b).

15

Figura 16: Efecto de la calibración sobre la reproducibilidad de las muestras del control. Los autoanticuerpos contra NYESO se midieron en 8 sueros del control en 5 ocasiones diferentes. Los valores brutos de DO se muestran en (a). Se analizó simultáneamente una curva del calibrador y esta se utilizó para extrapolar los valores de las muestras del control (b).

20

Figura 17: Efecto de la calibración sobre la reproducibilidad de las muestras del control. Los autoanticuerpos contra BRCA2 se midieron en 8 sueros del control en 5 ocasiones diferentes. Los valores brutos de DO se muestran en (a). Se analizó simultáneamente una curva del calibrador y esta se utilizó para extrapolar los valores de las muestras del control (b).

25

Figura 18: Efecto de la calibración sobre la reproducibilidad de las muestras del control. Se midieron los autoanticuerpos contra PSA en 8 sueros del control en 5 ocasiones diferentes. Los valores brutos de DO se muestran en (a). Se analizó simultáneamente una curva del calibrador y esta se utilizó para extrapolar los valores de las muestras del control (b).

30

Figura 19: Efecto de la calibración sobre la reproducibilidad de las muestras del control. Se midieron los autoanticuerpos contra Anexina X1a en 8 sueros del control en 5 ocasiones diferentes. Los valores brutos de DO se muestran en (a). Se analizó simultáneamente una curva del calibrador y esta se utilizó para extrapolar los valores de las muestras del control (b).

35

Figura 20: Comparación del suero y fluidos de drenaje como materiales calibradores potenciales para los ensayos de autoanticuerpos. Se comparó el fluido pleural C3 (a) con la muestra de suero 18176 (b) procedente del mismo paciente.

40

Figura 21: Comparación del suero y fluidos de drenaje como materiales calibradores potenciales para los ensayos de autoanticuerpos. Se comparó el fluido pleural C7 (a) con la muestra de suero 11828 (b) procedente del mismo paciente.

45

Figura 22: Curvas logísticas de cuatro parámetros del calibrador con suma minimizada de cuadrados residuales. Se trazó la gráfica 4pl a partir de la densidad óptica frente a la dilución log del calibrador. Los promedios de los análisis 1 a 12 se muestran como líneas grises sólidas y los promedios de los análisis 13 y 14 se muestran como líneas negras discontinuas. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los promedios. Ensayos de autoanticuerpos específicos de antígenos para p53 (a), c-myc (b), CAGE (c), NY-ESO-1 (d), GBU4-5 (e), Anexina 1 (f) y Anexina 2(g).

50

Figura 23: Efecto de la calibración sobre la variabilidad de las medidas de anticuerpos realizadas en diferentes ciclos de ensayos. Se corrigieron los resultados de las muestras de suero utilizando la curva del calibrador específica de antígeno para este análisis. Triángulos abiertos = medidas sin calibrar, puntos sólidos = medidas ajustadas mediante calibración, líneas discontinuas = promedio de los valores calibrados más o menos 3 desviaciones estándar.

55

Figura 24: Comparación de alícuotas congeladas de series del calibrador con series del calibrador diluidas recientemente. Se dejó reaccionar fluido pleural C3 del calibrador con antígeno NYESO. Cada pareja de series frescas y congeladas se analizó 10 veces (a). Se proporciona la gráfica logarítmica promedio en (b) con barras de errores que representan desviaciones estándar.

60

Figura 25: Comparación de alícuotas congeladas de series del calibrador con series del calibrador diluidas recientemente. Se dejó reaccionar fluido C7 pleural del calibrador con antígeno c-myc. Cada pareja de series frescas y congeladas se analizó 10 veces (a). Se proporciona la gráfica logarítmica promedio en (b) con barras de errores que representan desviaciones estándar.

65

Figura 26: Comparación de alícuotas congeladas de series del calibrador con series del calibrador diluidas recientemente. Se dejó reaccionar fluido 83258 pleural del calibrador con antígeno p53. Cada pareja de series frescas y congeladas se analizó 10 veces (a). Se proporciona la gráfica logarítmica promedio en (b) con barras de errores que representan desviaciones estándar.

5  
Figura 27: Comparación de alícuotas congeladas de series del calibrador con series del calibrador diluidas recientemente. Se dejó reaccionar fluido 83258 pleural del calibrador con antígeno PSA. Cada pareja de series frescas y congeladas se analizó 10 veces (a). Se proporciona la gráfica logarítmica promedio en (b) con barras de errores que representan desviaciones estándar.

10  
Figura 28: Comparación de alícuotas congeladas de series del calibrador con series del calibrador diluidas recientemente. Se dejó reaccionar fluido 83258 pleural del calibrador con antígeno Anexina. Cada pareja de series frescas y congeladas se analizó 10 veces (a). Se proporciona la gráfica logarítmica promedio en (b) con barras de errores que representan desviaciones estándar.

15  
Figura 29: Comparación de alícuotas congeladas de series del calibrador con series del calibrador diluidas recientemente. Se dejó reaccionar fluido 83255 pleural del calibrador con antígeno BRCA2. Cada pareja de series frescas y congeladas se analizó 10 veces (a). Se proporciona la gráfica logarítmica promedio en (b) con barras de errores que representan desviaciones estándar.

20  
Figura 30: Comparación de alícuotas congeladas de series del calibrador con series del calibrador diluidas recientemente. Se dejó reaccionar fluido pleural C3 del calibrador con antígeno ECD6. Cada pareja de series frescas y congeladas se analizó 10 veces (a). Se proporciona la gráfica logarítmica promedio en (b) con barras de errores que representan desviaciones estándar.

25  
Figura 31: Reactividad de autoanticuerpos en fluidos de pacientes con diferentes tipos de cáncer con antígenos asociados a tumores.

30  
Figura 32: Reacción de una serie de diluciones de un fluido pleural procedente de un paciente con cáncer de páncreas con proteína del control negativo, VOL a 160 nM (a) y 50 nM (b). El experimento se repitió 5 veces en 5 días diferentes.

35  
Figura 33: Resultados de 4 análisis de fluido 82993 de ascitis frente a 160 nM de C-myc con barras de errores de desviación estándar en las Figuras a y b (la figura a representa gráficamente el valor de DO del suero del control utilizado en este experimento).

40  
Figura 34: Resultados de 4 análisis de fluido B3259 de ascitis frente a 160 nm de ECD6 con barras de errores de desviación estándar en las Figuras a y b (la figura a representa gráficamente el valor DO del suero del control utilizado en este experimento).

45  
Figura 35: Resultados de 4 análisis de fluido B2993 de ascitis frente a 160 nm de ECD6 con barras de errores de desviación estándar en las Figuras a y b (la figura a representa gráficamente el valor DO del suero del control utilizado en este experimento).

45 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere al uso de un material de calibración que comprende un fluido corporal de mamífero, y especialmente un ser humano, para calibrar un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos, y en particular, autoanticuerpos humano, donde dicho material calibrador comprende un fluido, exudado o trasudado de drenaje.

50  
En una realización, el material de calibración utilizado en el presente documento puede comprender fluido corporal humano como fuente de "autoanticuerpos humanos naturales", lo que significa que los autoanticuerpos se han producido en un hospedador humano como resultado de procesos inmunológicos naturales. Para evitar la duda, este material de calibración *no* comprende anticuerpos no humanos ni ningún anticuerpo humano o humanizado producido de forma exógena mediante técnicas de laboratorio, por ejemplo, anticuerpos monoclonales derivados de células inmunitarias cultivadas.

60  
El material de calibración puede comprender cualquier fluido corporal humano o de otro mamífero que sea un fluido, exudado o trasudado de drenaje conocido por contener autoanticuerpos de la especificidad inmunológica adecuada; es decir, el calibrador debe comprender un fluido corporal de mamífero (por ejemplo, un ser humano) conocido por ser positivo para el autoanticuerpo que se va a detectar en el inmunoensayo. A este respecto, debe saberse por adelantado que el fluido calibrador contiene autoanticuerpos que presentan especificidad inmunológica comparable con los autoanticuerpos que se desea detectar utilizando el inmunoensayo. Una ventaja del material de calibración es que contiene autoanticuerpos humanos naturales de especificidad inmunológica sustancialmente equivalente a autoanticuerpos humanos que se encuentran en suero humano, en términos de unión al antígeno utilizado como

reactivo en el inmunoensayo que se pretende calibrar.

Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, se puede determinar por adelantado si una muestra dada de un fluido corporal humano contiene autoanticuerpos de la especificidad inmunológica adecuada llevando a cabo un ensayo de prueba con un antígeno de prueba. En una realización, este ensayo de prueba puede utilizar el mismo antígeno y metodología de detección que se pretende utilizar en el inmunoensayo adecuado. Los fluidos corporales que demuestran contener autoanticuerpos inmunológicamente específicos del antígeno de prueba en dicho ensayo de prueba son adecuados para su uso como materiales del calibrador en inmunoensayos posteriores utilizando el mismo antígeno de ensayo para detectar los autoanticuerpos correspondientes en muestras de ensayo de pacientes con un estado de autoanticuerpos desconocido. En este contexto, las "muestras de ensayo" pueden definirse como muestras extraídas de sujetos que se van a someter a ensayo para determinar la presencia de autoanticuerpos, donde el estado del autoanticuerpo del paciente es desconocido antes del ensayo de la muestra.

No suele ser necesario determinar un título preciso de la cantidad de autoanticuerpo presente en el material de calibración antes del uso, particularmente cuando se utiliza el método de calibración de la invención, que utiliza múltiples diluciones del material de calibración para proporcionar un conjunto de patrones de calibración. La cantidad absoluta de autoanticuerpo presente en el conjunto de patrones de calibración no tiene que determinarse con precisión, con la condición de que el conjunto de patrones de calibración cubra el intervalo normal de títulos de autoanticuerpo que se podría esperar encontrar cuando se someten a ensayo las muestras de ensayo del paciente con un estado de anticuerpo desconocido en el inmunoensayo adecuado. Esto se puede determinar empíricamente analizando un intervalo de muestras de calibración diluidas en paralelo, en comparación con muestras de ensayo de un paciente típico.

El material de calibración puede consistir simplemente en un fluido corporal humano en la forma en que este se aísla del cuerpo humano (por ejemplo, fluido pleural o de ascitis "puro") o el fluido corporal puede premezclarse o diluirse con otros componentes para formar un material de calibración antes del uso. Normalmente, se prepara una serie de diluciones del fluido en un tampón adecuado para proporcionar un conjunto de patrones de calibración. Los tampones de dilución adecuados para la preparación de los patrones de calibración incluyen, por ejemplo, un tampón de elevada concentración salina de PBS + NaCl 0,5 M + caseína al 0,1 % + Tween 20 al 0,1 % (denominado en los ejemplos HSBT) o PBS que contiene BSA al 1 %. La invención contempla por tanto el uso de materiales del calibrador que consisten en fluido corporal de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) de un tipo descrito en el presente documento premezclado con uno de estos tampones de dilución. Los calibradores particularmente útiles consisten en fluido pleural humano o fluido de ascitis humano, que se puede obtener de uno o más pacientes humanos de cáncer, premezclados con HSBT. Alternativamente, podría utilizarse suero normal como diluyente del calibrador. Se contempla también concentrar el fluido corporal o (semi) purificar los anticuerpos y a continuación diluir este material para proporcionar patrones de calibración. Se pueden añadir componentes adicionales al material de calibración, por ejemplo, para aumentar la estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo.

Las muestras del material de calibración diluidas en tampón de dilución adecuado pueden dispensarse en alícuotas y almacenarse antes del uso. De forma conveniente, las alícuotas listas diluidas del material de calibración se pueden almacenar congeladas a -20°C u -80°C y descongelarse antes del uso. Los inventores han mostrado que los fluidos pleurales y de ascitis son estables al almacenamiento a -20 °C y se pueden almacenar congelados durante extensos periodos sin pérdida de la reactividad de autoanticuerpos. La predilución y la distribución en alícuotas de los patrones de calibración antes del almacenamiento en congelación a largo plazo son convenientes y evita errores de reproducibilidad y numerosos ciclos de congelación-descongelación.

El uso de muestras positivas conocidas como calibradores para inmunoensayos es una práctica bastante habitual en el campo de los inmunoensayos para la detección del antígeno. Sin embargo, es difícil proporcionar materiales de calibración adecuados que sean muestras positivas conocidas que contengan anticuerpos de especificidad adecuada cuando la diana del ensayo es un anticuerpo, más bien que un antígeno. La invención aborda este problema mediante el uso de un material de calibración que comprende un fluido corporal del que se sabe por adelantado que contiene anticuerpos de la especificidad adecuada.

Generalmente, se prefiere no usar fluidos corporales que sean o comprendan "hemoproductos", tales como sangre completa, plasma o suero, como la base del material calibrador. En vez de esto, el material calibrador comprende fluidos corporales que son fluidos, exudados o trasudados de drenaje, e incluye dichos materiales producidos durante o como resultado de la enfermedad. En realizaciones no limitantes, se puede seleccionar el fluido corporal entre: efusión pleural, ascitis, hidrocele, fluido de drenaje de heridas, fluido sinovial inflamatorio o no inflamatorio, seroma, fluido aspirado del pezón, efusión pericárdica, bilis, secreciones pancreáticas, etc. El fluido puede obtenerse de un sujeto humano o de un sujeto mamífero no humano, incluyendo, por ejemplo, perros y primates no humanos.

En determinadas realizaciones, el material de calibración puede comprender fluido corporal aislado de una cavidad o espacio corporal donde está o estaba presente un tumor o con el que esta o se asoció un tumor. A este respecto, el término "cavidad o espacio corporal" incluye cualquier cavidad o espacio corporal, ya sea una cavidad natural o un espacio o cavidad que surge como resultado de enfermedades o intervenciones médicas incluyendo cavidades colapsadas o antiguas. El fluido se deriva de dicha cavidad o espacio donde está o estaba presente un tumor o con

el que está o estuvo asociado un tumor. Preferentemente el "fluido corporal derivado de una cavidad corporal " será un fluido corporal inducido por tumor, que significa un fluido corporal que se ha producido durante el proceso patológico, por ejemplo, en respuesta a o como consecuencia de la presencia de células tumorales. A este respecto, fluidos de "cavidad corporal" ilustrativos son ascitis, efusión pleural, seroma, hidrocele y fluido de drenaje de heridas.

5 Para evitar dudas, los "fluidos corporales derivados de una cavidad o espacio corporal" no incluyen hemoproductos derivados de la circulación sistémica, tales como sangre completa, suero o plasma.

10 El fluido pleural y el fluido de ascitis son fuentes particularmente útiles de material de calibración para su uso de acuerdo con la invención ya que se obtienen normalmente en un gran volumen y se extraen de los pacientes como parte de la estrategia terapéutica. Este fluido, que se descartaría de otra forma, es una fuente valiosa de material de calibración. Como se ha reseñado anteriormente, los inventores han demostrado que los fluidos de la "cavidad humana" tales como el fluido pleural y de ascitis son materiales de calibración adecuados en inmunoensayos para la detección de autoanticuerpos en suero humano, ya que estos fluidos contienen autoanticuerpos que son comparables a los presentes en suero humano, tanto en términos de especificidad inmunológica de unión al antígeno con también para el isotipo del anticuerpo. El último es importante ya que permite que se use el mismo sistema de detección para los autoanticuerpos en el material de calibración y anticuerpos de especificidad de unión a antígeno equivalente presentes en muestras de ensayo de suero de pacientes.

20 El material de calibración puede comprender fluido corporal, y más específicamente fluido de "cavidad corporal" tal como fluido pleural o fluido de ascitis, extraído de uno o más pacientes de cáncer. En este contexto, el término "paciente de cáncer" incluye un individuo previamente diagnosticado de cáncer, incluyendo, pero no de forma limitativa, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, linfoma y leucemia o cáncer de mama. El fluido puede tomarse de un único paciente o se pueden combinar entre sí los fluidos de dos o más pacientes. Las muestras de fluido pueden combinarse de dos o más pacientes que tiene el mismo o diferentes estadios del mismo o diferentes tipos de cánceres. Se contempla también combinar diferentes tipos de fluidos corporales a partir de un único o múltiples pacientes de cáncer.

30 Se puede usar un material de calibración preparado a partir de fluido corporal tomado de paciente(s) de cáncer con un tipo concreto de cáncer para ayudar en el diagnóstico de los mismos tipos de cáncer o de diferentes tipos de cáncer en otros individuos. Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, los autoanticuerpos humanos naturales específicos de proteínas marcadoras tumorales están presentes en fluidos pleurales tomados de pacientes con cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas y cáncer de mama. Una vez que se ha establecido la presencia de autoanticuerpos de la especificidad inmunológica requerida usando un ensayo de prueba, dichos fluidos se pueden usar para calibrar inmunoensayos para analizar autoanticuerpos de especificidad inmunológica equivalente en las muestras de ensayo de pacientes con otros tipos de cáncer, por ejemplo, los inmunoensayos para autoanticuerpos en suero de cáncer de mama pueden calibrarse usando material de calibración que comprende fluido pleural (y otros fluidos de cavidades corporales) de paciente(s) con cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, o cáncer de páncreas.

45 En una realización, se puede usar una solución madre de material de calibración preparada a partir de un paciente diagnosticado de cáncer para calibrar un inmunoensayo llevado a cabo una fecha posterior para evaluar el estado inmunitario del mismo paciente o de un paciente diferente, por ejemplo, para vigilar la progresión de la enfermedad y/o evaluar la eficacia de un curso de tratamiento anticanceroso en este paciente.

50 Durante el uso, el material de calibración de la invención se puede usar para calibrar inmunoensayos para la detección de autoanticuerpos realizada de acuerdo con métodos conocidos. Normalmente, el inmunoensayo puede tomar la forma de un ELISA directo, de tipo sándwich o competitivo, pero están también comprendidas en el alcance de la invención otras metodologías de ensayo. Las características generales de los inmunoensayos para la detección de autoanticuerpos humanos marcadores antitumorales se describen en los documentos WO 99/58978 y WO 2006/126008. El material calibrador proporcionado por la presente invención se puede usar para calibrar los ensayos descritos en los documentos WO 99/58978 y WO 2006/126008.

55 El material de calibración descrito en el presente documento, y los kits de inmunoensayos que comprenden conjuntos de patrones de calibración que comprenden este material de calibración, se pueden usar para calibrar un inmunoensayo para cualquier tipo de autoanticuerpo que sirva como un marcador de un estado de enfermedad o de susceptibilidad a la enfermedad, donde la enfermedad en cuestión tiene el potencial de producir/inducir la formación de un fluido corporal del tipo descrito en el presente documento, que comprende autoanticuerpos de especificidad inmunológica comparable a la de los autoanticuerpos que sirven como marcador de la enfermedad.

65 Los ejemplos de enfermedades que se asocian normalmente con la producción de fluidos corporales que contienen autoanticuerpos incluyen cánceres de los tipos citados en el presente documento. Como se ha explicado anteriormente, los fluidos corporales obtenidos de pacientes de cáncer, y en particular "fluidos de cavidades corporales" tales como fluido pleural, fluido de ascitis, hidrocele, seroma, fluido de drenaje de heridas, etc., proporciona una fuente útil de material de calibración positivo que contiene autoanticuerpos específicos de

5 marcadores tumorales. Este material de calibración puede por tanto utilizarse para calibrar inmunoensayos para la detección del cáncer o enfermedades neoplásicas tempranas en muestras de ensayo de pacientes (por ejemplo, muestras de suero de pacientes de estado de autoanticuerpos desconocido). Dichos ensayos (para la detección de autoanticuerpos marcadores antitumorales en muestras de ensayo de pacientes) se pueden llevar a cabo utilizando los métodos descritos en los documentos WO 99/58978 y WO 2006/126008 o en las modificaciones de los mismos.

10 Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita al uso de fluidos derivados de cáncer, ni tampoco a la detección de autoanticuerpos de marcadores tumorales, aunque esta es una realización importante. Otro grupo de enfermedades asociadas con la producción de fluidos corporales (diferentes del suero, sangre completa o plasma) que contienen características de anticuerpos de la enfermedad son las enfermedades autoinmunes benignas. La invención contempla por tanto el uso de fluidos corporales obtenidos de sujetos mamíferos (por ejemplo, seres humanos) sin enfermedad autoinmune benigna como materiales de calibración de inmunoensayos para la detección de autoanticuerpos que son marcadores de la enfermedad autoinmunitaria. Los ejemplos de dichas enfermedades autoinmunitarias incluyen la artritis reumatoide (AR), el lupus sistémico eritematoso (LSE) cirrosis biliar primaria (CBP), tiroiditis autoinmunitaria (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto), gastritis autoinmunitaria (por ejemplo, anemia perniciosa), adrenalitis autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Addison), hipoparatiroidismo autoinmunitario, diabetes autoinmunitaria (por ejemplo, diabetes de Tipo 1) o miastenia grave.

20 En el caso de la artritis reumatoide, el material calibrador puede comprender o consistir en un exudado asociado con el proceso de la enfermedad, normalmente un fluido que se acumula en una articulación, tal como un fluido sinovial inflamatorio aislado de la rodilla de un paciente con AR.

25 En el caso del lupus sistémico eritematoso (LSE), el material calibrador puede comprender o consistir en fluido de ascitis obtenido de pacientes con LSE (véase Lacconi et al. Internet Journal of Radiology, ISSN: 1528-8404). A este respecto, debe señalarse que no todos los fluidos de ascitis (o, por tanto, otros fluidos de cavidades corporales tales como efusiones pleurales) se asocian con la presencia de un tumor.

30 En el caso de cirrosis biliar, el material calibrador puede comprender o consistir en fluido de ascitis obtenido de pacientes con cirrosis biliar.

35 Las características generales de los inmunoensayos, por ejemplo, radioinmunoensayos ELISA y similares, son bien conocidas de los expertos en la materia (véase Immunoassay, E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996). Los inmunoensayos para la detección de anticuerpos que tienen una especificidad inmunológica concreta (por ejemplo, autoanticuerpos que tienen una reactividad inmunológica con un antígeno dado, tales como una proteína marcador tumoral) requieren generalmente el uso de un reactivo que comprende un antígeno que presenta reactividad inmunológica específica con el anticuerpo en ensayo. Dependiendo del formato del ensayo, este reactivo puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. Una muestra de ensayo que se va a analizar para determinar la presencia del anticuerpo se pone en contacto con el reactivo y, si los anticuerpos de la reactividad inmunológica requerida están presentes en la muestra de ensayo, reaccionarán inmunológicamente con el reactivo para formar complejos autoanticuerpo-reactivo que se pueden a continuación detectar o medirse cuantitativamente. Dichos inmunoensayos se calibran normalmente llevando a cabo ensayos paralelos utilizando los mismos reactivos utilizados para detectar (auto) anticuerpos en la muestra de ensayo, pero sustituyendo la muestra de ensayo con uno o más patrones de calibración, que son muestras de material de calibración conocidas por contener (auto) anticuerpos de la especificidad inmunológica adecuada.

45 El método de calibración preferido utilizando el material de calibración de la invención utiliza un conjunto de patrones de calibración, normalmente diluciones en serie del material de calibración de la invención, que se someten a ensayo frente a una o más concentraciones conocidas de antígeno. En el ELISA de "tipo sándwich" normal, el antígeno que tiene especificidad para los autoanticuerpos en ensayo se inmoviliza sobre una superficie sólida (por ejemplo, los pocillos de una placa de ensayo de microvaloración normalizada, o la superficie de una microperla) y una muestra del calibrador (o la muestra de ensayo que se va a analizar para determinar la presencia de autoanticuerpos) se pone en contacto con el antígeno inmovilizado. Los autoanticuerpos de la especificidad deseada presentes en el material calibrador se unirán al agente inmovilizado. Los complejos autoanticuerpo/antígeno unidos pueden detectarse a continuación utilizando cualquier método adecuado.

55 La invención proporciona por tanto un método para calibrar un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos que comprende:

- 60 (a) poner en contacto cada una de una pluralidad de diluciones diferentes de un material de calibración que comprende un fluido corporal humano o de otro mamífero con un antígeno (inmunológicamente) específico de un autoanticuerpo, donde dicho fluido corporal humano es conocido por contener autoanticuerpos inmunológicamente específicos para el antígeno, donde el material del calibrador comprende un fluido, exudado o trasudado de drenaje;
- 65 (b) detectar la cantidad de unión (inmunológicamente) específica entre dicho antígeno y el autoanticuerpo presente en el material de calibración; y
- (c) representar gráficamente o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la dilución

del material de calibración para cada dilución del material de calibración utilizado en la etapa (a), calibrando de esta forma un inmunoensayo utilizando dicho antígeno para la detección de dicho autoanticuerpo.

5 La metodología precisa utilizada para detectar la unión específica en la etapa (b) no es limitante de la invención. En una realización, un anticuerpo secundario marcado dirigido contra una inmunoglobulina humana, que reconoce específicamente un epítipo común a una o más clases de inmunoglobulinas humanas, se usa para detectar los complejos autoanticuerpo/antígeno. Normalmente, el anticuerpo secundario se dirigirá contra IgG o IgM. El anticuerpo secundario se marca usualmente con un marcador detectable, normalmente un marcador enzimático tal como, por ejemplo, peroxidasa o fosfatasa alcalina, permitiendo la detección cuantitativa mediante la adición de un sustrato de la enzima que genera un producto detectable, por ejemplo, un producto coloreado, quimioluminiscente o fluorescente. Se pueden usar con efecto equivalente otros tipos de marcas detectables conocidas en la técnica.

15 La concentración del antígeno utilizado en la etapa (a) se selecciona para proporcionar un amplio intervalo dinámico en términos de las medidas de unión obtenidas en la etapa (b), a fin de proporcionar calibración para un amplio intervalo de medidas de autoanticuerpos. Esta es una consideración particularmente importante en relación con los inmunoensayos para la detección de autoanticuerpos marcadores antitumorales, que por definición son policlonales y presentan una variación de un paciente a otro en términos de la fuerza de la unión antígeno/autoanticuerpo, así como la cantidad absoluta de autoanticuerpo presente. La concentración del antígeno utilizado será normalmente mayor que 20 nM, y más concretamente está en el intervalo de entre 20 nM a 180 nM, o en el intervalo de entre 20 nM a 160 nM.

25 Se pueden analizar tantas diluciones del material de calibración como sean necesarias para construir en parte una amplia curva de calibración en el apartado (c). Normalmente, se someten a ensayo al menos 6 diluciones diferentes del material de calibración en cada concentración de antígeno utilizada, pero no se pretende que este número sea limitante.

30 Un uso preferido del material de calibración descrito en el presente documento es un calibrador de inmunoensayos para la detección de autoanticuerpos humanos naturales inmunológicamente específicos de marcadores tumorales humanos, estando estos autoanticuerpos normalmente asociados a cáncer.

35 El desarrollo y la progresión del cáncer en un paciente se encuentra generalmente 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 tumor markers. Publicado por Verlag GMBH, ISBN 3-926725-07-9; Harris et al., J Clin Oncol., 25: 5287-5312 2007; Voorzanger-Rousselot and Garnero, Cancer Treatment Reviews, 31: 230-283, 2007). Los marcadores tumorales a menudo se encuentran como formas alteradas de proteínas naturales 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 posterior a la traducción, por ejemplo, glicosilación anómala. Además, las proteínas naturales que están reguladas en exceso o expresadas en exceso en células tumorales, posiblemente como resultado de la amplificación génica o de una regulación transcripcional anómala, pueden ser también marcadores tumorales.

45 Las diferencias entre una proteína natural expresada por células "normales" y una proteína marcadora tumoral correspondiente pueden conducir, en algunos casos, a que se reconozca la proteína marcadora tumoral por el sistema inmunitario de un individuo como "no propia" y a estimular una respuesta inmunitaria en este individuo. Esta puede ser una respuesta inmunitaria humoral (es decir, mediada por linfocitos B) que conduce a la producción de autoanticuerpos inmunológicamente específicos de la proteína marcadora tumoral. Los autoanticuerpos son anticuerpos de origen natural dirigidos contra un antígeno que el sistema inmunitario del individuo reconoce como extraño incluso aunque este antígeno se haya originado realmente en el individuo. Pueden estar presentes en la circulación como autoanticuerpos libres en circulación o en la forma de complejos inmunitarios en circulación que consisten en autoanticuerpos unidos a su proteína marcadora tumoral diana.

50 La expresión autoanticuerpos marcadores antitumorales "asociados a cáncer" se refiere a autoanticuerpos que son característicos de la patología del cáncer, y que se dirigen contra epítopos presentes en formas de proteínas marcadoras tumorales que se expresan preferentemente en la patología del cáncer.

55 Normalmente, los antígenos marcadores tumorales utilizados para detectar autoanticuerpos marcadores antitumorales comprenden proteínas marcadoras tumorales recombinantes (expresadas en células bacterianas, de insectos, levaduras o de mamíferos) o antígenos marcadores tumorales sintetizados químicamente, que pueden comprender proteínas marcadoras tumorales sustancialmente completas, o fragmentos de las mismas, tales como antígenos de péptidos cortos. Otras fuentes potenciales de proteínas asociadas a tumor para su uso como base de los reactivos de inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos antitumorales incluyen células tumorales cultivadas (y el agotamiento de los medios utilizados para su crecimiento), tejido tumoral, y suero de individuos con neoplasia, u otros fluidos corporales de uno o más pacientes de cáncer (como se describe en el documento WO 2004/044590).

El material de calibración descrito en el presente documento se puede usar para calibrar inmunoensayos para la detección de una amplia gama de autoanticuerpos marcadores antitumorales contra diferentes marcadores tumorales, sin tener en cuenta la naturaleza del antígeno utilizado en dichos ensayos. Una característica clave del material de calibración utilizado en la presente invención (y especialmente el material de calibración que comprende fluido pleural o fluido de ascitis de uno o más pacientes de cáncer) es que contiene autoanticuerpos que se asemejan estrechamente a los presentes en muestras de ensayo de pacientes de cáncer (por ejemplo, suero de paciente de cáncer) en términos de especificidad de unión a antígeno. Este material de calibración se puede usar con antígenos marcadores tumorales recombinantes, antígenos de péptidos sintéticos marcadores tumorales, o antígenos naturales marcadores de tumores modificados.

No se pretende que la invención esté limitada con respecto a la diana del inmunoensayo, es decir, la especificidad del autoanticuerpo que se pretende detectar. El material de calibración descrito en el presente documento se puede usar para calibrar un inmunoensayo para cualquier autoanticuerpo presente en el propio material de calibración. Un material de calibración único puede contener numerosos autoanticuerpos diferentes de diferente especificidad inmunológica y, por tanto, el mismo material puede utilizarse para calibrar numerosos ensayos diferentes. A modo de ejemplo, que se ha mostrado en los ejemplos presentes que las muestras de efusión pleural humana contienen autoanticuerpos para una gama de marcadores tumorales, incluyendo p53, c-myc, ECD-6 (fragmento extracelular HER2/neu), NY-ESD1, BRCA2, PSA y Anexina X1-A.

Se describe un material de calibración que se puede utilizar para cuantificar la cantidad de proteína etiquetada unida a una superficie sólida, tal como los pocillos de una placa de microvaloración, debido a la presencia en el material de calibración de autoanticuerpos naturales inmunológicamente específicos de un componente de la etiqueta peptídica de la proteína "etiquetada", tal como por ejemplo una etiqueta de histidina o una etiqueta de biotina. Se ha observado que determinadas muestras de fluido pleural aisladas de pacientes de cáncer contienen anticuerpos inmunológicamente específicos para etiquetas de histidina y/o biotina unidas a antígenos marcadores tumorales recombinantes. Estos fluidos pleurales pueden por tanto utilizarse para proporcionar un ELISA cuantitativo genérico de proteínas recombinantes que contienen etiquetas de histidina y/o biotina que utilizan un anticuerpo humano natural específico de la etiqueta, junto con un anticuerpo secundario dirigido contra inmunoglobulina humana marcado. Este método proporciona determinadas ventajas sobre el uso de anticuerpos monoclonales de murino para cuantificar el antígeno etiquetado unido a un soporte sólido en el contexto global de los inmunoensayos para autoanticuerpos marcadores antitumorales, ya que este usa el mismo sistema indicador que se usa para medir autoanticuerpos humanos naturales específicos del propio antígeno marcador tumoral. De esta manera, en una única placa de ensayo, se puede llevar a cabo un ensayo para cuantificar la cantidad de antígeno marcador tumoral recombinante etiquetado unido a la placa utilizando material de calibración que contiene autoanticuerpos naturales contra la parte de etiqueta de histidina o etiqueta de biotina del antígeno y, en paralelo, analizar un conjunto de patrones de calibración para la unión del mismo antígeno recombinante etiquetado a autoanticuerpos marcadores antitumorales naturales, y usar el mismo sistema indicador para ambos ensayos.

Se describe un método para cuantificar la cantidad de proteína unida a una superficie sólida, donde dicha proteína comprende una etiqueta, comprendiendo el método: poner en contacto la superficie sólida que se va a someter a ensayo para determinar para la presencia de dicha proteína con un material reactivo que comprende un fluido corporal humano, donde dicho fluido corporal es conocido por contener un anticuerpo humano natural inmunológicamente específico para la etiqueta, y medir la cantidad de unión específica entre el anticuerpo humano natural y la etiqueta, cuantificando de esta forma la cantidad de dicha proteína presente sobre la superficie.

En este contexto, el término "etiqueta" se refiere a un resto químico unido a la proteína que no está presente en ninguna forma naturalmente expresada de la proteína. La etiqueta puede ser un polipéptido, en cuyo caso, la etiqueta consiste en una secuencia de aminoácidos que no es contigua a la secuencia de aminoácidos de cualquier forma de la proteína expresada naturalmente.

La proteína que se va a cuantificar sobre la superficie sólida es normalmente una proteína expresada recombinantemente. Los ejemplos de etiquetas normalmente unidas a proteínas expresadas recombinantemente incluyen etiquetas de biotina y etiquetas de histidina. Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, aproximadamente el 10 % de la población humana contiene anticuerpos humanos que son inmunológicamente específicos de la biotina. Los individuos humanos con anticuerpos naturales específicos de etiquetas de histidina pueden identificarse también en la población humana normal.

Se entenderá que los análisis estadísticos y matemáticos de los datos de la curva de calibración obtenidos de acuerdo con la presente invención pueden incluir, pero no de forma limitativa, gráficos logísticos de cuatro parámetros.

La invención se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

**Materiales y métodos**

**Preparación del material de calibración**

5 Se recogieron fluidos pleurales y de ascitis de pacientes de cáncer bajo consentimiento informado utilizando protocolos normalizados. Normalmente, se recogieron los fluidos mediante inserción de un drenaje en la cavidad torácica o en la cavidad peritoneal con anestesia local. El drenaje puede insertarse con o sin control guiado por imágenes (por ejemplo, ultrasonidos) dependiendo de los protocolos locales y de la práctica del especialista médico a cargo del tratamiento.

10 i) La efusión pleural debería recogerse en un recipiente de drenaje estéril torácico en la manera habitual para drenaje de una efusión pleural.  
ii) Se recogió ascitis en una bolsa de drenaje estéril mediante un drenaje peritoneal en la manera habitual para el drenaje de ascitis.

15 No es necesario añadir productos químicos a la bolsa/recipiente mientras que el fluido drena en esta.

La bolsa/recipiente debe recogerse bien cuando está llena o diariamente, lo que suceda primero.

20 En la cubierta de clase II, se transfirió 1 litro de fluido a tubos estériles de 20 x 50 ml utilizando pipetas estériles de 25 ml y se centrifugó a 400 g durante 5 minutos.

25 Los sobrenadantes se vertieron en 2 matraces de cultivo de tejido de 500 ml estériles, y se añadió azida de sodio al 0,01 % (1 µl de solución madre al 10 % a 1 ml de sobrenadante). Se añadió aprotinina (inhibidor de la proteasa) a 1 µ/ml (1 µ de 1 mg/ml de solución madre de aprotinina en PBS a 10 ml de sobrenadante). A continuación, se vertieron los sobrenadantes en tubos de 50 ml sin esterilizar y se almacenaron a -20 °C.

Lista de reactivos:

30 Solución madre de azida de sodio almacenada a TA,  
Aprotinina = Calbiochem 616370  
Solución madre de aprotinina almacenada en alícuotas de 50 µl a -20 °C  
PBS = solución salina tamponada con fosfato

35 **Inmunoensayo normalizado de autoanticuerpos**

La metodología de inmunoensayo general se ilustra en el presente documento utilizando antígenos marcadores tumorales recombinantes, pero se apreciará que se puede adaptar el mismo protocolo de ensayo para su uso con otros (auto) antígenos.

40 Se prepararon muestras de antígenos marcadores tumorales mediante expresión recombinante, siguiendo métodos análogos a los descritos en el documento WO 99/58978.

45 En resumen, los ADNc que codificaban los antígenos marcadores de interés se clonaron en el vector pET21 (Invitrogen) que se ha modificado para codificar una etiqueta de biotina y una etiqueta 6xhistidina para ayudar a la purificación de la proteína expresada. Los clones resultantes se hicieron crecer en una célula hospedadora bacteriana adecuada (en cuerpos de inclusión), las bacterias se lisaron y se desnaturalizaron y los antígenos expresados se recuperaron mediante columnas de afinidad de níquel quelado (Hi-trap, comercialmente disponibles de Amersham, siguiendo el protocolo del fabricante). Los antígenos expresados se renaturalizaron mediante diálisis en un tampón adecuado y se evaluó el rendimiento de la proteína expresada mediante SDS-PAGE, transferencia western y ELISA y se cuantificó antes del almacenamiento.

55 El control negativo VOL es un vector vacío (es decir ADNc no clonado) que incluye además las secuencias de la etiqueta de His y la etiqueta de biotina.

Los números de registro de GenBank de numerosos ADNc marcadores son los siguientes:

60 P53: B003596  
c-myc: V00568  
ECD6 (HER2) dominio extracelular: M11730  
NY-ESO: NM\_001327  
BRCA2: U43746  
BRCA1 delta 9-10: NM\_007302  
Anexina X1-A: NM\_145868  
65 PSA: NM\_001648  
CAGE: NM\_182699 XM\_291343

GBU4-5: NM\_001110822 XM\_001713629 XM\_001713630 XM\_001713631  
 Anexina 1: NM\_000700  
 Anexina 2: NM\_004039

- 5 1. Los antígenos y VOL (control negativo) se diluyeron a concentraciones adecuadas en tampón carbonato 0,1 M. Se dispensaron diluciones de antígeno a 50 µl/pocillo en las hileras de una placa de microvaloración Falcon de acuerdo con la disposición de la placa utilizando una pipeta electrónica multicanal. Se cubrieron y almacenaron las placas a 4 °C durante 48 h.
- 10 2. Se lavaron las placas una vez en PBS + tween 20 al 0,1 % utilizando un lavador de placas automatizado y a continuación se secaron golpeándolas sobre papel tisú.
- 15 3. Se bloquearon las placas con tampón de incubación de una concentración salina elevada (HSBT, PBS + NaCl 0,5 M + caseína al 0,1 % + Tween™ 20 al 0,1 %) a 200 µl/pocillo (almacén cubierto a 4 °C).
- 20 4. Las muestras de ensayo del fluido corporal del paciente y los materiales del calibrador se diluyeron según necesidad en HSBT a temperatura ambiente.
- 20 5. Se vaciaron las placas y se secaron golpeándolas sobre papel tisú. Cada muestra de ensayo diluida (o material calibrador) se dispuso a 50 µl/pocillo en todos los pocillos de la placa de microvaloración utilizando una pipeta multicanal electrónica. Se cubrieron las placas y se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación.
- 25 6. Etapa de lavado: Se lavaron las placas tres veces en PBS + tween 20 al 0,1 % utilizando un lavador de placas automatizado y a continuación se secaron golpeándolas sobre papel tisú.
- 30 7. IgG&M de conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante dirigida contra IgG humana (Jackson, 1/10.000 en HSBT) o IgG de conejo dirigida contra IgG humana (Dako, 1/5000 en HSBT), se dispuso a 50 µl/pocillo en todos los pocillos de la placa de microvaloración. La Ig de conejo conjugada con HRP dirigida contra Ig de ratón (1/1000 en HSBT) se usó para los ensayos empleando anticuerpos monoclonales de ratón. Las placas se incubaron a continuación a temperatura ambiente durante una hora con agitación.
- 35 8. Se lavaron las placas como en la etapa 6.
- 35 9. Se añadió sustrato TMB previamente preparado a 50 µl/pocillo y se incubó la placa sobre la poyata durante 1 min. Las placas se golpearon suavemente para mezclarse.
- 40 10. Se determinó la densidad óptica de los pocillos a 650 nM utilizando un protocolo normalizado de un lector de placas.

#### **Ejemplo 1 (comparativo): Anticuerpos monoclonales como calibradores**

- Los anticuerpos monoclonales se investigaron como potenciales materiales calibradores en ensayos con autoanticuerpos (no se muestran los datos). Aunque se pudieran producir respuestas de dilución reproducibles, estas no se podrían utilizar como curvas del calibrador. Se consideró que esto era un sistema de calibración ineficaz porque los anticuerpos monoclonales eran de origen murino y, por tanto, necesitaban un sistema indicador de anticuerpo secundario diferentes al utilizado para detectar autoanticuerpos humanos en el suero. Así, con este enfoque, se están utilizando realmente dos sistemas de medición diferentes y las variaciones interdía debido al sistema del anticuerpo secundario no se pueden detectar ni calibrar por el sistema monoclonal de ratón. Además, la respuesta monoclonal es tan específica que no puede imitar eficazmente la respuesta policlonal mostrada por los autoanticuerpos humanos. Esto puede explicar por qué no se usan anticuerpos monoclonales para como materiales del calibrador en enfermedades autoinmunes benignas tales como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide.
- 55 Como los anticuerpos monoclonales se han descartado como posibles materiales del calibrador, los inventores han preferido investigar los fluidos pleurales y de ascitis humanos como posibles fuentes de materiales del calibrador por los motivos detallados anteriormente.

#### **Ejemplo 2: Demostración de la especificidad de antígeno de los autoanticuerpos en fluidos humanos**

- 60 Los fluidos de los pacientes se cribaron en un ensayo de autoanticuerpos convencional a una dilución de 1 en 100 (en HSBT) para determinar los que contenían anticuerpos contra un antígeno dado (Tabla 1).
- 65 La Figura 1 a y b muestran ejemplos de la inhibición de la unión de los autoanticuerpos en dos fluidos pleurales diferentes frente a dos antígenos diferentes mediante preincubación de los mismos con dicho antígeno en solución. Así, los inventores han demostrado que los antígenos seleccionados miden autoanticuerpos que son específicos de

ese antígeno concreto asociado al tumor.

Como demostración adicional de la especificidad de los autoanticuerpos en fluidos pleurales para los antígenos asociados a tumores, se llevaron a cabo transferencias Western sobre los antígenos recombinantes utilizados como agentes de captura en el ensayo de autoanticuerpos. Estos se llevaron a cabo de acuerdo con las metodologías habituales descritos en la bibliografía y se sondearon con fluidos pleurales seleccionados como calibradores. Los resultados se muestran en la Figura 2, donde se demuestra la especificidad de cada fluido para un antígeno concreto por bandas intensas del tamaño correcto que corresponden al anticuerpo unido al antígeno, con poca o ninguna evidencia de unión a bandas de material contaminante. En la Figura 3, se utilizó suero para sondear transferencias Western similares y, en este caso, se pudo observar una fuerte unión a los contaminantes bacterianos que están presentes en todos los antígenos recombinantes. Los inventores han observado que 7/67 (90 %) de las muestras de suero analizadas contienen anticuerpos contra proteínas bacterianas; sin embargo, de los 54 fluidos pleurales cribados mediante transferencias Western, solamente 4 (7 %) mostró alguna evidencia de dicha unión.

A pesar del hecho de que pacientes con cáncer metastásico y, por tanto, supuestamente el cáncer ha estado presente durante algún tiempo, algunas muestras de fluido mostraron tener anticuerpos contra un número limitado de antígenos (Tabla 1).

Tabla 1: Cribado de fluidos pleurales en busca de autoanticuerpos dirigidos contra siete antígenos asociados a tumor diferentes. Los niveles de autoanticuerpos medidos se designaron de forma arbitraria como bajos, intermedios o altos.

	Número de fluidos en cada grupo del calibrador						
	P53	C-myc	ECD6	NYESO	BRCA2	PSA	Anexina XIa
bajo	61	53	62	59	61	21	26
Intermedio	1	9	1	1	2	5	3
Alto	3	3	2	5	2	5	2

En enfermedades autoinmunitarias benignas, los autoantígenos suelen estar mucho más limitados para cada trastorno en particular. A este respecto, los datos de los fluidos corporales en los pacientes de cáncer notificados por los inventores son diferentes. La presencia de diferentes autoanticuerpos en diferentes pacientes de cáncer convierte el desarrollo de un sistema de calibración global para una prueba múltiple de autoanticuerpos en un desafío mucho más complejo. Tras el cribado de estos fluidos, lo que tuvieron un resultado positivo frente a un antígeno se analizaron adicionalmente para su mejor uso como calibrador para el ensayo.

### Ejemplo 3: Antígeno y VOL titulado y fluidos titulados

La posibilidad de utilizar fluidos de pacientes como sistema de calibración se investigó inicialmente usando un sistema de titulación doble, donde las placas de ensayo se revistieron con titulaciones tanto de antígeno como de VOL (véase la Tabla 2a). Se dejó que los antígenos y VOL se adsorbieran en la placa durante un mínimo de 48 horas; transcurrido ese tiempo, la placa se lavó y se bloqueó durante 90 min con PBS que contenía caseína (0,1 % p/v), NaCl (0,5 M) y Tween 20 (0,1 % p/v). Durante la incubación con bloqueo, se prepararon tubos con un conjunto de titulaciones de fluidos calibradores (en HSBT) de pacientes. Tras la eliminación del tampón de bloqueo, se añadieron a una placa vacía como se muestra en la Tabla 2b y se incubaron durante 90 min. El resto del ensayo se realizó como se describe en materiales y métodos.

2a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
B	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
C	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
D	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
E	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
F	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
G	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
H	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
2b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Fluido del calibrador dilución 1:32						Fluido del calibrador dilución 1:2					
B	Fluido del calibrador dilución 1:64						Fluido del calibrador dilución 1:4					
C	Fluido del calibrador dilución 1:28						Fluido del calibrador dilución 1:8					
D	Fluido del calibrador dilución 1:28						Fluido del calibrador dilución 1:8					
E	Fluido del calibrador dilución 1:28						Fluido del calibrador dilución 1:8					
F	Fluido del calibrador dilución 1:28						Fluido del calibrador dilución 1:8					
G	Fluido del calibrador 0						Fluido del calibrador dilución 1:8					
H	Fluido del calibrador dilución 1:32						Fluido del calibrador dilución 1:2					

Tabla 2: Disposición de placas y ensayo de la calibración según el Método 2, donde el fluido y el antígeno se titularon para la totalidad de la placa. Donde A: antígeno y V: VOL (proteína del control negativo)

Al analizar los datos por este método, se encontraron gran cantidad de datos, no todos ellos aplicables para la función de un sistema de calibración. La Figura 4 es un ejemplo de un resultado generado por este formato de ensayo usando fluido pleural como material de calibración.

5 Mediante el uso de este método, se demostró que los fluidos de los pacientes podrían producir curvas de titulación eficaces para diferentes fluidos y/o titulaciones de antígenos. Este método produce una gran cantidad de datos, pero no parece optimizar el uso de dichos fluidos como calibradores de ensayo. Como se demuestra claramente en la Figura 5, la unión de los fluidos a concentraciones bajas de antígeno no es útil en la calibración debido a la baja señal y estrecho intervalo dinámico. Sin embargo, a una concentración estática elevada de antígeno tal como 160 y 10 50 nM aparece un intervalo dinámico amplio de valores de DO derivados de la unión del fluido del paciente al antígeno; dando lugar a un alcance para la calibración de una amplia gama de mediciones autoinmunitarias.

Este resultado condujo al calibrador Método 3, donde los inventores utilizaron esta observación de tal forma que las placas se revistieron con una concentración de antígeno estática y el fluido del paciente se tituló como calibrador.

15

#### **Ejemplo 4: Antígeno y VOL a concentraciones estáticas y fluidos titulados**

Los inventores descubrieron que este método producía los conjuntos de datos más útiles relativos a los ensayos con autoanticuerpos porque reduce la cantidad de datos a recoger hasta un nivel donde se pueden producir de forma reproducible, y analizarse eficazmente. Al reducir la cantidad de pocillos a analizar por análisis de calibración, también fue posible analizar en paralelo muestras de control sobre las mismas placas que las curvas del calibrador. También se ha demostrado que las mediciones de autoanticuerpos en suero a 160 y 50 nM proporcionó la información más útil, y que las curvas de calibración medidas frente a estas dos concentraciones de antígeno proporcionó el intervalo dinámico más grande para calibración. Por tanto, se decidió investigar este método en 25 diferentes escenarios.

Los experimentos iniciales estaban destinados a determinar la reproducibilidad de los fluidos del paciente frente a siete antígenos diferentes. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas revestidas con el antígeno a 160 nM y 50 nM. Se dejó que los antígenos se adsorbieran en la placa durante un mínimo de 48 horas, después de lo cual, la placa se lavó y se bloqueó durante 90 min con HSBT. Durante la incubación con bloqueo, se prepararon tubos con un conjunto de titulaciones de fluidos calibradores de múltiples pacientes. Tras la eliminación del tampón de bloqueo, se añadieron a una placa vacía y se incubaron durante 90 min. El resto del ensayo se realizó como se describe en 30 materiales y métodos.

En cada placa, el fluido del calibrador se aplicó por duplicado, en un intervalo de dilución descendente a partir de 1:2. Este ensayo se realizó en 10 ocasiones para determinar la reproducibilidad de la señal. Los resultados de la Figura 5 muestran gráficos representativos de la forma media de las curvas producidas a partir de los 10 análisis. La variación interensayo se representa en forma de barras de error, que se muestran en forma de desviaciones estándar asociadas con el promedio de los 10 análisis. El coeficiente de variación interensayo (CV) para la reacción 35 con cada antígeno se muestra en la Tabla 3.

40

Tabla 3: CV interensayo (%) para cada dilución de fluido de drenaje que reacciona con una gama de antígenos asociados a tumores. Los datos se calcularon a partir de 10 análisis.

CV de datos de DO brutos							
	C-myc	P53	PSA	Anexina	BRCA <sub>2</sub>	ECD6	NYESO
dilución 1	11	9	8	6	13	13	7
dilución 2	9	11	10	6	10	21	8
dilución 3	11	14	12	8	9	20	14
dilución 4	14	17	16	11	11	26	18
dilución 5	15	13	17	17	13	26	21
dilución 6	17	12	19	18	14	25	25
dilución 7	16	10	17	21	17	20	20
dilución 8	17	10	12	19	15	17	17

45

El desarrollo adicional de los experimentos anteriores condujo al siguiente protocolo de calibración. Sin embargo, debe indicarse que este método se proporciona como ejemplo, pero no es el único método por el cual los fluidos corporales como elusiones de ascitis y pleurales se podrían utilizar para producir un sistema de calibración. El método descrito permite el uso del fluido de un paciente como calibrador que está diluido en serie descendente en una placa que contiene una concentración estática de antígeno (por ejemplo, cualquiera de antígeno 50 nM o 50 160 nM y VOL). También permite la incorporación de suero de control en el formato de ensayo. Este método representa gráficamente a continuación gráficas que representan el log de la dilución del fluido frente a log DO para producir una curva logística de 4 parámetros. Esta curva se usó a continuación para extrapolar el valor de la dilución equivalente del fluido del calibrador a partir de los valores del logaritmo de la densidad óptica del suero del control.

55

**Ejemplo 5: optimización del método de calibración:**

Sigue un ejemplo de un plan de ensayo para calibrar los ensayos de autoanticuerpos marcadores antitumorales.

5 Placas de microvaloración de 96 pocillos se recubrieron con antígeno a los dos niveles de 160 nM y 50 nM (Anexina XIa, PSA, p53, ECD6, BRCA2, NYESO, y c-myc) y proteína de control negativo VOL, como se muestra en la Tabla 4. Se dejó que los antígenos se adsorbieran en la placa durante un mínimo de 48 horas a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, la placa se lavó y se bloqueó durante 90 min con HSBT. Durante la incubación con bloqueo, se prepararon diluciones del calibrador y el suero de control (diluido 1:100 en HSBT).

10

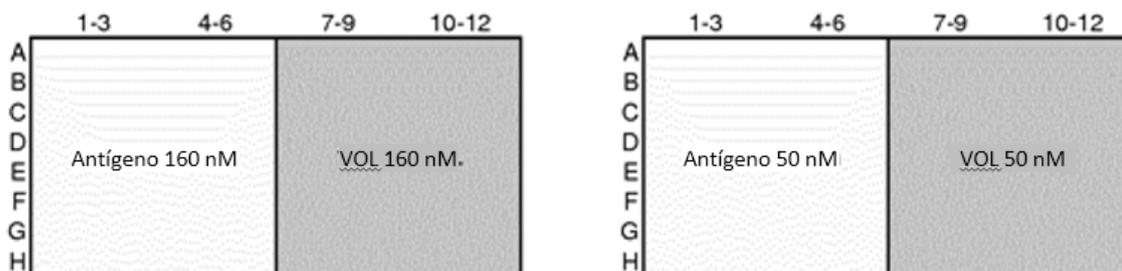


Tabla 4: El método de recubrimiento para las placas de fluido del calibrador

15 Tras la eliminación del tampón de bloqueo, se añadieron el fluido del calibrador y el suero de control a una placa vacía como se muestra en la Tabla 5 y se incubaron durante 90 min. El resto del ensayo se realizó como se describe en materiales y métodos. Se trazaron las curvas de titulación de antígeno usando valores promedios de triplicados de cada calibrador. El logaritmo de la dilución del fluido calibrador y el logaritmo del promedio de la densidad óptica se representaron en un gráfico que se utilizó para representar gráficamente una curva logística de 4 parámetros para ajustar los datos. Esta curva se usó a continuación para extrapolar el valor de la dilución equivalente del fluido del calibrador a partir de los valores del logaritmo de la densidad óptica del suero del control.

20

Para cada día, en que se realizaron los ensayos con autoanticuerpos, también se analizó una placa del calibrador. Usando siete antígenos a concentración de 50 nM y 160 nM, se necesitaron un total de 14 placas de calibración.

	B3255/ B3258			B3255/ C3/C4		
	1-2	3-4	Suero 5-6	7-8	9-10	Suero 11-12
A	1:2	1:2	suero 1	1:2	1:2	suero 1
B	1:4	1:4	suero 2	1:4	1:4	suero 2
C	1:8	1:8	suero 3	1:8	1:8	suero 3
D	1:16	1:16	suero 4	1:16	1:16	suero 4
E	1:32	1:32	suero 5	1:32	1:32	suero 5
F	1:64	1:64	suero 6	1:64	1:64	suero 6
G	1:128	1:128	suero 7	1:128	1:128	suero 7
H	1:256	1:256	suero 8	1:256	1:256	suero 8

25

Tabla 5: Ejemplos de la configuración del calibrador y del suero de control; el punto de inicio de la dilución se determinó empíricamente para proporcionar el valor más adecuado para cada fluido del calibrador contra cada antígeno

30 Estos experimentos se llevaron a cabo inicialmente usando dos fluidos del calibrador diferentes, consistiendo cada uno de ellos en una combinación de dos fluidos tomados del mismo paciente, pero en momentos diferentes y 8 sueros de control. Los datos de los cinco lotes de análisis se muestran en las Figuras 6-12.

35 El siguiente experimento se centró en la selección de un fluido del calibrador para cada antígeno. La principal característica que define un buen fluido de calibrador es un buen intervalo dinámico. Si se utiliza una representación gráfica logarítmica, entonces el resto de características útiles son:

- Linealidad del gráfico logarítmico.
- Adecuabilidad de la pendiente del gráfico logarítmico.
- Reproducibilidad de la pendiente del gráfico logarítmico.

40

**Ejemplo 6: Efecto de la calibración sobre la variabilidad interdía en las muestras del control**

Las muestras del control se analizaron en la misma placa que las curvas del calibrador para investigar si el uso de la

curva de calibración pleural para extrapolar respecto al logaritmo de un valor de dilución podría corregir la variación interdía observada en las muestras del control. En las Figuras 13-19 se muestran los datos que muestran la variación en los valores de DO brutos con los valores extrapolados desde las curvas del calibrador. En estas figuras se observa que, para la mayoría de los antígenos, la extrapolación desde el gráfico logarítmico de la línea de calibración mejora la reproducibilidad interdía de la medición de los niveles de autoanticuerpos en suero.

**Ejemplo 7: Comparación del suero con fluidos pleurales como materiales del calibrador**

Los ensayos para medir autoanticuerpos en enfermedades autoinmunitarias tienen suero o plasma como materiales calibradores. Los fluidos de drenaje tienen varias ventajas sobre los hemoproductos. Están disponibles en volúmenes muy grandes, son estables en almacenamiento a bajas temperaturas durante periodos prolongados de tiempo y, por tanto, se pueden utilizar para proporcionar materiales del calibrador reproducibles para muchos ensayos. La recogida de un volumen importante en un único punto temporal tiene importantes ventajas potenciales sobre la recogida secuencial múltiple de volúmenes mucho más pequeños de suero. En primer lugar, la enfermedad metastásica es una dolencia incurable, y prácticamente todos los pacientes fallecen debido a su enfermedad, por lo que la extracción de sangre secuencial es muy difícil y prácticamente imposible. En segundo lugar, el título de autoanticuerpos podría cambiar con el tiempo, de forma que las muestras de sangre secuenciales podrían no ser comparables. En tercer lugar, con la deriva antigénica, la respuesta inmunitaria humoral podría cambiar a otra de antígeno(s) inmunodominante(s). Incluso aunque las muestras de sangre se extraigan de pacientes de cáncer de mama primario (es decir, en una etapa temprana), si una paciente se cura por su tratamiento, la respuesta de autoanticuerpos puede disminuir y no detectarse en las muestras secuenciales. Todo lo anterior significa que se cree que el uso de fluidos corporales como se describe en esta solicitud es novedosa e inventiva. Para valorar otras ventajas del uso de fluidos, se llevó a cabo una comparación directa con muestras de suero emparejadas. Las series de dilución de suero y fluidos de drenaje tomados del mismo paciente se analizaron para determinar su capacidad de unión a una gama de antígenos asociados a tumores. Los resultados se muestran en las Figuras 20 y 21.

Puede observarse en la Figura 20 que el modelo de reactividad del fluido y el suero fue similar para una gama de antígenos. Sin embargo, la Figura 21 muestra que para los antígenos que muestran posible reactividad con los autoanticuerpos (es decir, ECD6, PSA y Anexina XI-a), la señal del suero es generalmente inferior a la señal del fluido pleural. Además, el modelo de reactividad difiere para los autoanticuerpos del suero que tienen un nivel de reactividad mucho menor con PSA comparado con ECD6. Esto sugeriría que, aunque las muestras C7 y 11828 proceden del mismo paciente, el fluido de drenaje pleural C7 proporcionaría un calibrador mejor para los autoanticuerpos PSA debido a su mayor intervalo dinámico. Este hallazgo concreto fue muy inesperado.

**Ejemplo 8: Uso de fluidos pleurales para calibrar ensayos en el escenario del laboratorio clínico**

Para validar el uso de fluidos pleurales en las condiciones existentes en un laboratorio de alto rendimiento que realiza ensayos de autoanticuerpos, se realizaron los siguientes experimentos: *Calibración:*

Tras la primera identificación de fluidos del calibrador con especificidad para cada antígeno (véase el Ejemplo 2) y optimizar el intervalo de dilución para ampliar el intervalo dinámico del ensayo (véase el Ejemplo 4), las placas del calibrador se revistieron con antígeno como en la Tabla 6:

Tabla 6: Formato de placas recubiertas de antígeno a usar en la calibración.

	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	Ejemplo de serie de dilución del fluido:	
A												1 en 8	
B												1 en 16	
C	Antígeno a			VOL a			Antígeno a			VOL a			1 en 32
D	160 nM			160 nM			50 nM			50 nM			1 en 64
E												1 en 128	
F												1 en 256	
G												1 en 512	
H												1 en 1024	

Los fluidos del calibrador específicos de cada uno de los antígenos del panel mostrado en la Figura 3 se diluyeron en serie en el intervalo adecuado y se añadieron a la placa anterior como se muestra en el ejemplo. Estas placas se analizaron de acuerdo con el protocolo normalizado.

Muestras de suero:

Las placas se recubrieron con antígeno como en la Tabla 7 y se utilizaron para someter a ensayo varias muestras diferentes de suero que anteriormente habían demostrado tener niveles de autoanticuerpos específicos de antígenos. Los ensayos se realizaron de acuerdo con el protocolo normalizado.

Tabla 7: Formato de placas utilizado para someter a ensayo muestras para determinar el comportamiento del sistema de calibración en las condiciones de un laboratorio clínico

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0 nM	1,6 nM	5 nM	16 nM	50 nM	160 nM	0 nM	1,6 nM	5 nM	16 nM	50 nM	160 nM
A	GBU4-5						p53					
B	VOL						c-myc					
C	Anexina I						CAGE					
D	Anexina II						NY-ESO-1					
E	p53						GBU4-5					
F	c-myc						VOL					
G	CAGE						Anexina I					
H	NY-ESO-1						Anexina II					

5 Los ensayos anteriormente descritos se realizaron dos veces al día (mañana y tarde) durante 6 días en un intervalo de tiempo de 2 semanas (análisis 1 a 12).

Análisis de variabilidad:

10 Para someter a ensayo el sistema de calibración, se tuvo que introducir variabilidad en el resultado del ensayo. Esto se consiguió reduciendo la concentración de anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante para producir una señal inferior en todas las placas. Esto se llevó a cabo dos veces en el séptimo día de ensayo (análisis 13 y 14).

15 Calibración de las muestras de suero:

Se trazaron representaciones gráficas logísticas de cuatro parámetros (4pl) para cada conjunto de datos del calibrador. Para cada representación gráfica, la asíntota inferior se ajustó a cero y la pendiente se ajustó a 1. La asíntota superior se limitó a un máximo de 2. Los datos de cada curva individual se resolvieron para minimizar la suma cuadrática de restos. Esto proporcionó valores para los cuatro parámetros (asíntota superior, asíntota inferior, pendiente y CE<sub>50</sub>), que se usaron a continuación en una fórmula para leer las muestras de suero a partir de las curvas del calibrador. En la Figura 22 se muestra la representación gráfica 4pl de la densidad óptica frente al logaritmo de la dilución de fluido del calibrador para los análisis 1 a 12 (como línea continua gris) junto con las barras de error que representan la desviación estándar del conjunto de datos. La segunda curva de cada Figura (línea discontinua) es el gráfico 4pl promedio de los análisis de variabilidad (análisis 13 y 14) con las desviaciones estándar como barras de error.

Las ecuaciones que describen las representaciones gráficas de la Figura 22 se utilizaron para corregir cada muestra de suero de acuerdo con su correspondiente calibrador. Esto dio como resultado un valor expresado en forma de una unidad arbitraria correspondiente al logaritmo de la dilución del calibrador (valores UR). El efecto que esto tuvo sobre la variación entre análisis se muestra en la Figura 23 para varias muestras de suero diferentes donde los valores sin calibrar se muestran como triángulos abiertos y los valores corregidos según la curva de calibración para dicho análisis se muestran como círculos sólidos. Las líneas discontinuas representan el promedio de los valores calibrados, más o menos 3 desviaciones estándar. Se resalta que la variabilidad introducida en los análisis 13 y 14 se redujo significativamente debido a la calibración.

**Ejemplo 9: Almacenamiento de series del calibrador congeladas**

Como la dilución de titulaciones en serie es laboriosa y propensa a errores de reproducibilidad, los inventores investigaron las diferencias entre un conjunto de calibradores 'congelados'; donde se prepararon diluciones madre de las diluciones del fluido pleural del calibrador, se distribuyeron en alícuotas, y se congelaron a - 20°C; y las preparadas recientemente ese mismo día. Los resultados de este estudio se pueden observar en las Figuras 24-30. Se puede observar que hubo muy pocas diferencias entre las series del calibrador que se habían preparado nuevas cada día y las que se habían preparados en cantidades importantes y congeladas en alícuotas. Esto sugeriría que, cuando se utilizan como materiales del calibrador, los fluidos del paciente diluidos son estables en almacenamiento a baja temperatura (-20°C) y se pueden almacenar durante periodos prolongados de tiempo sin pérdida de actividad. Este es, por tanto, un método válido para reducir la variación entre análisis.

**Ejemplo 10: Calibración usando fluidos derivados de pacientes con cánceres que no son cáncer de mama**

Algunos antígenos asociados a tumores y los autoanticuerpos que suscitan no son específicos del tipo de tumor. Por tanto, es posible que fluidos derivados de pacientes con cáncer de pulmón, por ejemplo, se puedan tratar para calibrar ensayos de autoanticuerpos para el diagnóstico temprano del cáncer de mama, y viceversa. Para probar esta teoría, los fluidos pleurales extraídos de pacientes con cáncer de colon, ovario, pulmón, hígado y pancreático se

cribaron contra un panel de antígenos asociados a tumores. Tras establecer el valor positivo, se prepararon curvas de calibración por dilución, y se sometieron a ensayo contra los antígenos. El experimento se repitió 5 veces en días diferentes para evaluar la reproducibilidad. En la Figura 31 se puede observar que el autoanticuerpo que se une a una gama de diferentes antígenos asociados a tumores se pueden detectar en fluidos procedentes de pacientes con

5 cáncer de colon (a y e), cáncer de ovario (b), cáncer de pulmón (c), cáncer de hígado (d y f) y cáncer pancreático (g). Estas respuestas parecen ser reproducibles y escalables, a medida que el fluido se diluye, indicando que tienen el potencial de utilizarse como materiales del calibrador en ensayos de autoanticuerpos para el diagnóstico temprano de cánceres de mama y otros cánceres.

#### 10 **Ejemplo 11: Uso de fluidos humanos para la cuantificación de la cantidad de proteína en superficies sólidas**

La adsorción de proteínas en superficies de plástico tales como los pocillos de una placa de microtitulación no está claramente definida y controlada y puede depender de factores tales como la irregularidad de la superficie y las cargas de la proteína y el plástico. Por tanto, sería útil poder cuantificar cuánta proteína se ha adsorbido y poder

15 relacionar este valor con otras proteínas y otras superficies. Los ensayos de proteínas colorimétricos son demasiado insensibles para este tipo de mediciones. Se han descrito metodologías de isotermas de adsorción (Kelso et al) pero estas se basan en la disponibilidad de una molécula trazadora marcada. Los anticuerpos contra etiquetas de proteínas (tales como la etiqueta His) también se pueden usar, pero normalmente tienen origen murino y por tanto se basan en un sistema indicador diferente al utilizado en la medición de autoanticuerpos humanos.

20 Durante el cribado de fluidos humanos contra una gama de antígenos asociados a tumores, se observó que dos de los fluidos se unían a todas las proteínas, incluyendo el control negativo, VOL (Figura 32). VOL es un péptido recombinante clonado y expresado exactamente de la misma forma que los antígenos, pero que simplemente consiste en una secuencia de una etiqueta de biotina y una etiqueta his. Por tanto, los anticuerpos humanos de

25 dichos fluidos se deber unir a una o ambas de dichas etiquetas. Como las etiquetas también están presentes en todos los antígenos recombinantes asociados a tumores, el fluido podría utilizarse para cuantificar la cantidad de proteína asociada a los pocillos de la placa. La Tabla 6 muestra la relación de la señal a 50 nM a la señal a 160 nM para VOL para cada concentración. Puede observarse que la relación de la señal de unión a VOL a 50 nM y 160 nM es relativamente constante para todas las diluciones de fluido pleural. Esto sugeriría que la señal medida está

30 relacionada con la cantidad de proteína en la placa y, por tanto, el sistema se puede utilizar para cuantificar niveles de proteína.

Tabla 8: Medición del autoanticuerpo que se une a VOL del fluido de drenaje 16. Relación entre la señal a 50 nM y la señal a 160 nM para cada VOL a cada dilución de fluido.

Dilución de fluido	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Análisis 4	Análisis 5
1 en 8	0,65	0,58	0,53	0,76	0,62
1 en 16	0,54	0,52	0,42	0,87	0,92
1 en 32	0,51	0,5	0,41	0,82	0,71
1 en 64	0,54	0,58	0,51	0,84	0,72
1 en 128	0,69	0,64	0,53	1,03	0,76

#### 40 **Ejemplo 12: Detección y calibración de la unión no específica**

La unión no específica es un problema inherente de cualquier inmunoensayo serológico debido a las elevadas concentraciones de inmunoglobulinas presentes en el suero, que tienen a unirse de forma no específica al plástico de la placa o al agente de recubrimiento. Las señales de unión no específica varían de una muestra de suero a otra, pero pueden ser tan intensas que enmascaren la reacción específica del analito.

40 La unión no específica es un problema inherente de cualquier inmunoensayo serológico debido a las elevadas concentraciones de inmunoglobulinas presentes en el suero, que tienen a unirse de forma no específica al plástico de la placa o al agente de recubrimiento. Las señales de unión no específica varían de una muestra de suero a otra, pero pueden ser tan intensas que enmascaren la reacción específica del analito.

45 En la sección anterior se identificaron fluidos que se unían a VOL. La reacción de los anticuerpos séricos no es específica porque no se dirige contra ningún antígeno concreto. Por tanto, estos fluidos pleurales pueden utilizarse para detectar y corregir la unión no específica.

#### 50 **Ejemplo 13: Uso de fluidos de ascitis como material del calibrador**

Además de los fluidos pleurales, los fluidos de ascitis son eficaces como sistema de calibración análogo al utilizado en los ejemplos anteriores. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas revestidas con el antígeno a 160 nM y 50 nM. Se dejó que los antígenos se adsorbieran en la placa durante un mínimo de 48 horas, después de lo cual, la placa se lavó y se bloqueó durante 90 min con HSBT. Durante la incubación con bloqueo, se prepararon tubos con un conjunto de titulaciones de fluidos calibradores de ascitis de múltiples pacientes. Tras la eliminación del tampón de

55 bloqueo, se añadieron a una placa vacía y se incubaron durante 90 min. El resto del ensayo se realizó como se describe en Materiales y métodos.

En cada placa, el fluido de ascitis se aplicó por duplicado, en un intervalo de dilución descendente a partir de 1:2. Este ensayo se realizó en 4 ocasiones para determinar la reproducibilidad de la señal. Los resultados de las Figuras

33-35 muestran gráficos representativos de la forma media de las curvas corregidas para VOL producidas a partir de los 4 análisis. La variación interensayo se representa en forma de barras de error, que se muestran en forma de desviaciones estándar asociadas con el promedio de los 4 análisis.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un material calibrador que comprende fluido corporal de mamífero para calibrar un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos, donde dicho material del calibrador comprende un fluido, exudado o trasudado de drenaje.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el material del calibrador
  - a) comprende fluido corporal humano, o
  - b) comprende fluido corporal extraído de una cavidad o espacio corporal donde está o estaba presente un tumor o con la que está o estaba asociado un tumor.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 donde el material de calibración
  - a) comprende fluido pleural recogido de uno o más sujetos con cáncer, o
  - b) fluido de ascitis recogido de uno o más sujetos con cáncer.
- 20 4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el inmunoensayo es para
  - a) detección de autoanticuerpos del cáncer, o
  - b) para la detección de autoanticuerpos de un cambio neoplásico temprano.
- 25 5. Un método para calibrar un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos que comprende:
  - (a) poner en contacto cada una de una pluralidad de diluciones diferentes de un material de calibración que comprende un fluido corporal humano con un antígeno específico de un autoanticuerpo, donde dicho fluido corporal de mamífero es conocido por contener autoanticuerpos inmunológicamente específicos para el antígeno y donde dicho material del calibrador comprende un fluido, exudado o trasudado de drenaje;
  - 30 (b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho antígeno y el autoanticuerpo presente en el material de calibración; y
  - (c) representar gráficamente o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la dilución del material de calibración para cada dilución del material de calibración utilizado en la etapa (a), calibrando de esta forma un inmunoensayo utilizando dicho antígeno para la detección de dicho autoanticuerpo.
- 35 6. El método de la reivindicación 5 donde el material de calibración
  - a) comprende fluido corporal humano,
  - b) comprende fluido corporal recogido de uno o más sujetos con cáncer, o
  - 40 c) comprende fluido corporal extraído de una cavidad o espacio corporal donde está o estaba presente un tumor o con la que está o estaba asociado un tumor.
- 45 7. El método de la reivindicación 6 donde el material de calibración comprende
  - a) fluido pleural recogido de uno o más sujetos con cáncer, o
  - b) fluido de ascitis recogido de uno o más sujetos con cáncer.
- 50 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde el material de calibración comprende fluido corporal humano que es conocido por contener autoanticuerpos naturales humanos que son inmunológicamente específicos de una proteína marcadora tumoral.
- 55 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 donde el antígeno de la parte (a) se utiliza a una concentración
  - a) mayor de 20 nM,
  - b) en el intervalo de 20 nM a 180 nM, o
  - c) en el intervalo de 50 nM a 160 nM.
- 60 10. Un kit de inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos, comprendiendo dicho kit un conjunto de patrones de calibración para su uso en la calibración de un inmunoensayo para la detección de autoanticuerpos, donde cada patrón de calibración de dicho conjunto comprende una dilución diferente de un fluido corporal de mamífero, siendo dicho fluido corporal de mamífero conocido por contener autoanticuerpos humanos y donde el fluido corporal de mamífero es un fluido, exudado o trasudado de drenaje, y un reactivo de inmunoensayo que comprende un antígeno inmunológicamente específico de dichos autoanticuerpos.
- 65 11. Un kit de inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 10 donde dicho fluido corporal de mamífero

- a) es un fluido corporal humano,
- b) es un fluido recogido de uno o más sujetos con cáncer, o
- c) es fluido corporal extraído de una cavidad o espacio corporal donde está o estaba presente un tumor o con la que está o estaba asociado un tumor.

- 5
12. Un kit de inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 11 donde el fluido corporal de mamífero comprende
- a) fluido pleural recogido de uno o más sujetos con cáncer, o
  - b) fluido de ascitis recogido de uno o más sujetos con cáncer.
- 10
13. Un kit de inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 donde el fluido corporal de mamífero es fluido corporal humano que es conocido por contener autoanticuerpos naturales humanos que son inmunológicamente específicos de una proteína marcadora tumoral.
- 15
14. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde el inmunoensayo es para la detección de autoanticuerpos de una enfermedad autoinmunitaria benigna.

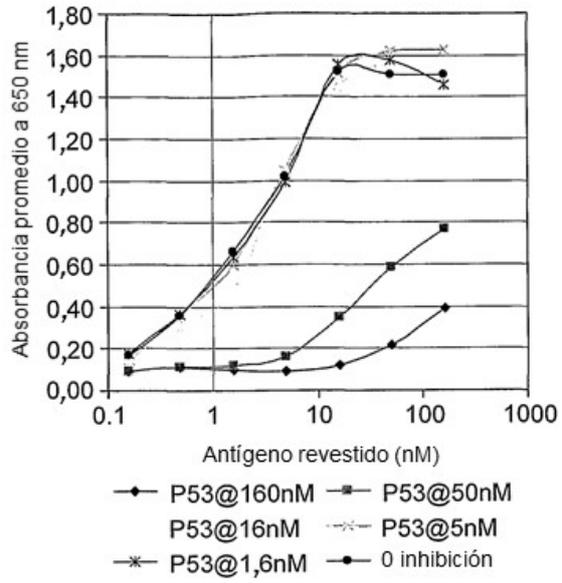


FIG. 1a

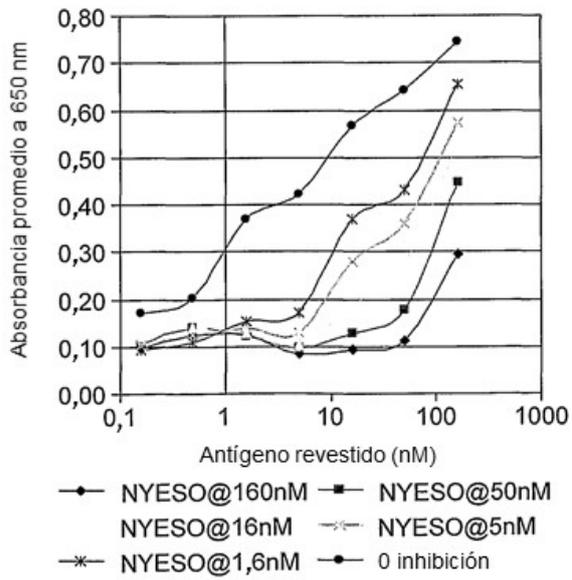


FIG. 1b

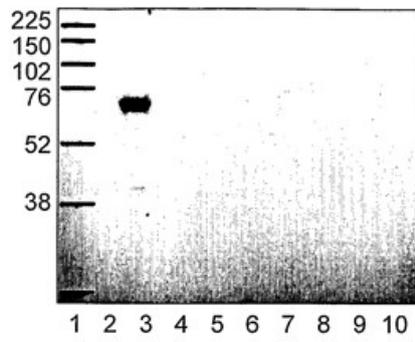


FIG. 2a

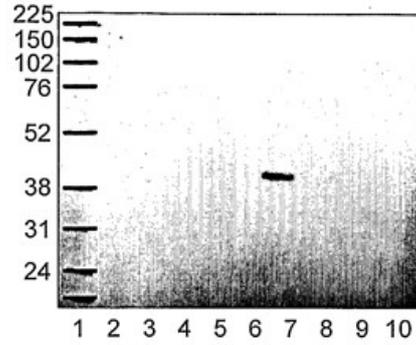


FIG. 2b

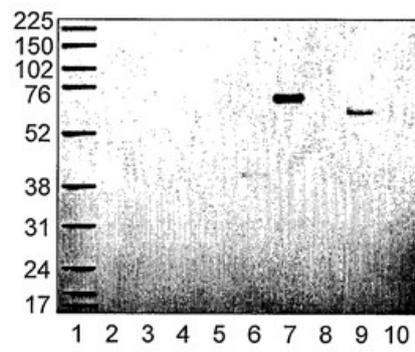


FIG. 2c

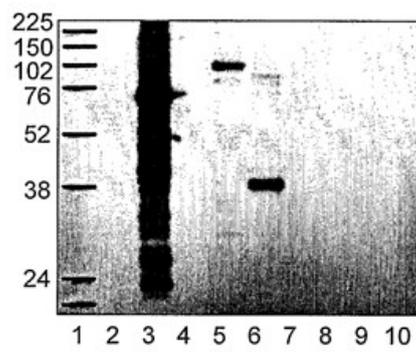


FIG. 2d

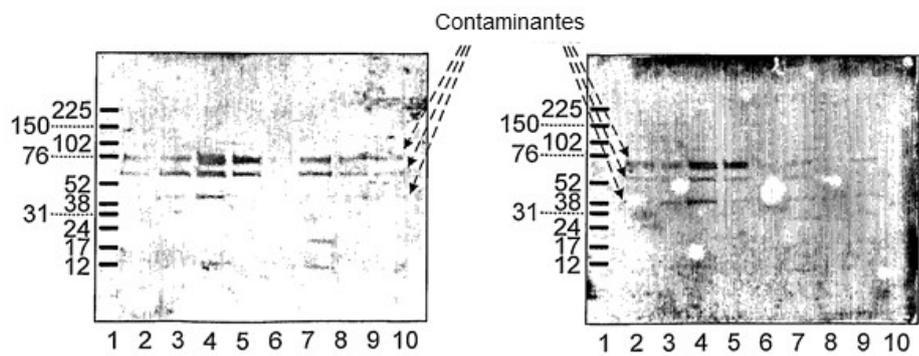


FIG. 3

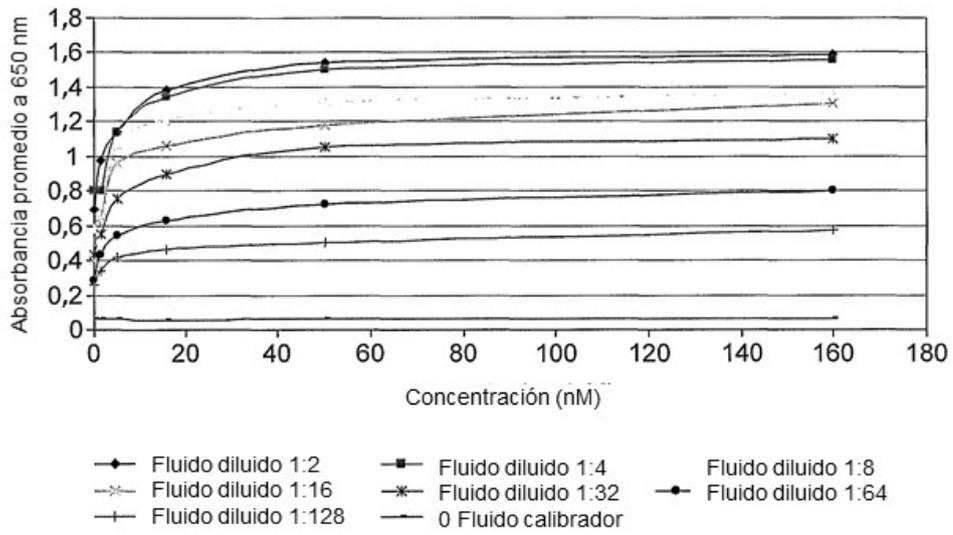


FIG. 4

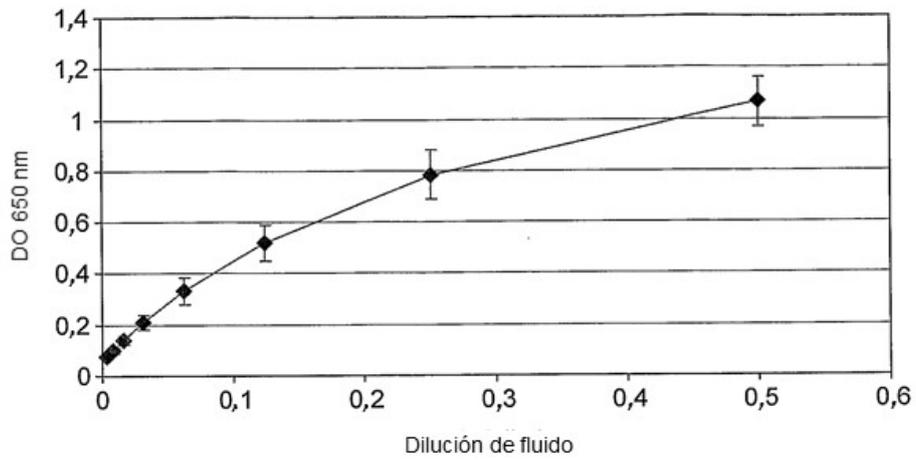


FIG. 5a

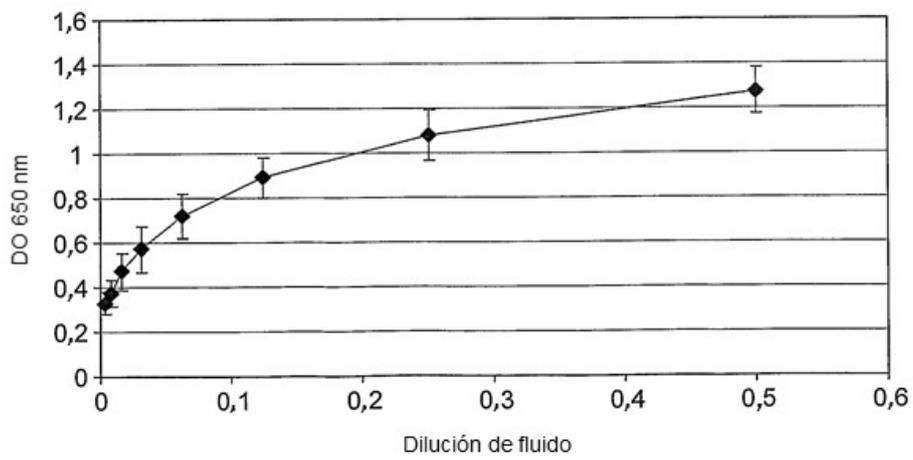


FIG. 5b

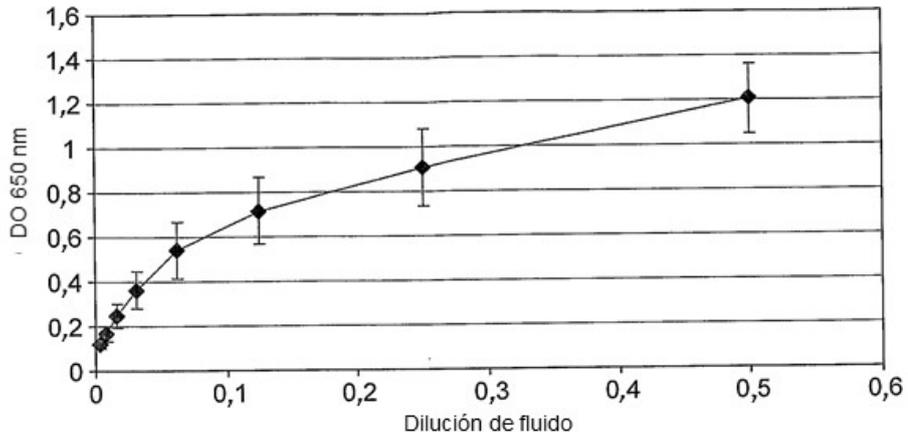


FIG. 5c

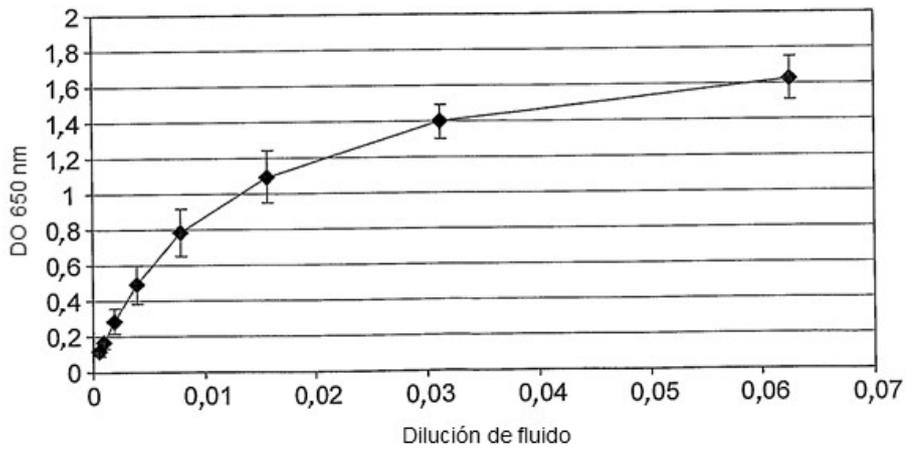


FIG. 5d

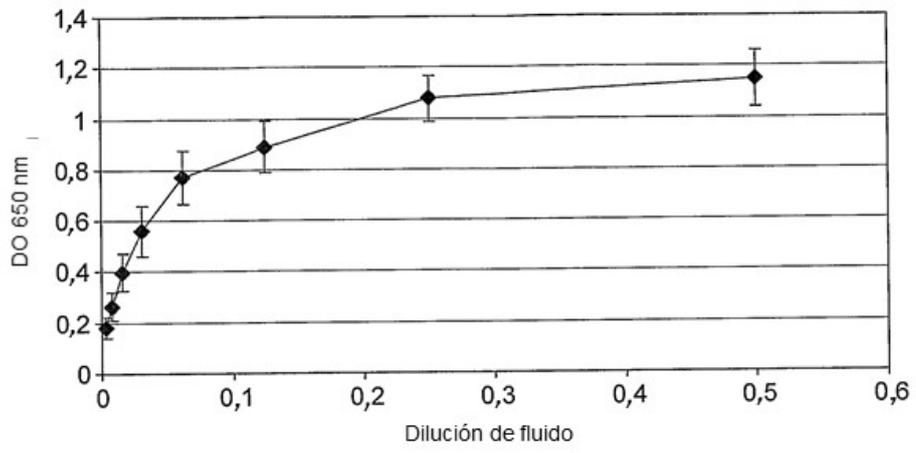


FIG. 5e

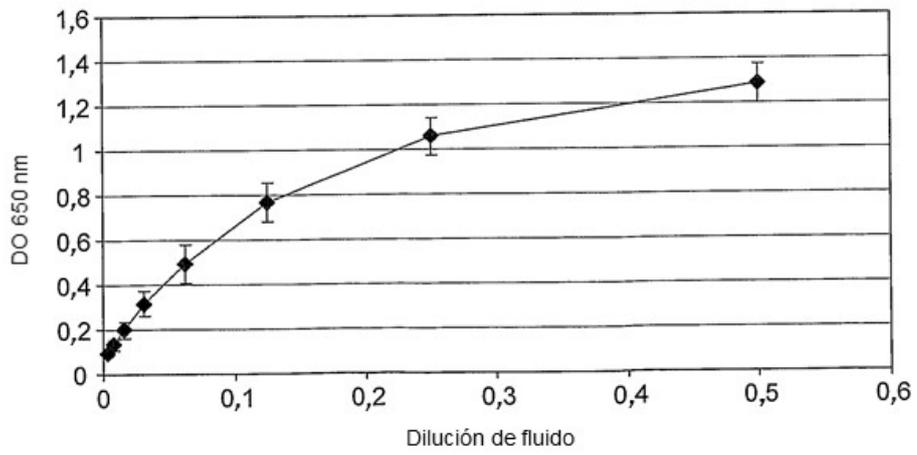


FIG. 5f

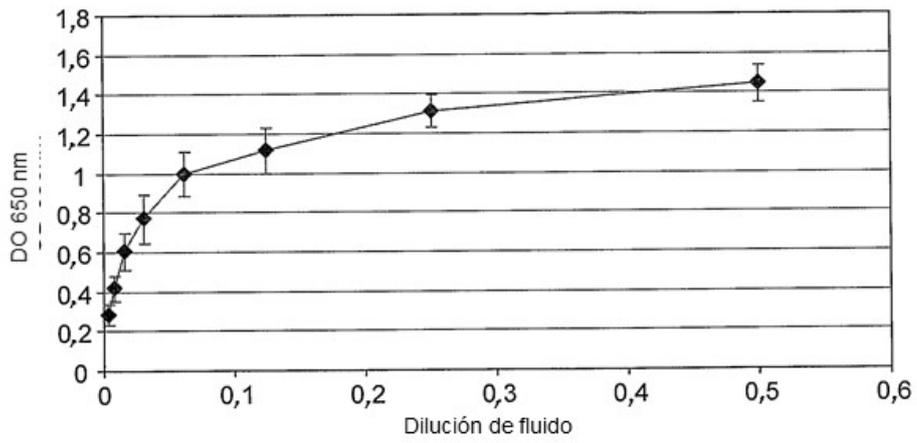


FIG. 5g

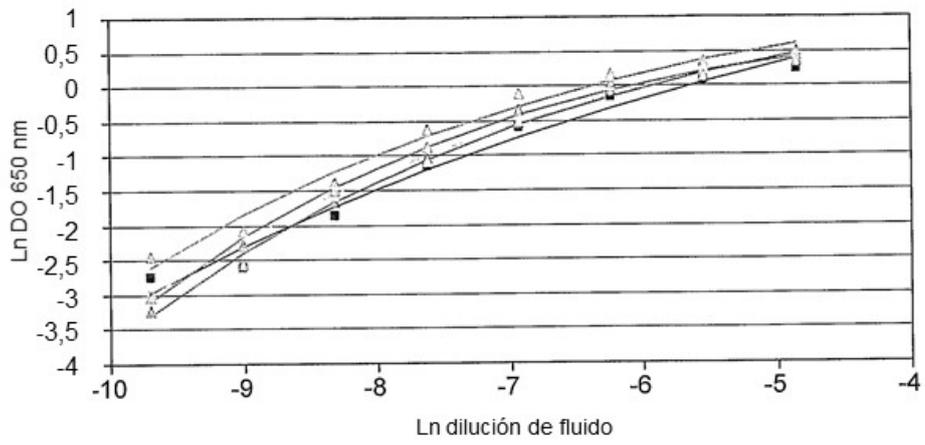


FIG. 6a

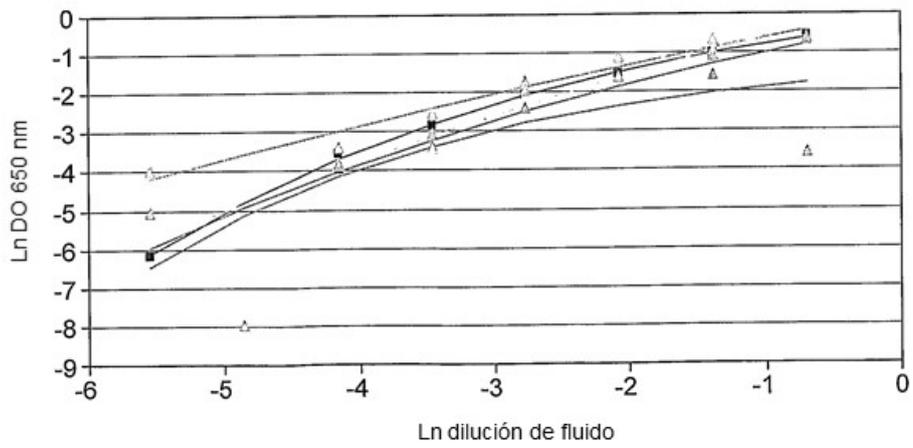


FIG. 6b

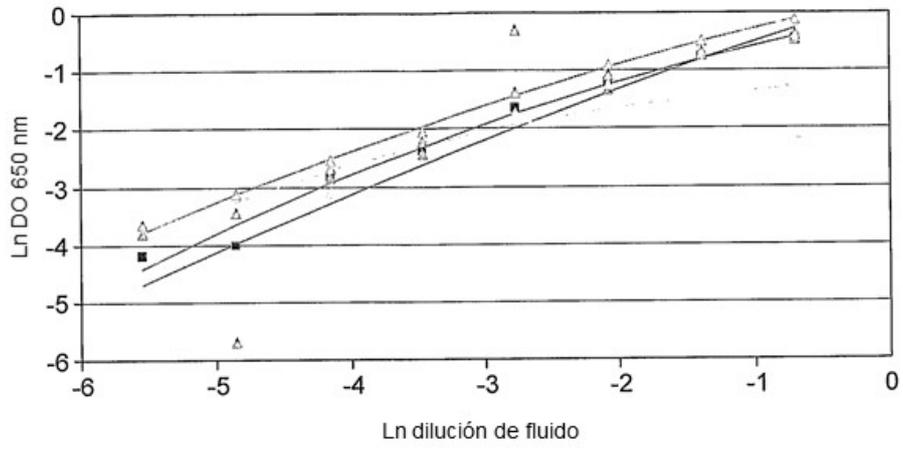


FIG. 7a

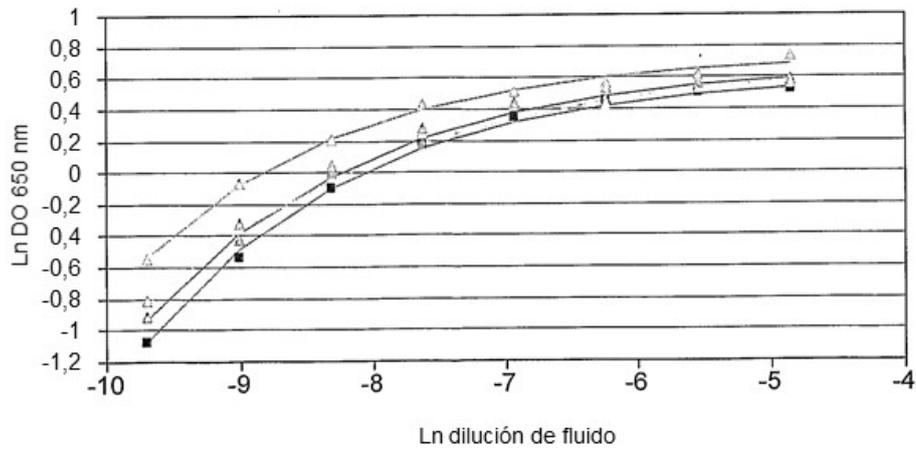


FIG. 7b

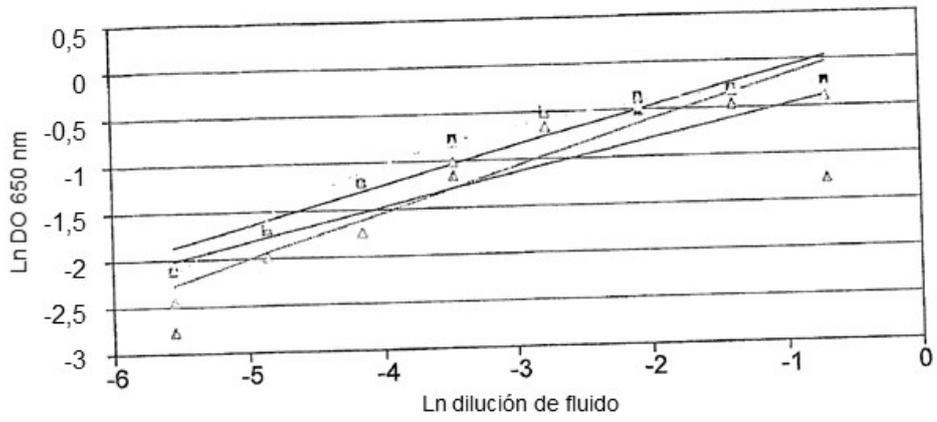


FIG. 8a

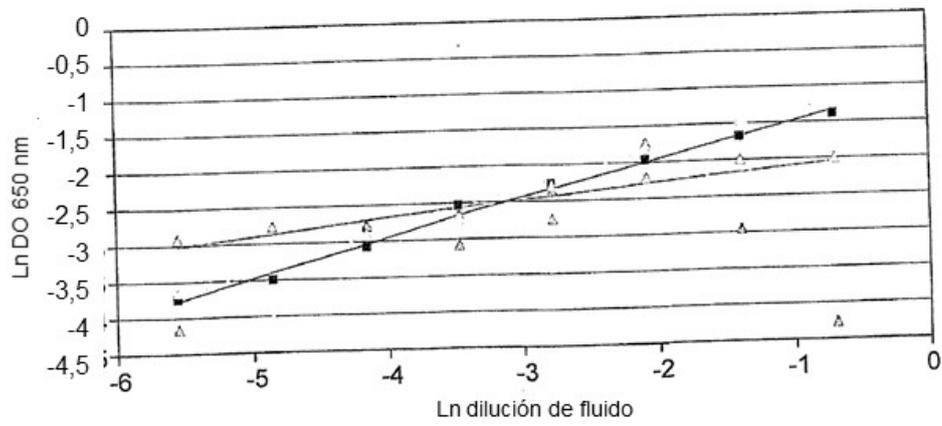


FIG. 8b

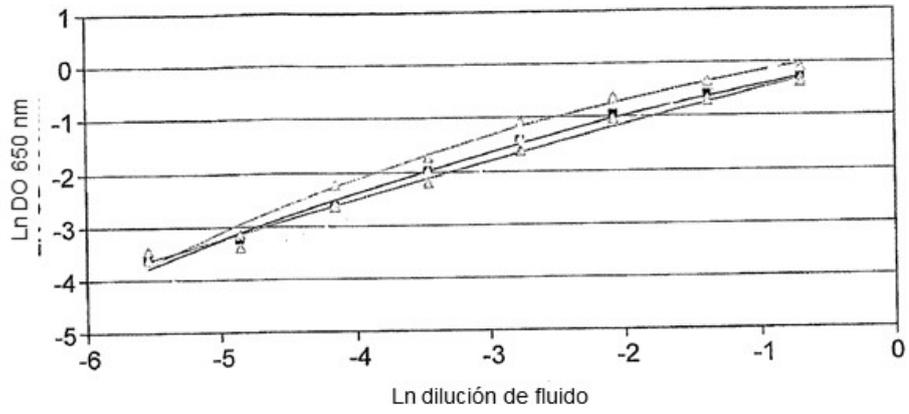


FIG. 9a

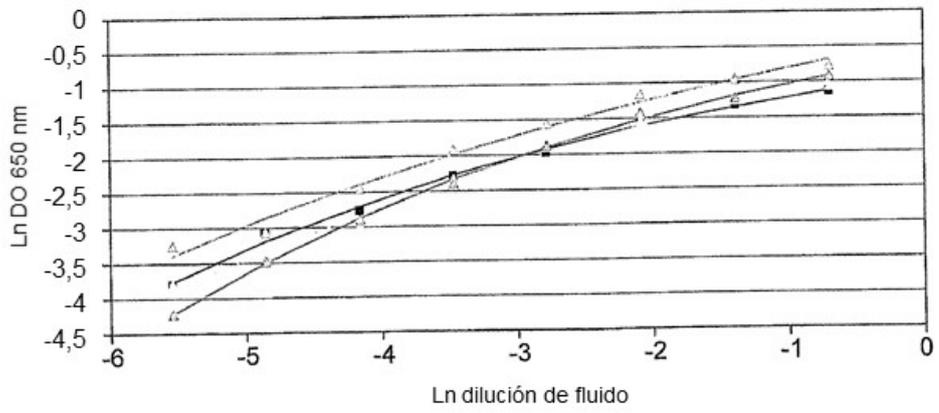


FIG. 9b

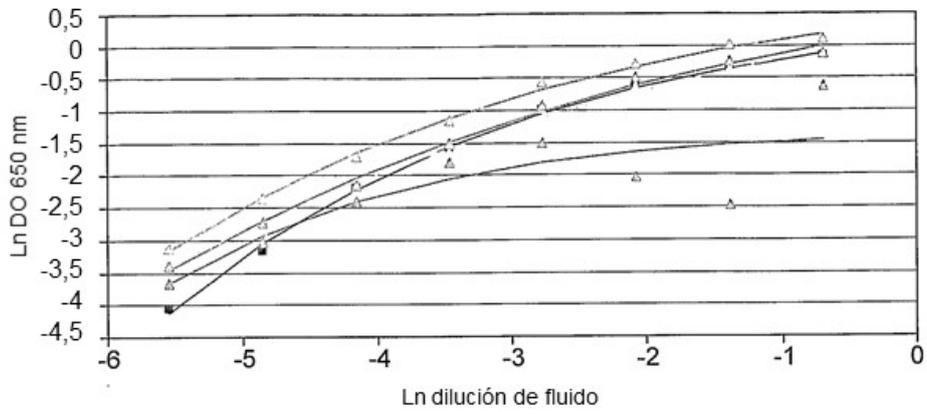


FIG. 10a

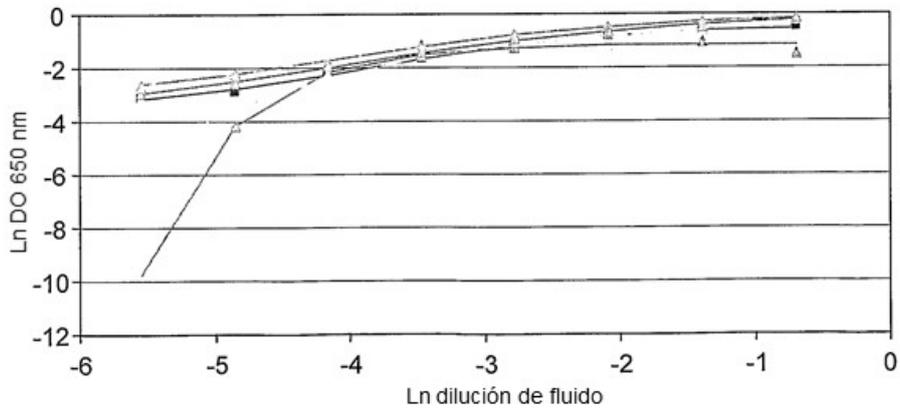


FIG. 10b

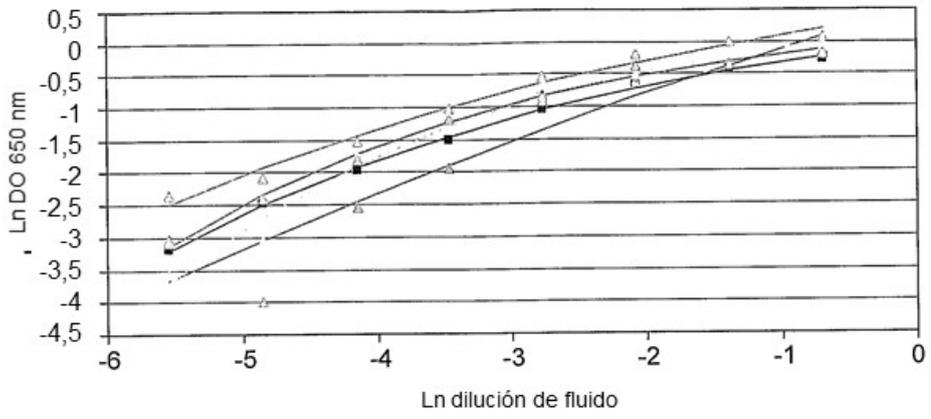


FIG. 11a

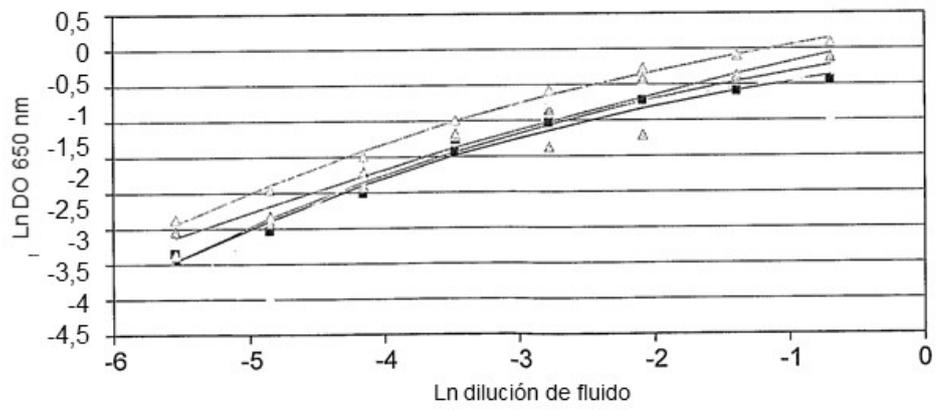


FIG. 11b

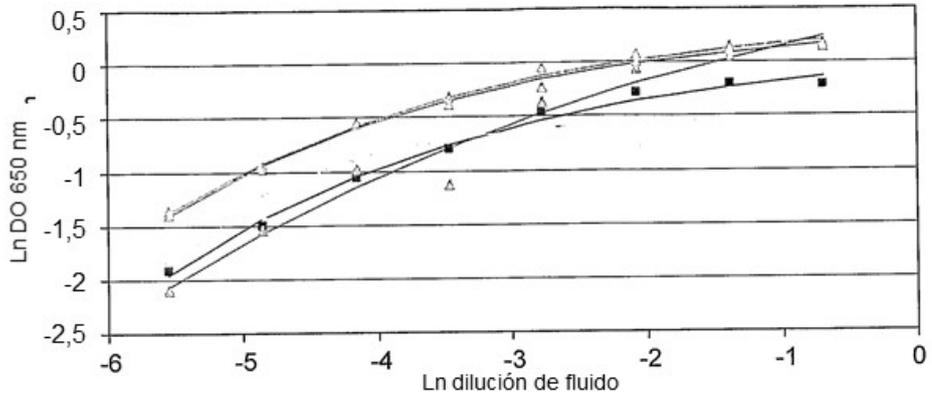


FIG. 12a

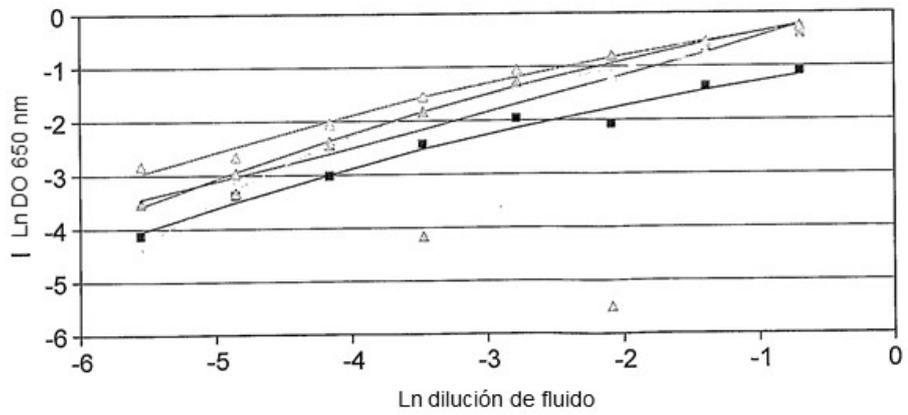


FIG. 12b

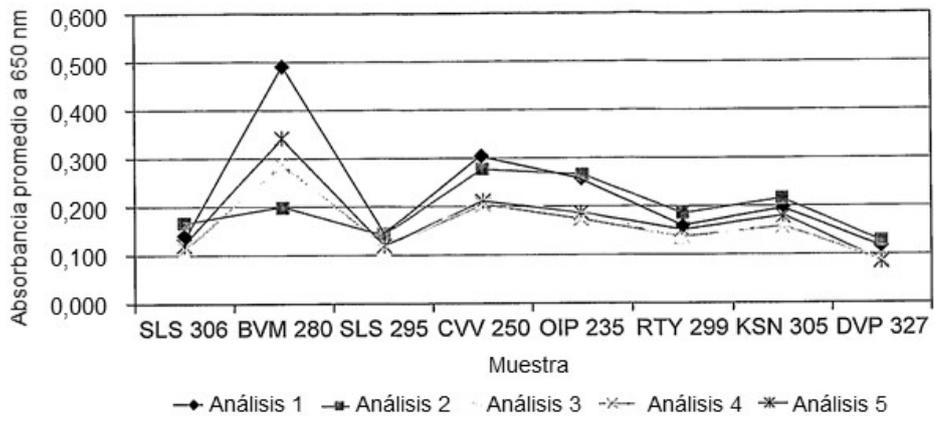


FIG. 13a

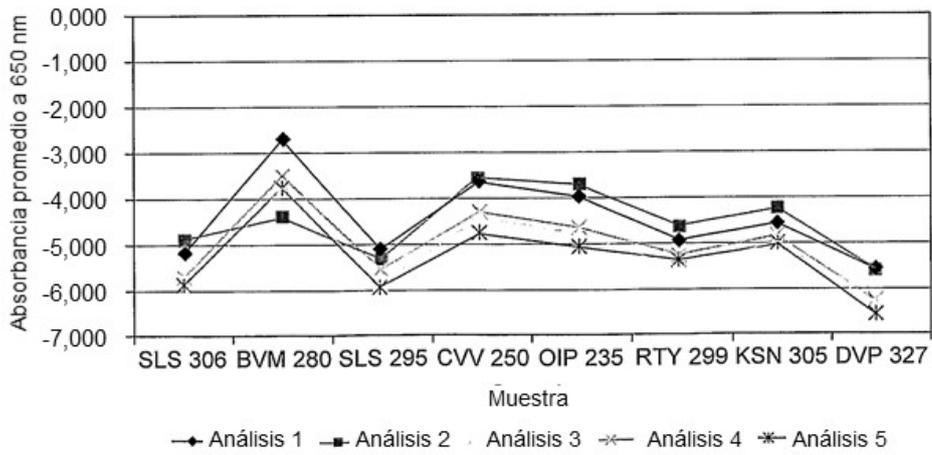


FIG. 13b

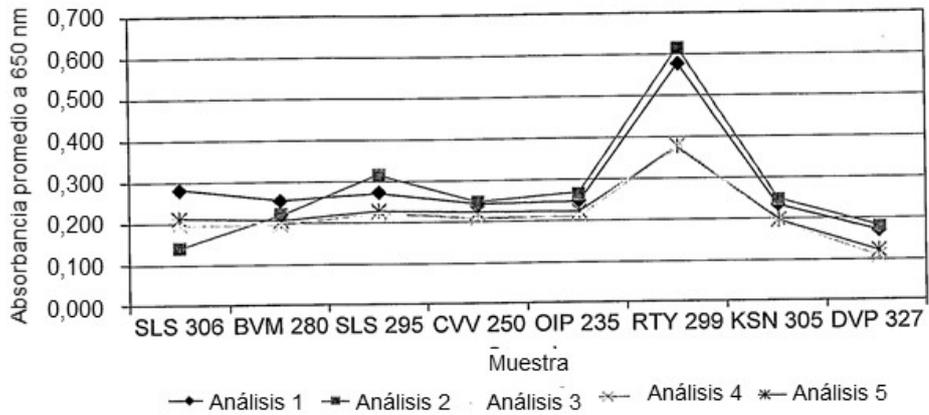


FIG. 14a

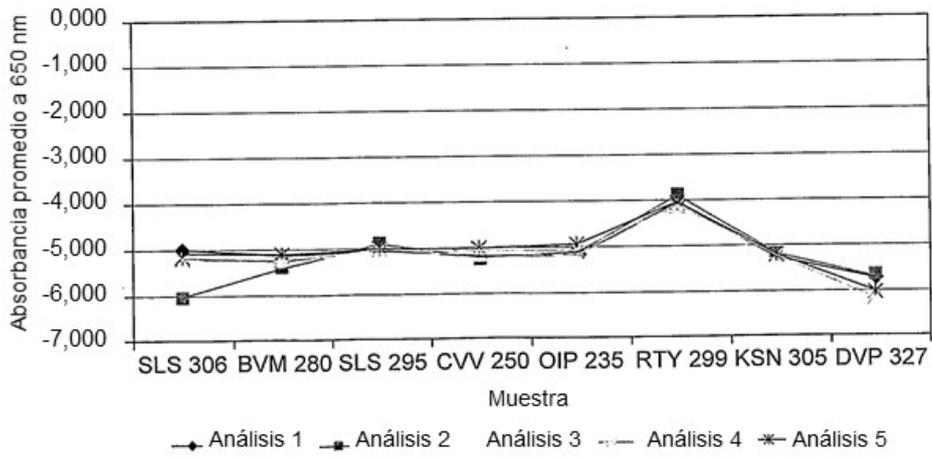


FIG. 14b

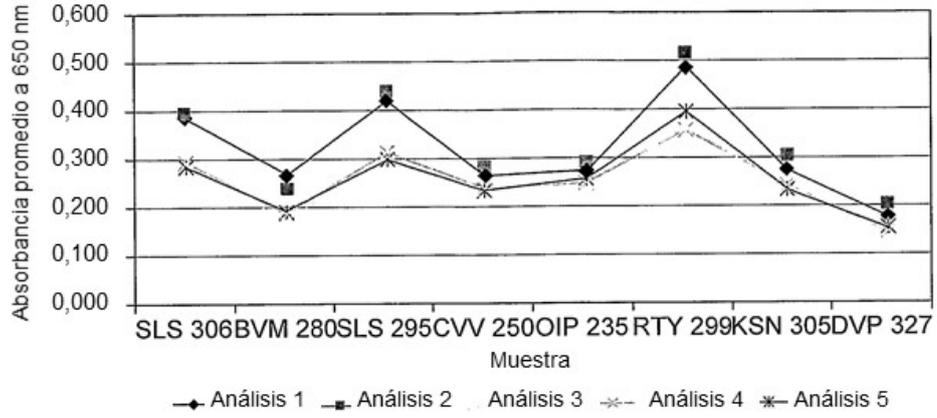


FIG. 15a

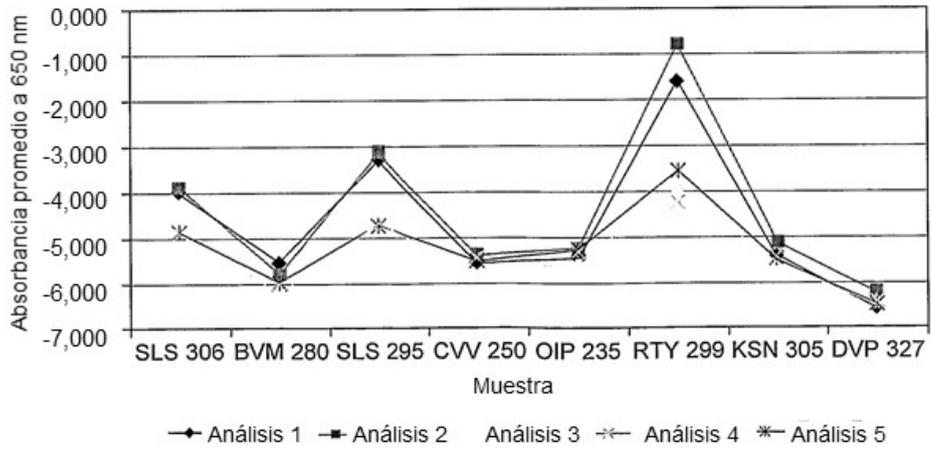


FIG. 15b

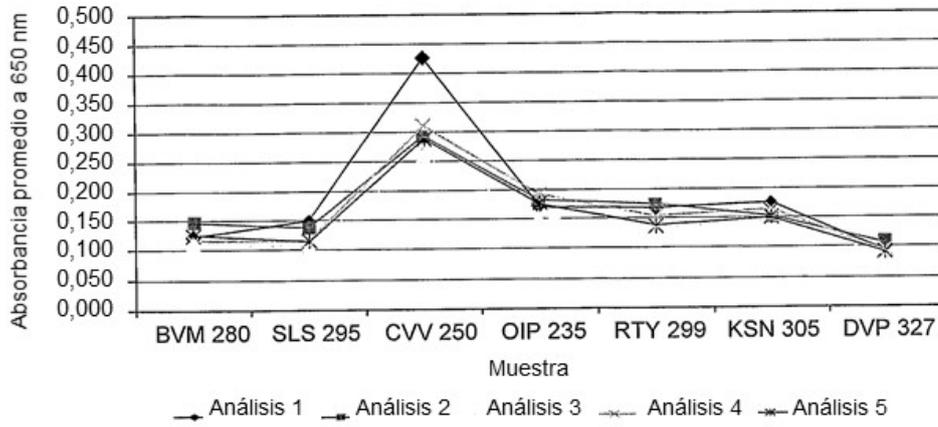


FIG. 16a

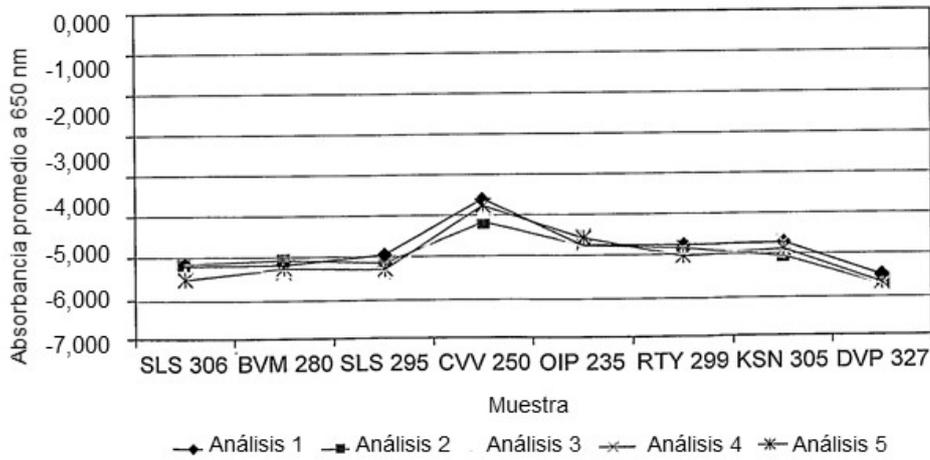


FIG. 16b

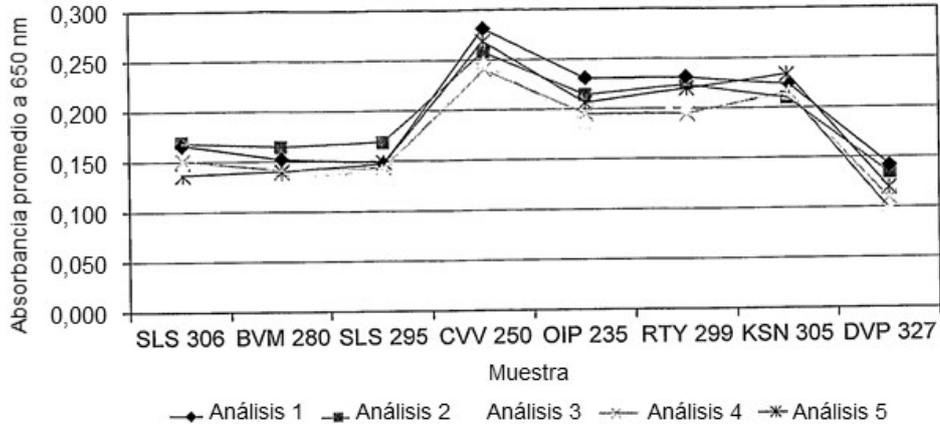


FIG. 17a

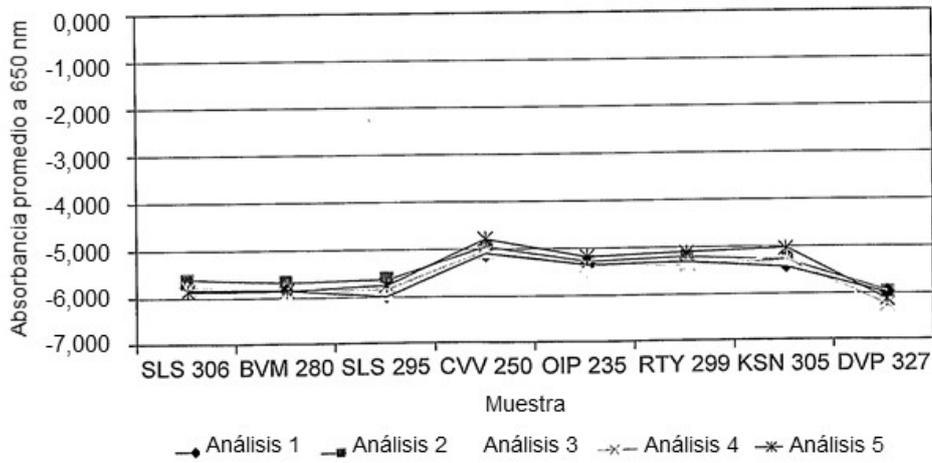


FIG. 17b

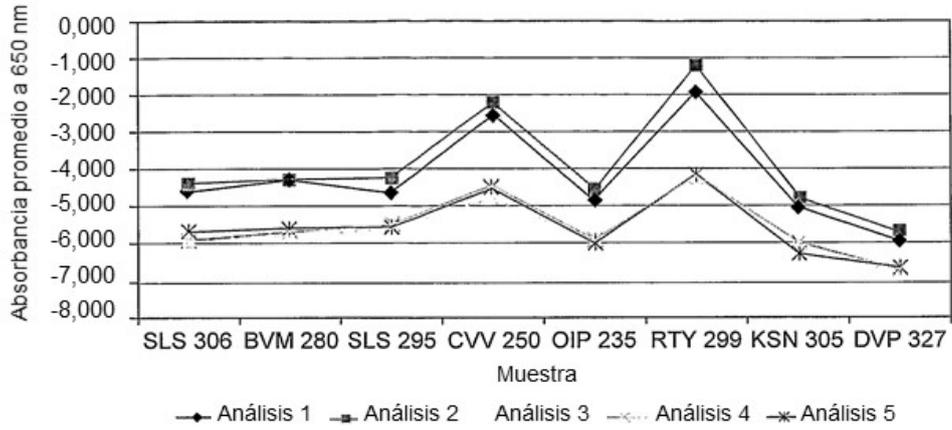


FIG. 18a

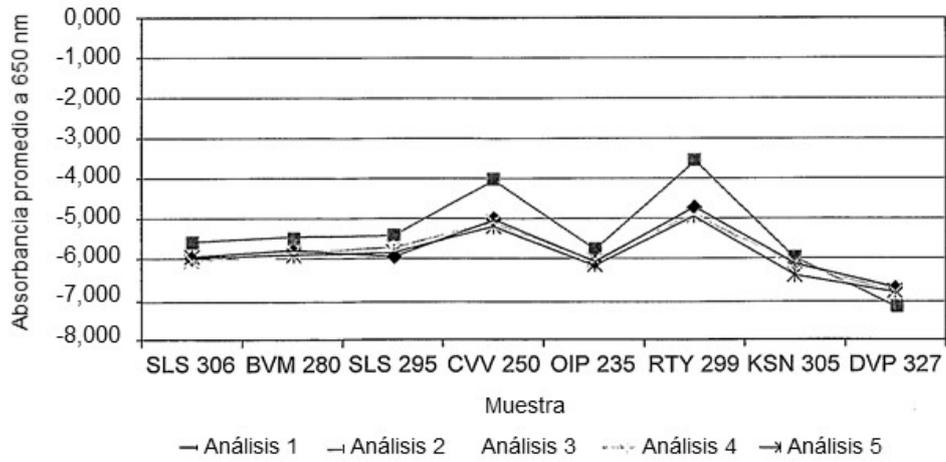


FIG. 18b

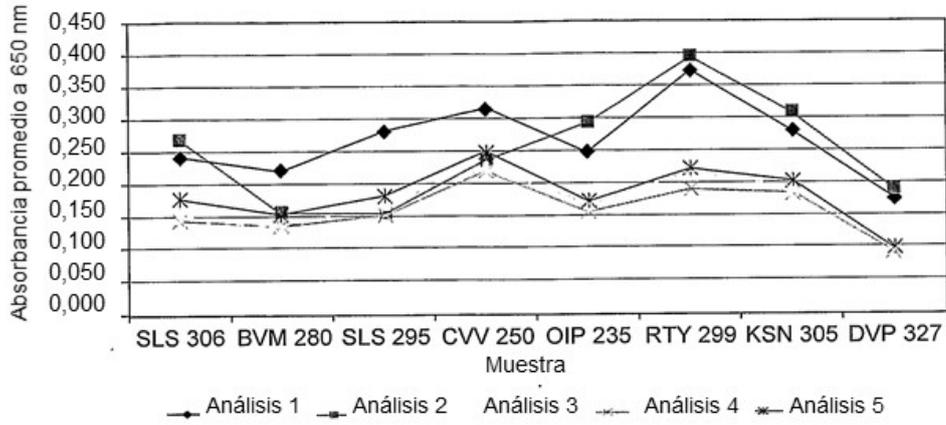


FIG. 19a

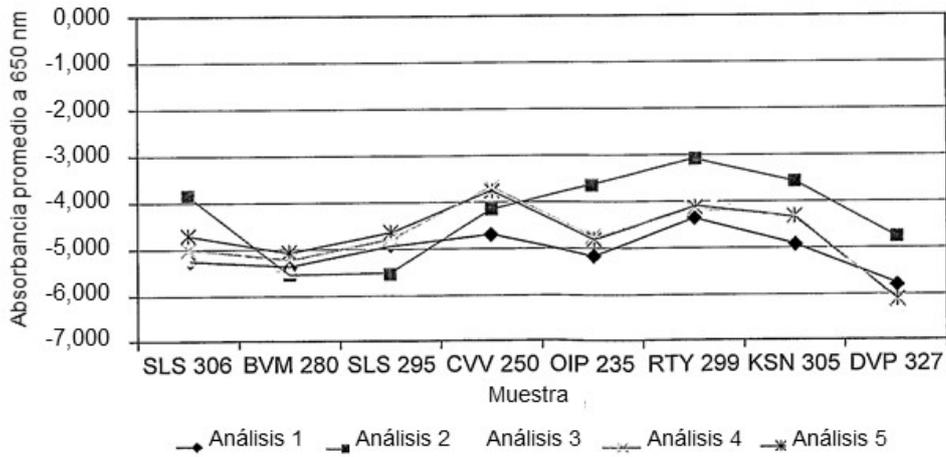


FIG. 19b

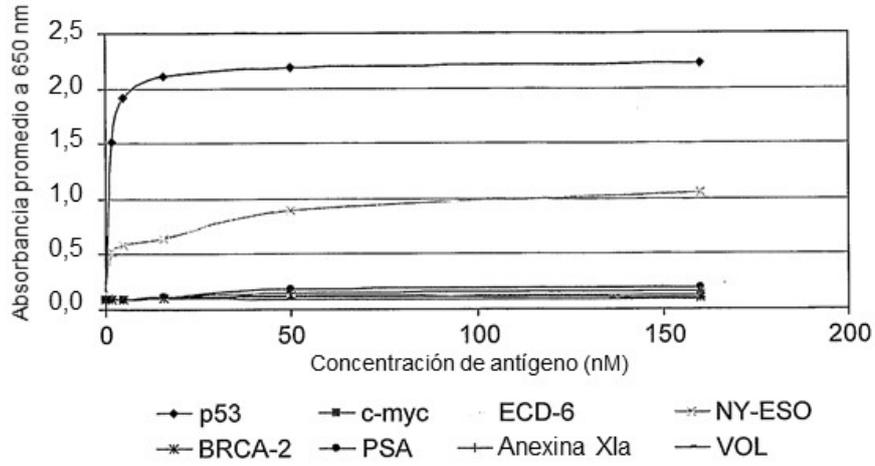


FIG. 20a

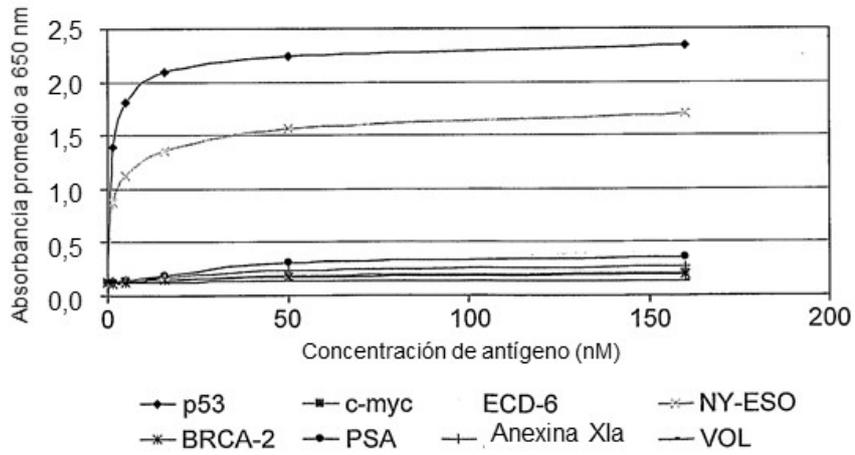


FIG. 20b

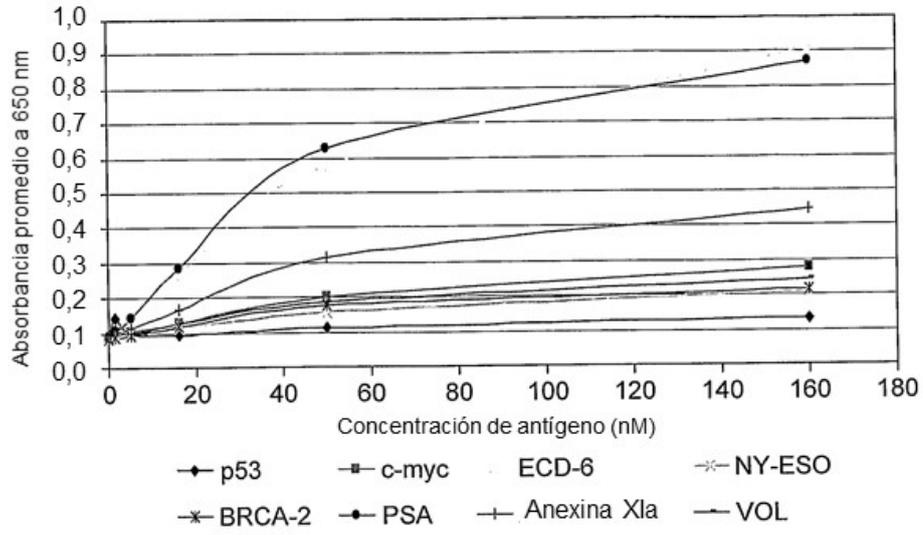


FIG. 21a

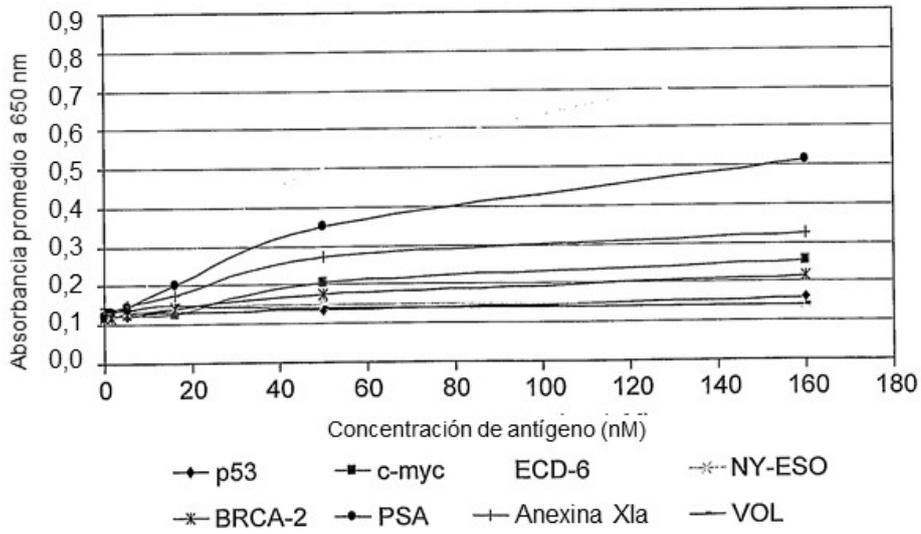


FIG. 21b

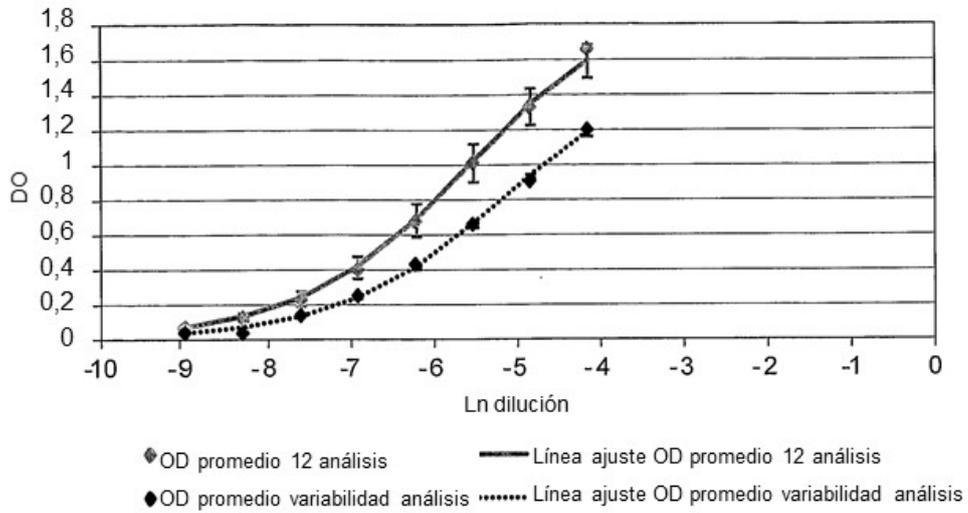


FIG. 22a

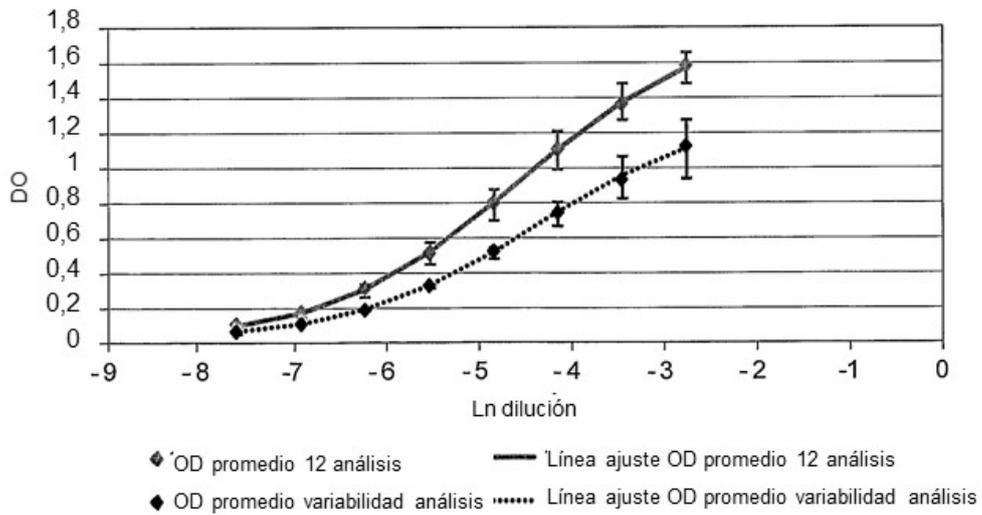


FIG. 22b

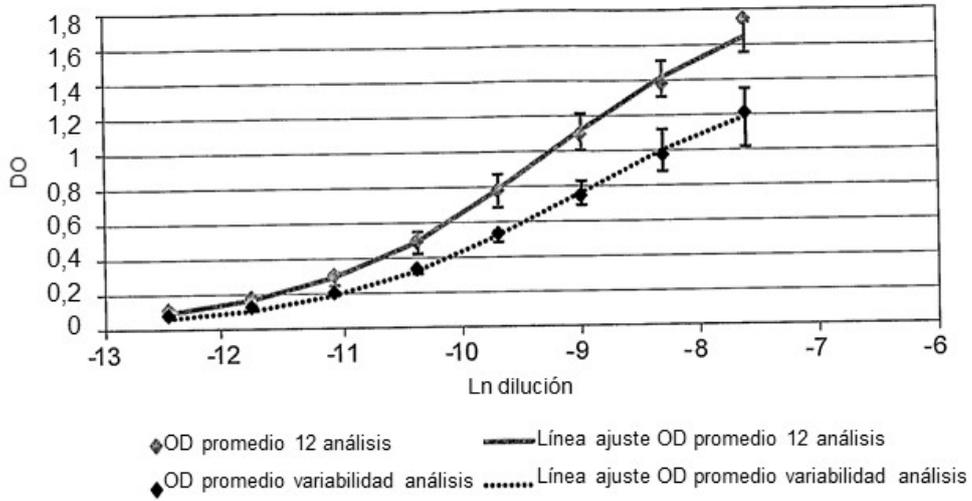


FIG. 22c

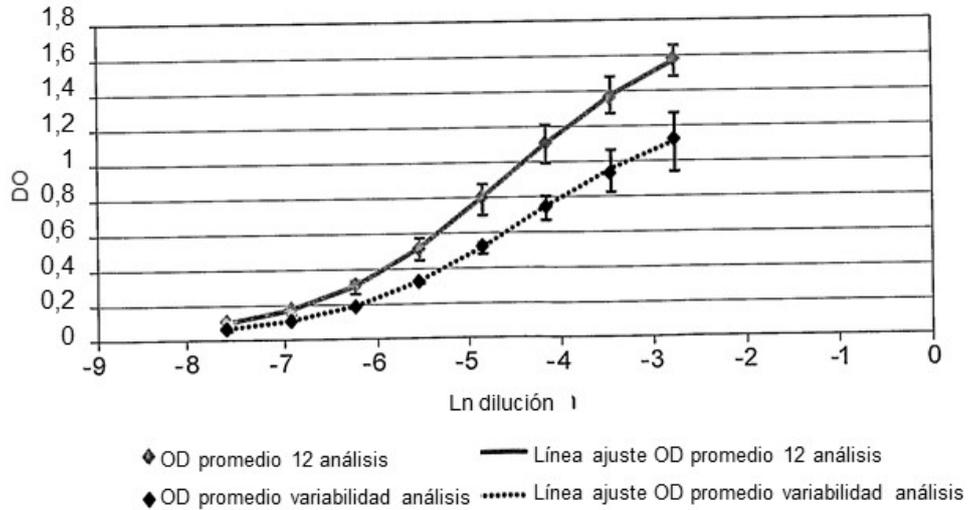


FIG. 22d

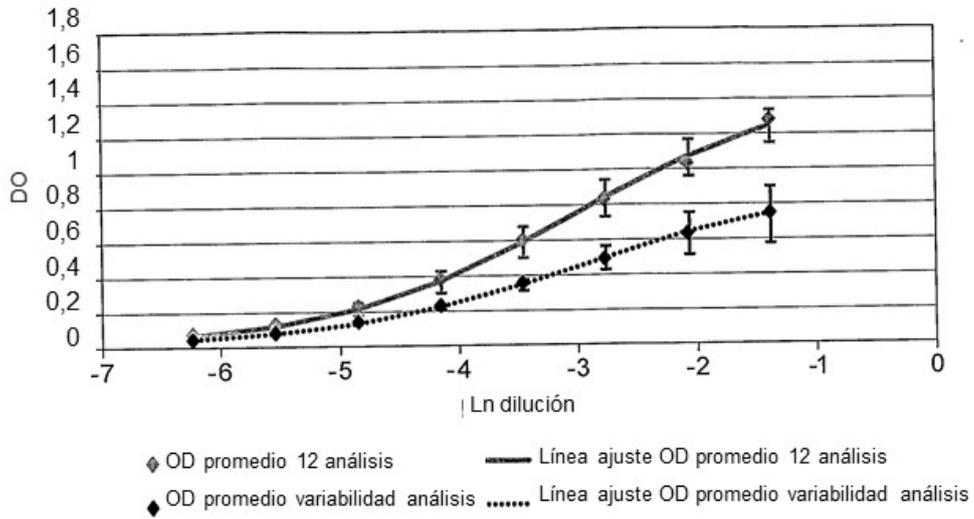


FIG. 22e

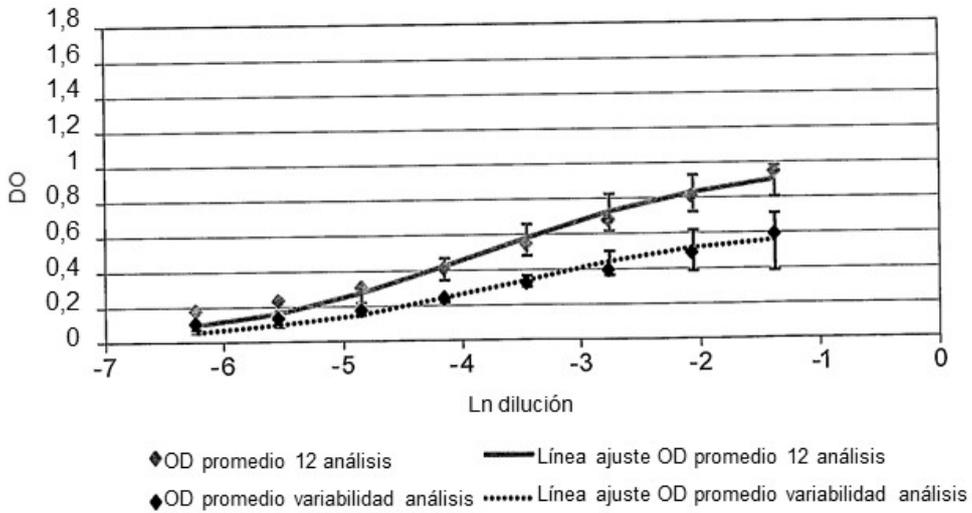


FIG. 22f

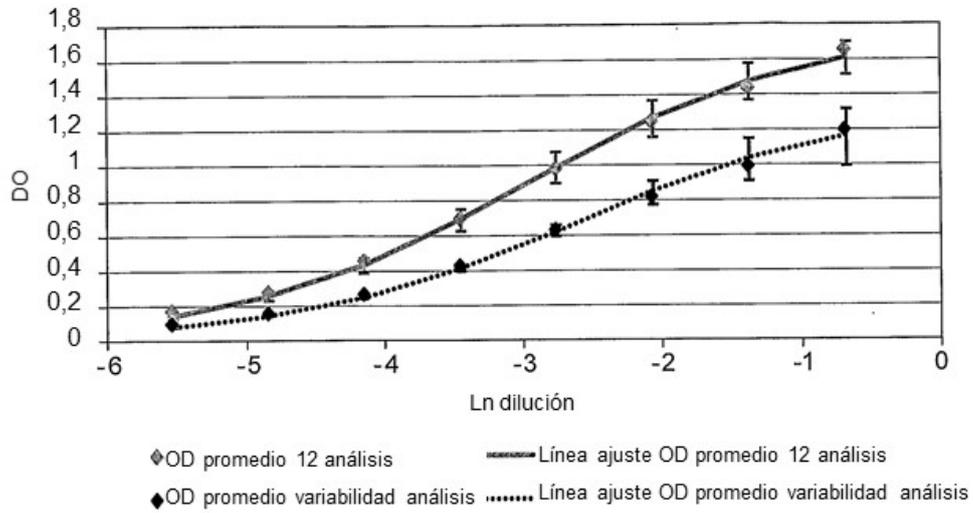


FIG. 22g

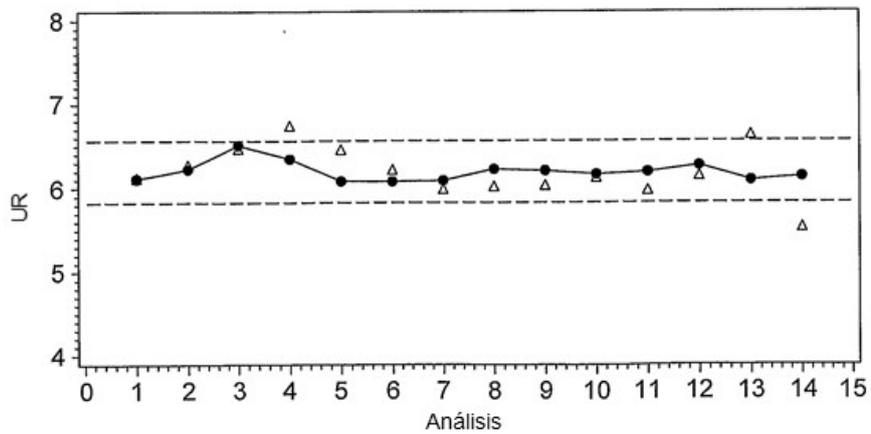


FIG. 23a

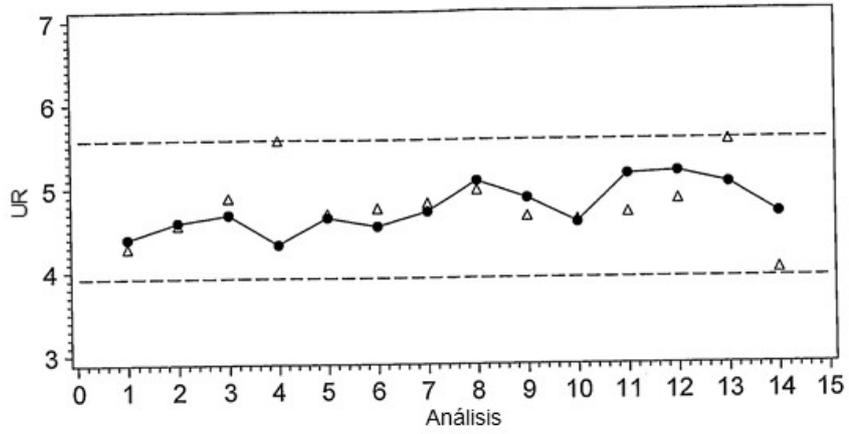


FIG. 23b

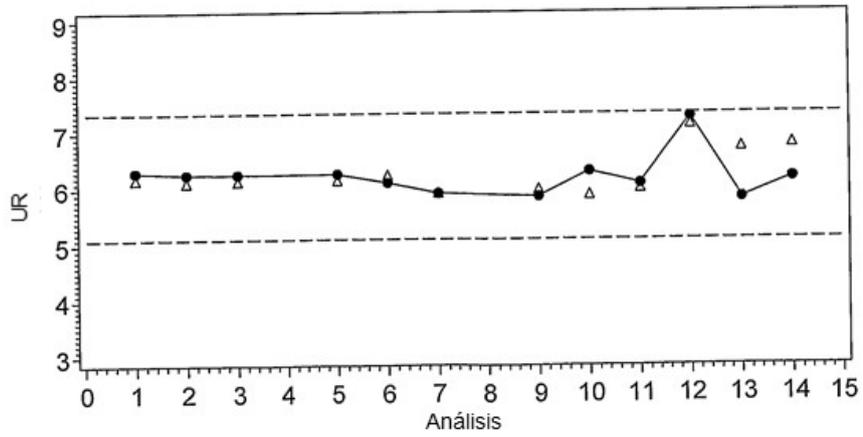


FIG. 23c

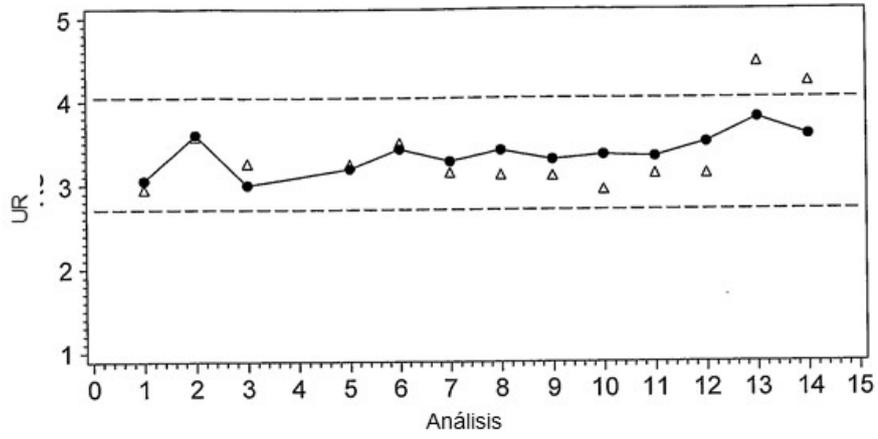


FIG. 23d

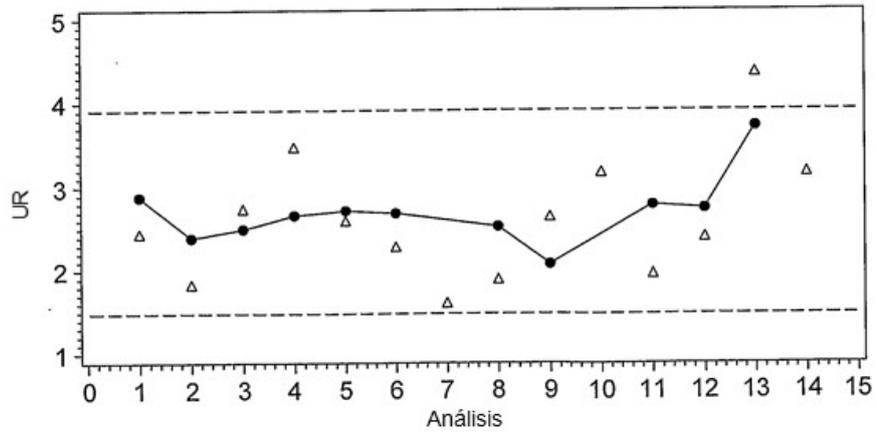


FIG. 23e

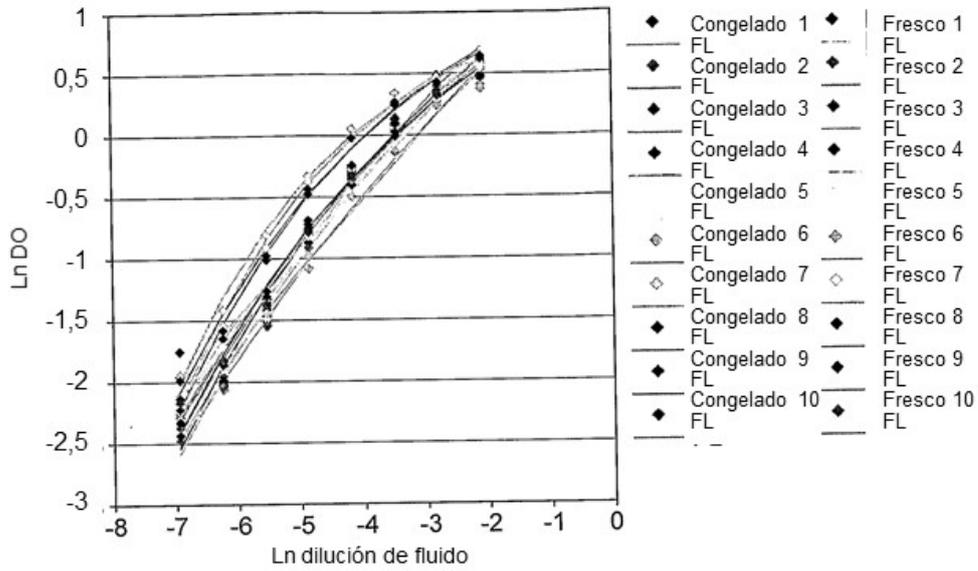


FIG. 24a

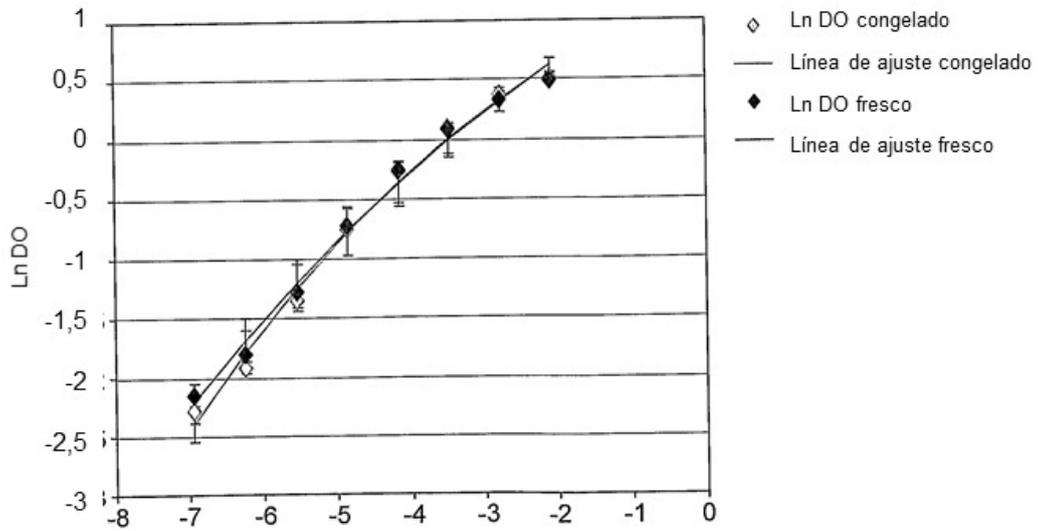


FIG. 24b

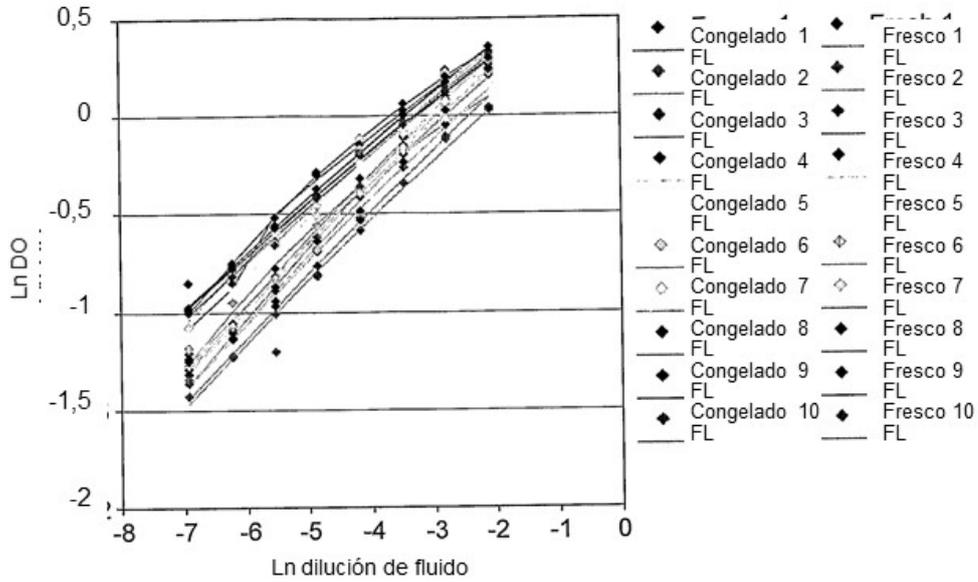


FIG. 25a

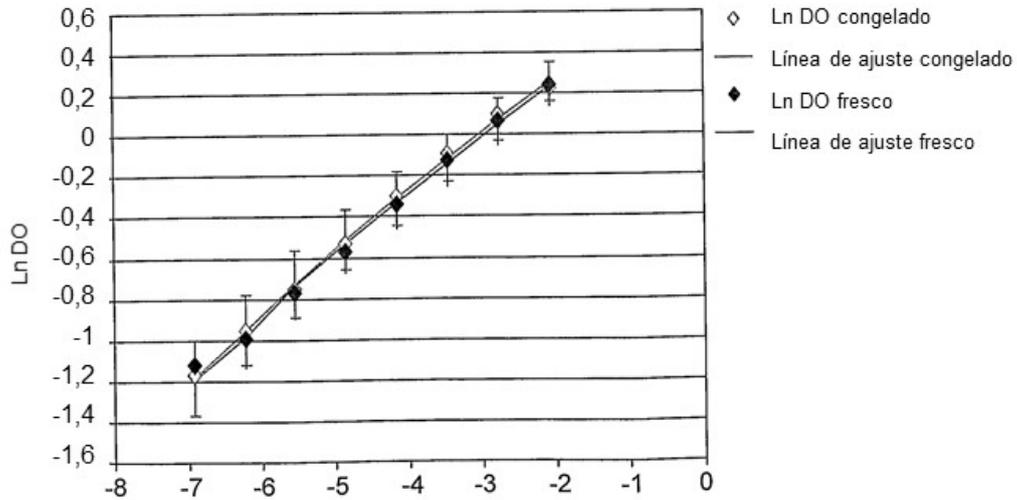


FIG. 25b

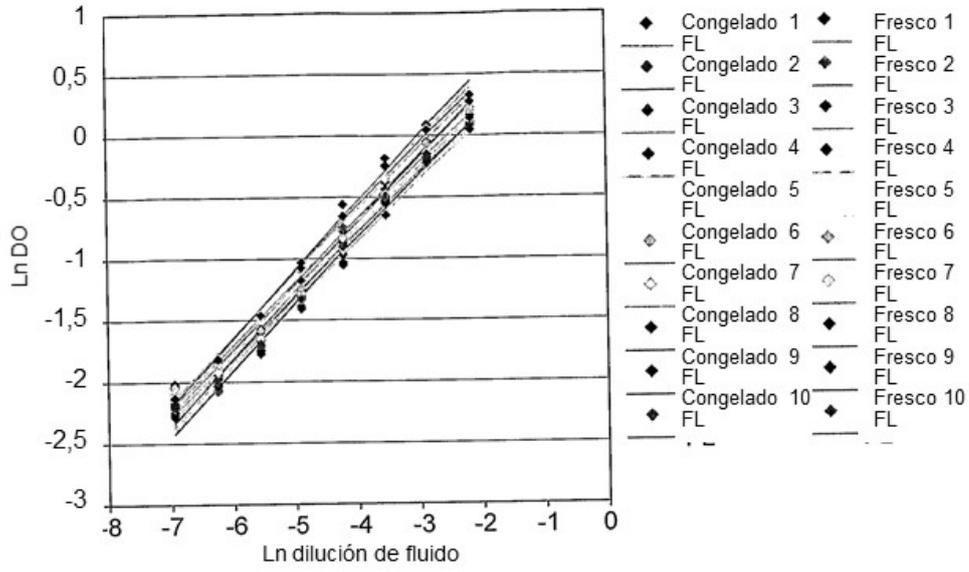


FIG. 26a

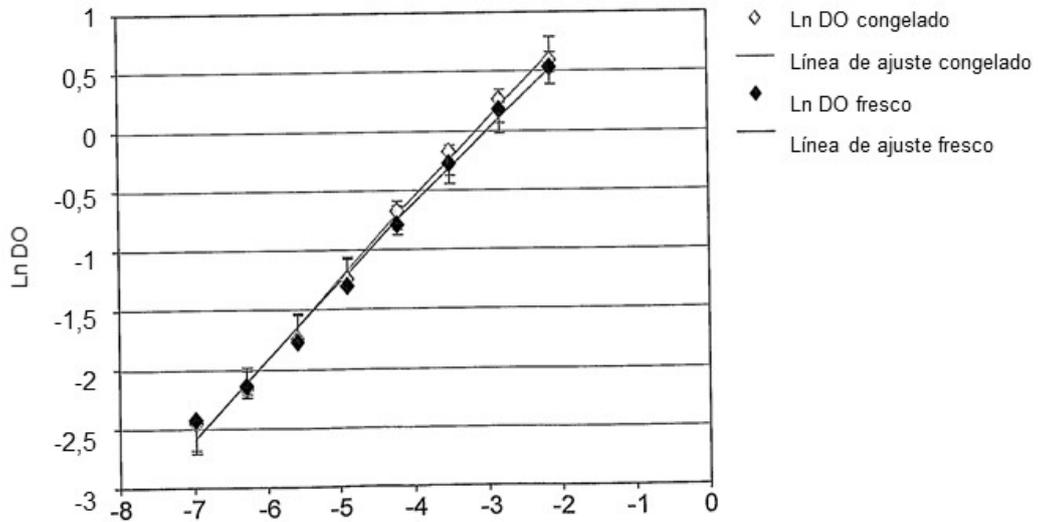


FIG. 26b

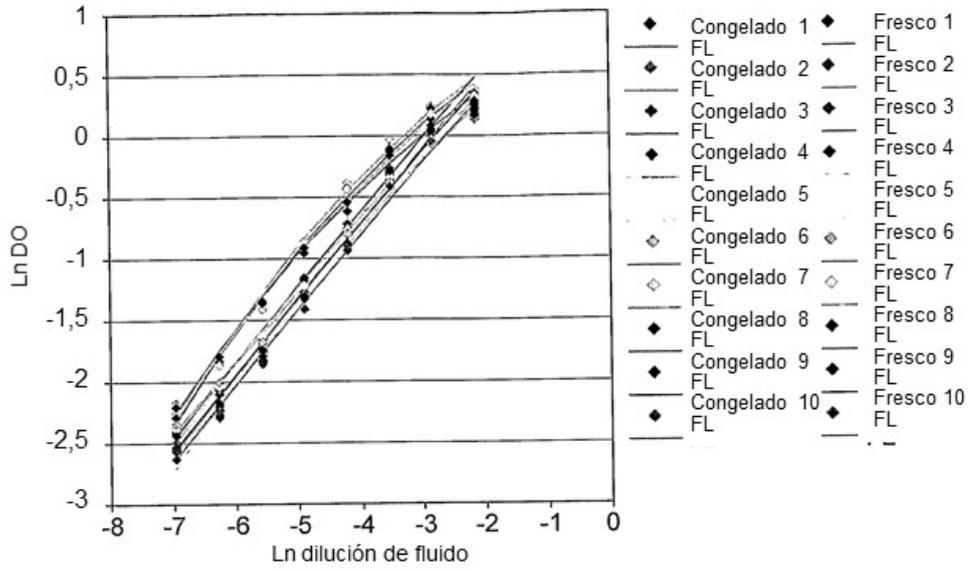


FIG. 27a

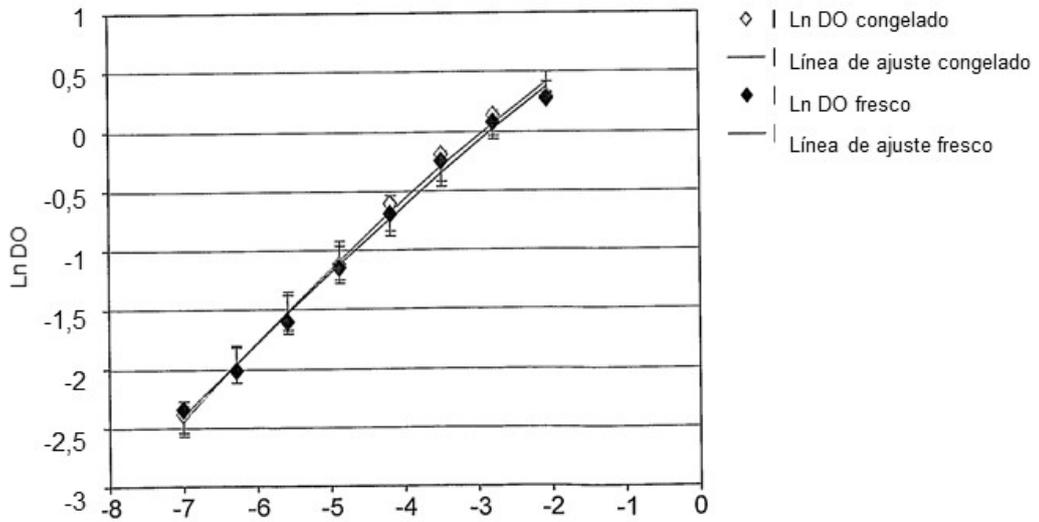


FIG. 27b

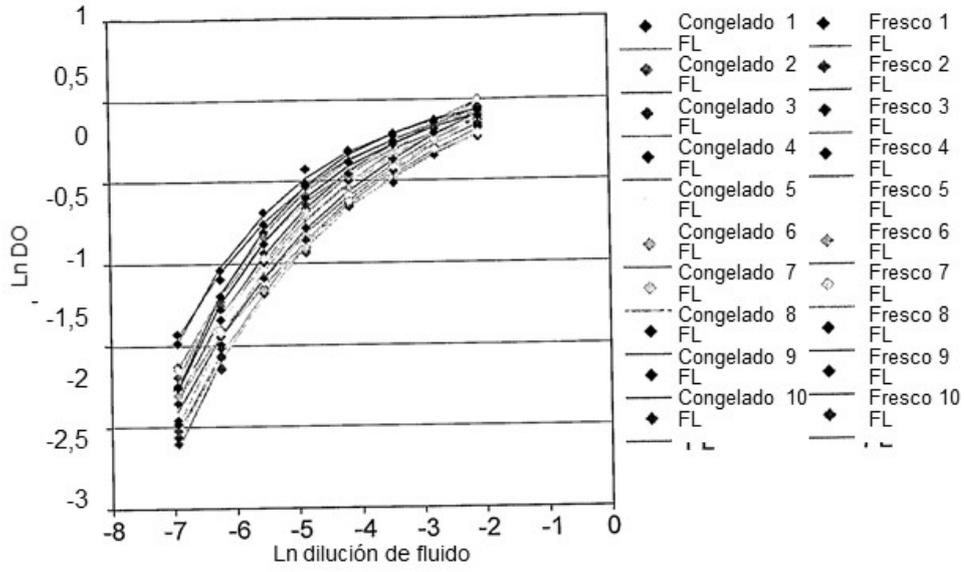


FIG. 28a

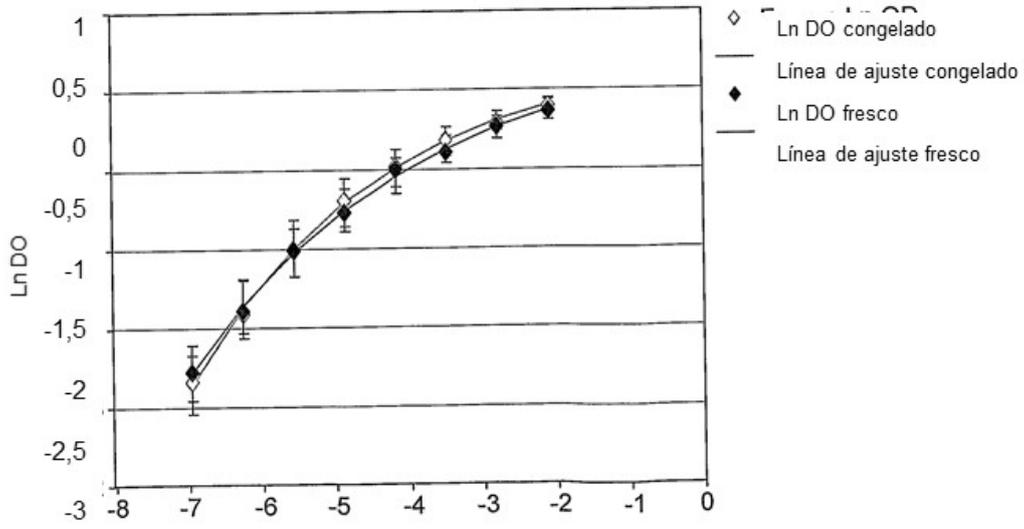


FIG. 28b

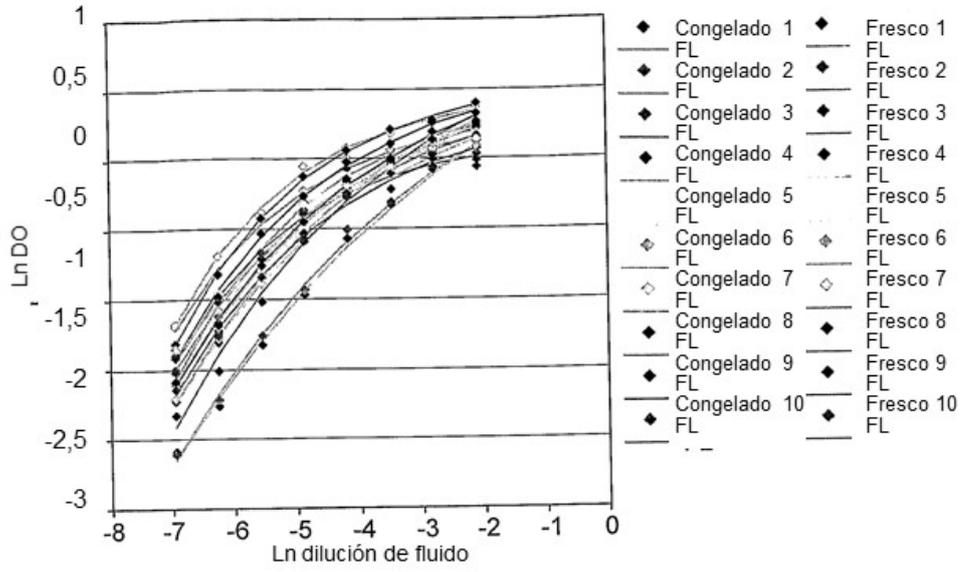


FIG. 29a

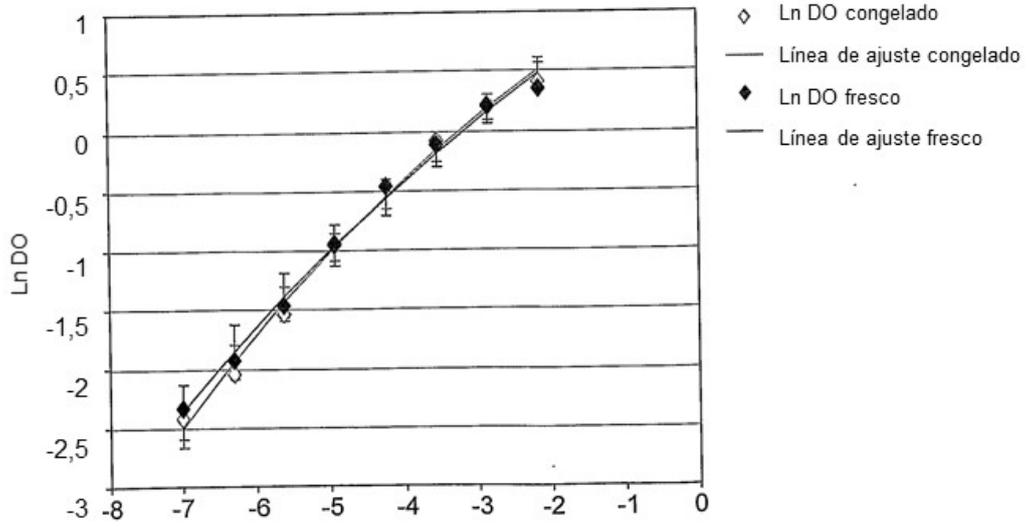


FIG. 29b

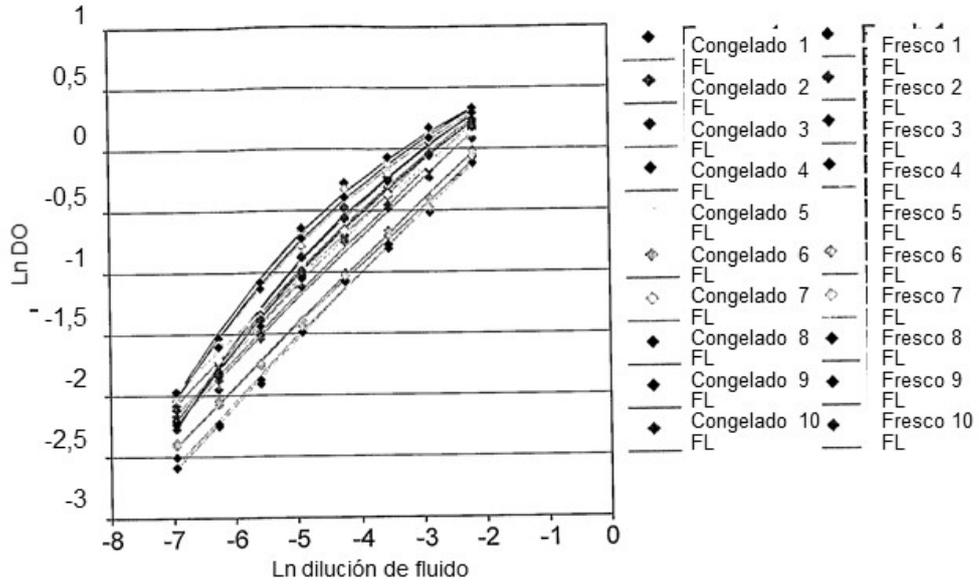


FIG. 30a

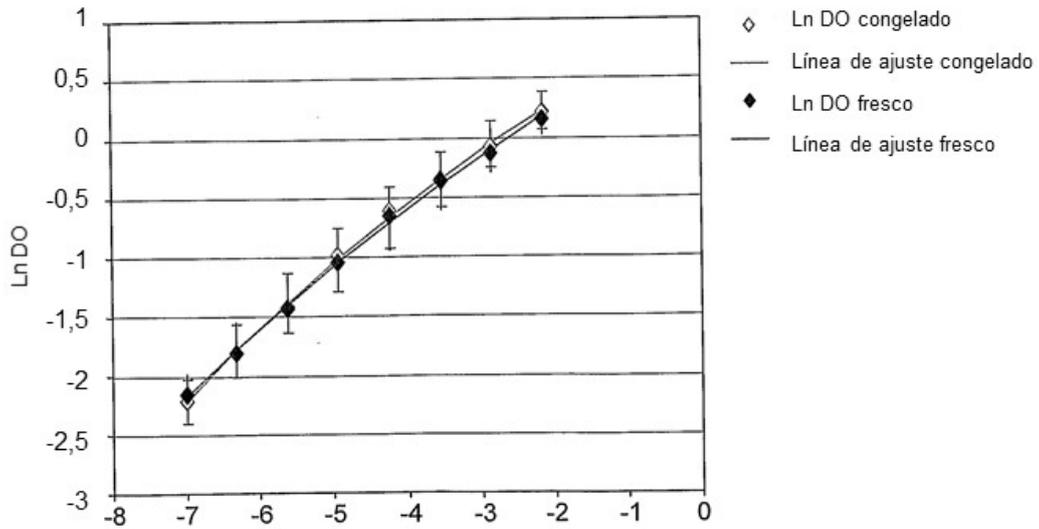


FIG. 30b

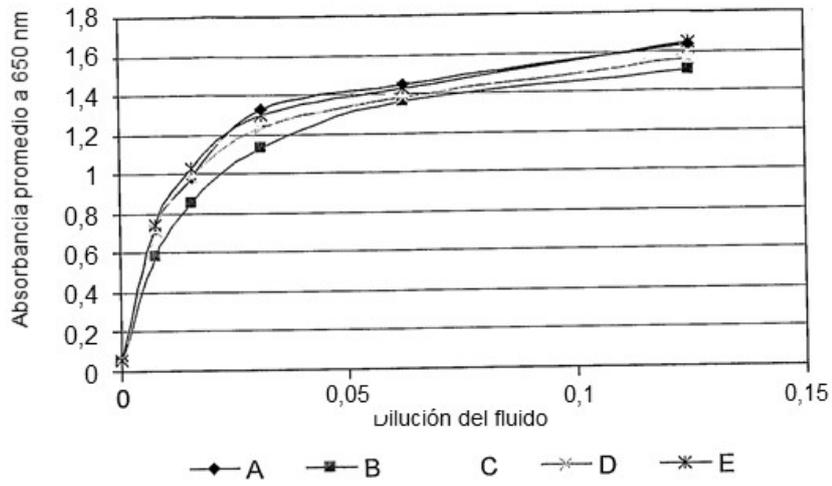


FIG. 31a

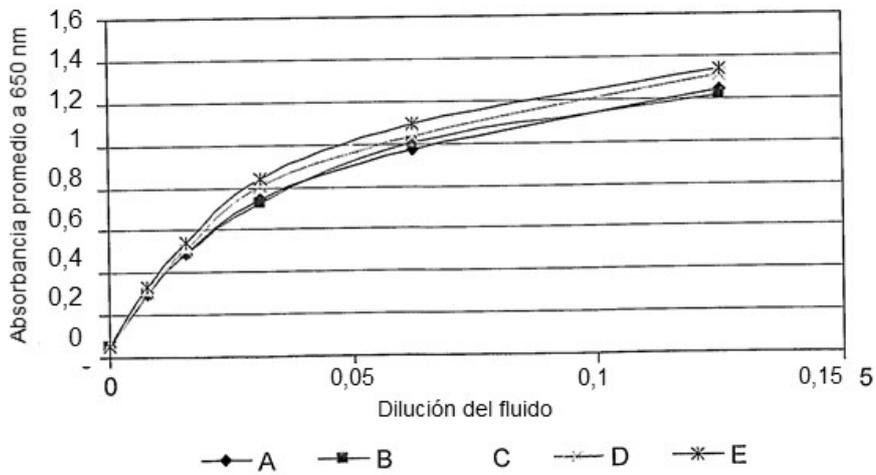


FIG. 31b

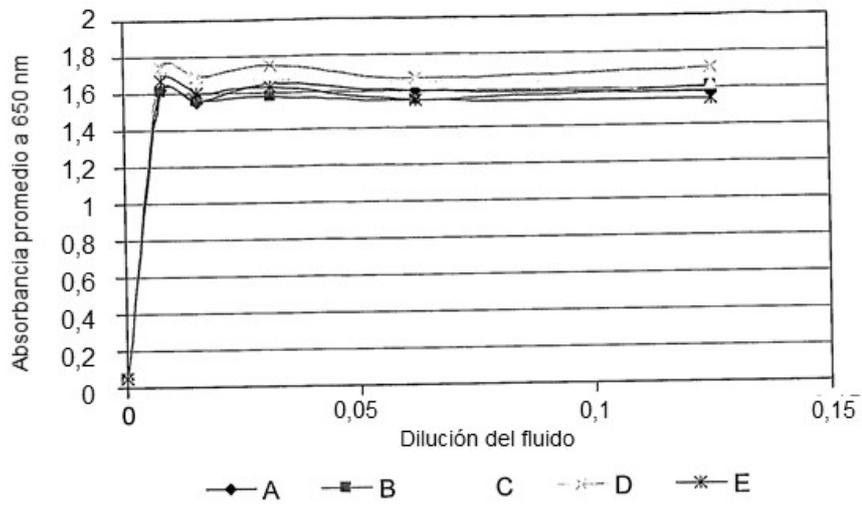


FIG. 31c

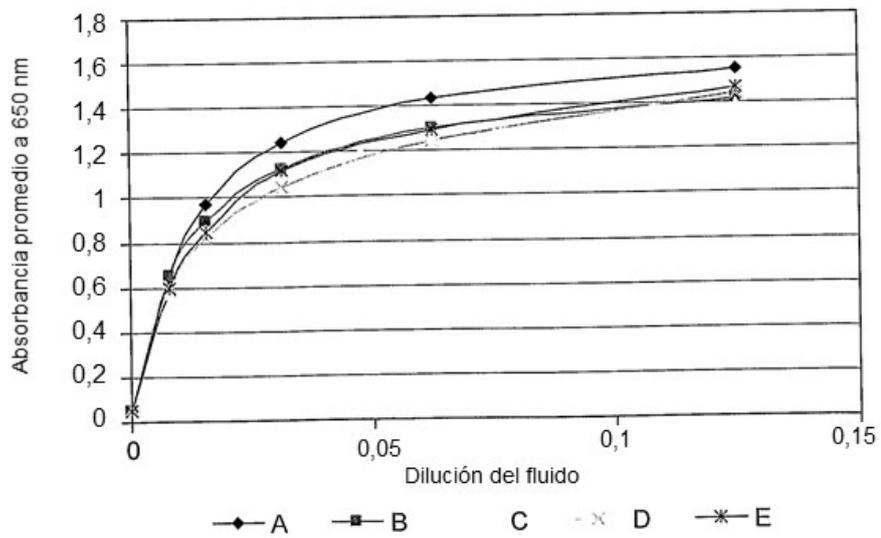


FIG. 31d

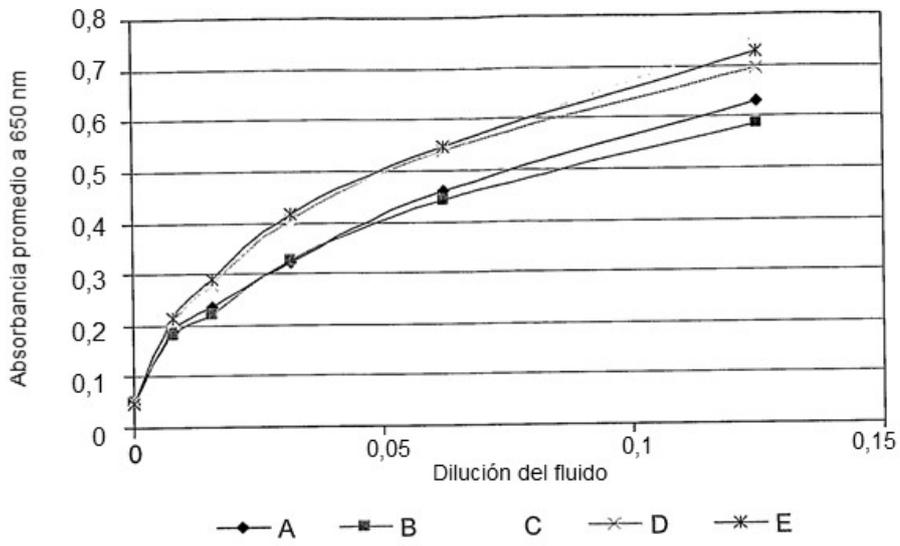


FIG. 31e

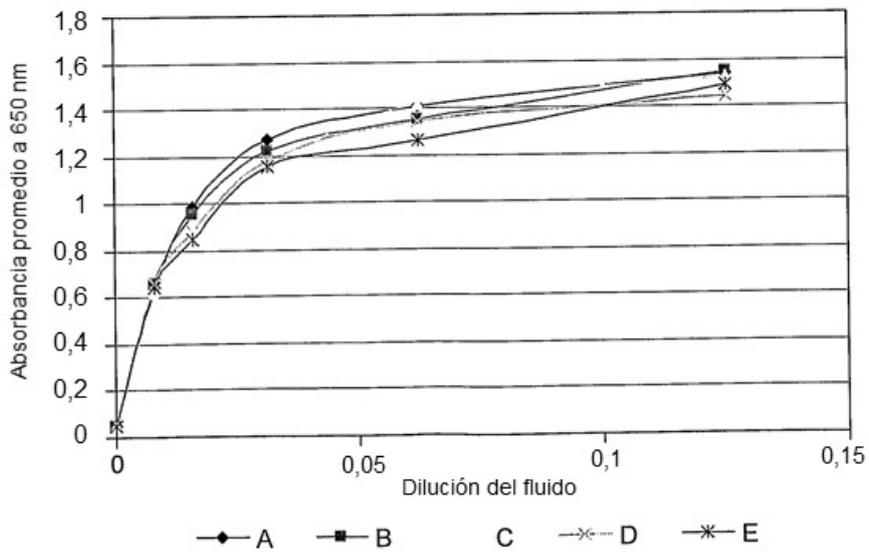


FIG. 31f

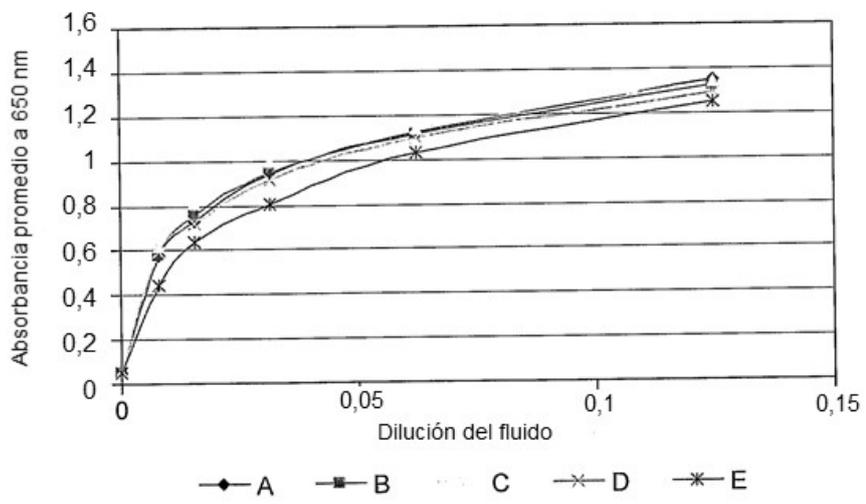


FIG. 31g

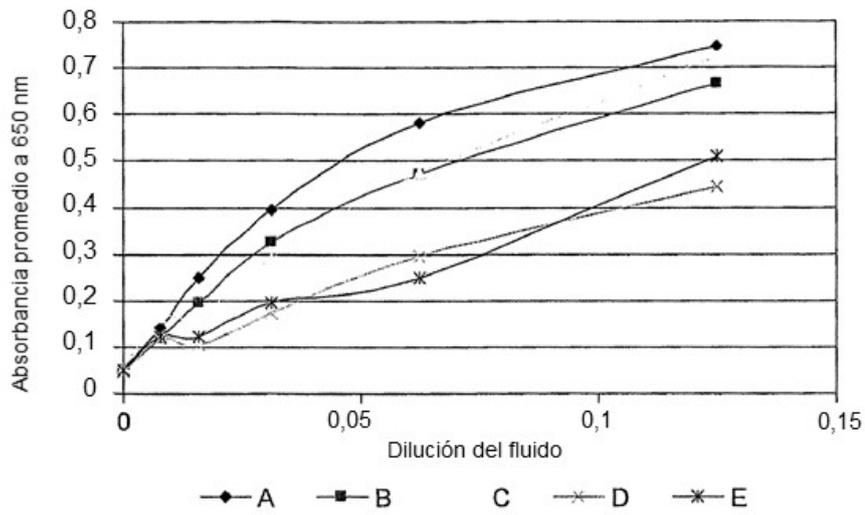


FIG. 32a

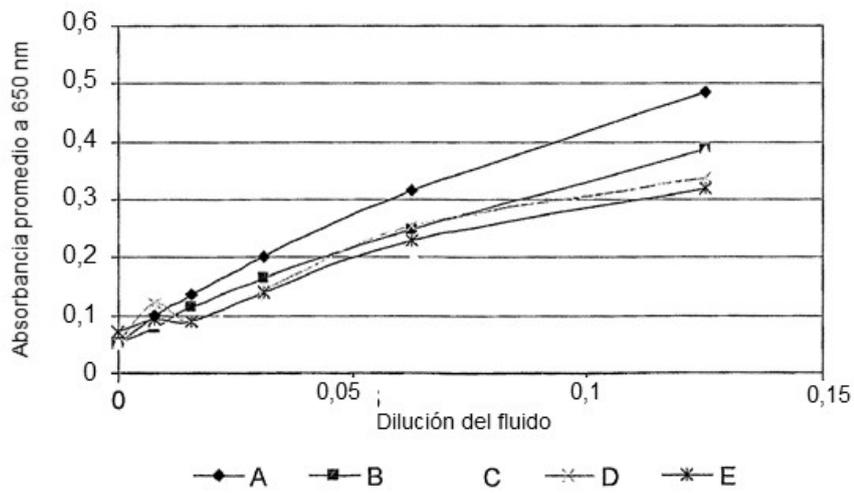


FIG. 32b

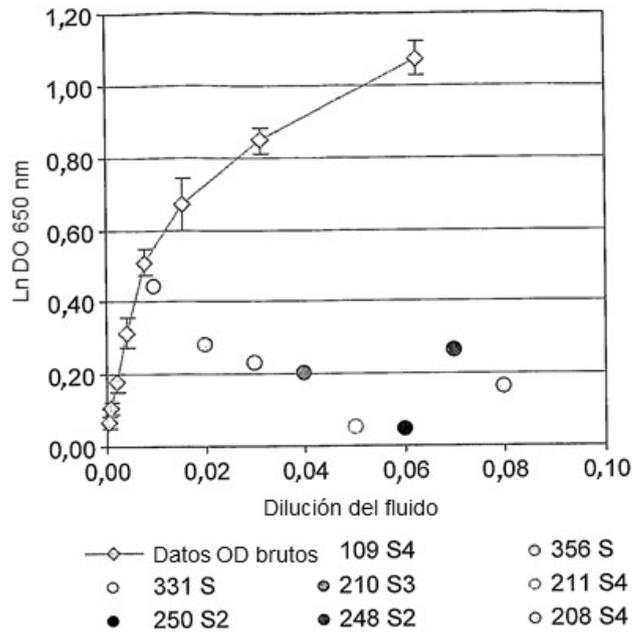


FIG. 33a

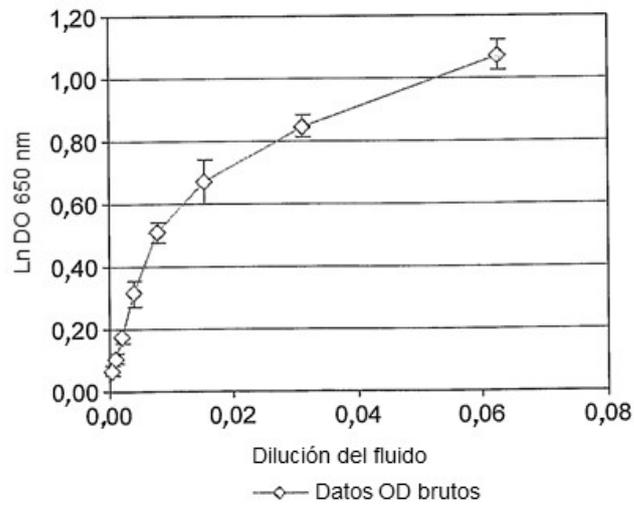


FIG. 33b

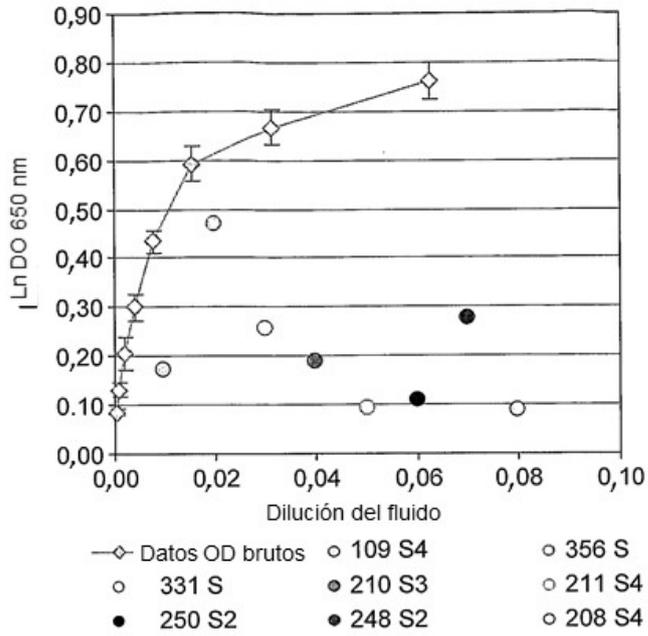


FIG. 34a

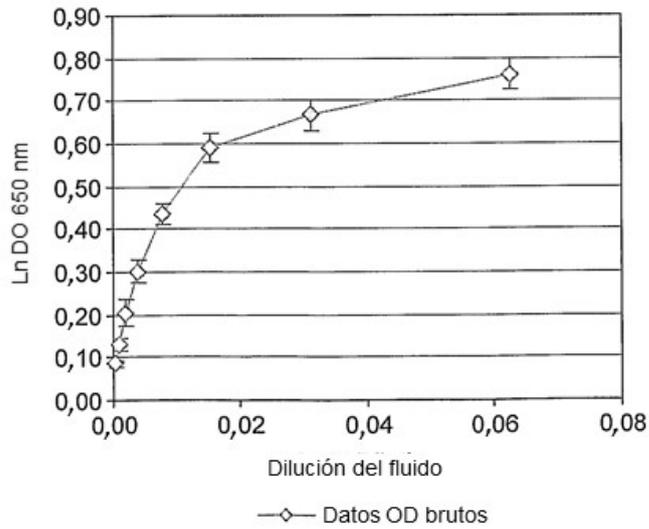


FIG. 34b

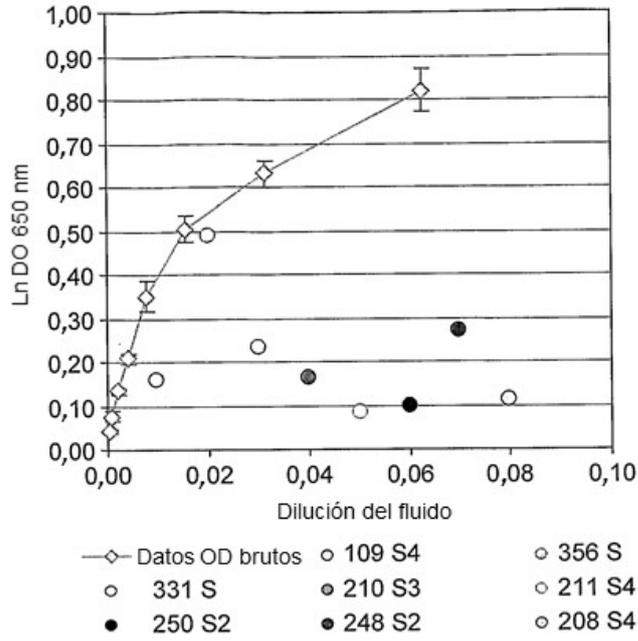


FIG. 35a

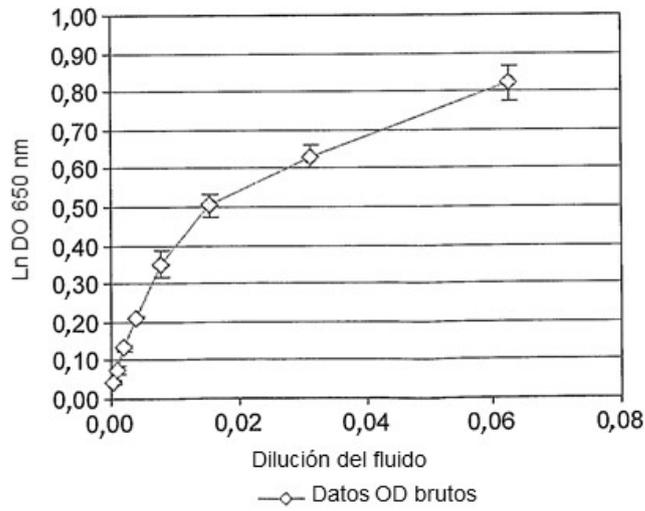


FIG. 35b