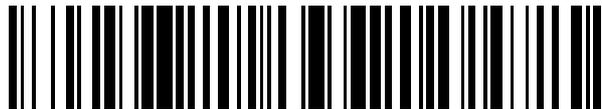


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 952**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2013 PCT/DE2013/000380**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14008884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2013 E 13765281 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2870477**

54 Título: **Kit de ensayo (ensayo rápido Combi) para la identificación sincrónica de biomarcadores en heces para la identificación de modificaciones patológicas en el tracto gastrointestinal, en especial en el intestino**

30 Prioridad:

**09.07.2012 DE 102012013888**  
**18.12.2012 DE 202012012084 U**

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

**17.04.2018**

73 Titular/es:

**SCHEBO BIOTECH AG (100.0%)**  
**Netanyastrasse 3-5**  
**35394 Giessen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHEEFERS, HANS y**  
**SCHEEFERS-BORCHEL, URSULA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 663 952 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

Kit de ensayo (ensayo rápido Combi) para la identificación sincrónica de biomarcadores en heces para la identificación de modificaciones patológicas en el tracto gastrointestinal, en especial en el intestino

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un nuevo kit de ensayo que reduce los costes, aplicable industrialmente (cassette de ensayo rápido Combi, producto médico in vitro, cassette de flujo lateral, prueba diagnóstica, ensayo rápido Combi, bioensayo, cintas de ensayo de flujo lateral rápido, plataforma) para la puesta en práctica de un procedimiento para la identificación de biomarcadores en heces humanas. El kit de ensayo sirve para el análisis sanitario, la detección temprana y la “prevención del cáncer de intestino” mediante la identificación de biomarcadores, que pueden dar una  
10 pista de modificaciones patológicas, en especial de un episodio maligno en el tracto gastrointestinal (esófago, estómago, intestino delgado, conductos biliares, pancreas e intestino grueso), en especial tumores y precursores de tumores (pólipos, adenomas) del intestino. La invención se refiere en especial a un ensayo rápido Combi y a un cassette de ensayo rápido Combi y a sus componentes, así como a los reactivos necesarios para la puesta en práctica sincrónica de un procedimiento de identificación inmunocromatográfico. Sincrónico en el significado  
15 lingüístico de “simultáneamente”, pero también sincrónico en el significado técnico de ajuste conjunto, óptimo de pares de acción (de condiciones cromatográficas, membranas, reactivos, velocidad de liberación, etc, véase descripciones) para la identificación de ambos biomarcadores tumor M2-PK y hemoglobina en un cassette de ensayo rápido Combi.

20 La invención se refiere además a un procedimiento más sencillo para la valoración del ensayo y a la presentación de resultados (“semáforo de peligro”).

El ensayo rápido Combi sirve para la “filtración previa” de voluntarios en el ámbito de un programa de exploración de cáncer de intestino. Ya que la puesta en práctica del ensayo rápido Combi no invasivo produce menos miedo que la realización de una colonoscopia invasiva en voluntarios, el ensayo conduce a una participación elevada en la colonoscopia.

25 Antecedentes de la invención

El cáncer, especialmente el cáncer de intestino, es la enfermedad cancerosa más frecuente en Alemania (65000 nuevos casos, 27000 casos de fallecimiento), en Europa mueren 200000 personas al año a causa de esta enfermedad maligna. Debido al modo de generación del cáncer de intestino, las consecuencias de enfermedades cancerosas intestinales se minimizan en gran medida mediante una exploración exitosa, es decir, la identificación de  
30 precursores (pólipos, adenomas) y su eliminación. En Alemania, cada 20 minutos muere una persona de cáncer de intestino. El cáncer de intestino se desarrolla casi siempre a partir de proliferaciones benignas de la mucosa intestinal (mucosa). El cáncer crece lentamente y durante un tiempo prolongado sin que el enfermo observe nada. Solo aparecen molestias cuando el tumor es grande, o bien se ha formado metástasis. Entonces, el cáncer de intestino sin tratar conduce frecuentemente a la muerte en el intervalo de 12 meses.

35 Debido a su modo de generación, las consecuencias del cáncer de intestino son casi completamente evitables mediante una exploración de voluntarios asintomáticos. Los precursores (pólipos/adenomas) se pueden identificar de manera precoz mediante medidas de exploración. La colonoscopia se considera el mejor procedimiento (estándar de oro) en el ámbito de la detección precoz del cáncer de intestino. La colonoscopia constituye un procedimiento invasivo, realizable solo por médicos de formación especializada (por ejemplo gastroenterólogos). Este  
40 procedimiento está vinculado a riesgos (por ejemplo perforación, riesgos debidos a la sedación). La colonoscopia preventiva se ofrece a todas las personas a partir de 55 años como catálogo de prestaciones. No obstante, la tasa de participación se sitúa apenas en un 2-3 %, y incluso ha descendido ya a pesar de la considerable información y las campañas de marketing, “deslumbrantes acciones mundiales“! El motivo de este hecho consiste, entre otros factores, en el procedimiento de investigación, que muchas personas consideran desagradable (umbral de inhibición  
45 psicológico).

Tarea de la invención:

1. Reducción del umbral de inhibición psicológico.
2. Aumento de la tasa de participación en la colonoscopia preventiva.
3. Calibrado (eliminación de diferencias de calidad).
4. Estandarización.
5. Aumento de la seguridad del diagnóstico.

Vía de solución: la puesta a disposición de un ensayo de flujo lateral simple, robusto, económico, rutinario, que es apropiado además para la detección de enfermedades gastrointestinales patológicas, en especial cáncer de intestino

y sus precursores, mediante la identificación sincrónica de dos biomarcadores especiales (M2-PK y hemoglobina). El ensayo rápido Combi, que es realizable de manera sencilla y sin problemas, es apropiado para reducir el umbral de inhibición psicológico frente a la colonoscopia de diagnóstico. Ya el diagnóstico positivo de solo un biomarcador, M2-PK y/o hemoglobina, induce a la medida de una colonoscopia con el fin del diagnóstico ulterior por parte del médico.

5 Esto conduce a una tasa de detección más elevada de cáncer de intestino y sus precursores mediante la colonoscopia, ya que con el ensayo rápido Combi precedente se efectúa una selección previa de voluntarios. Ya que el ensayo rápido Combi determina dos biomarcadores importantes para cáncer de intestino, este ensayo sirve como filtro doble antes de la colonoscopia.

10 El cáncer de intestino con sus precursores (secuencia pólipo-cáncer) comienza en el lado interno del intestino (mucosa), y se amplía entonces a otras áreas de tejidos (submucosa, muscular, serosa). Si el crecimiento tumoral sobrepasa el límite de mucosa se habla de un cáncer de intestino en estado temprano o avanzado. Ya que las heces tienen contacto directo con la mucosa del intestino, los biomarcadores son identificables por vía analítica como indicadores para modificaciones patológicas en el tracto gastrointestinal de manera más rápida y específica que en la sangre. Por este motivo, el material de muestra fecal es preferente frente al material de muestra sanguíneo. Solo

15 si el tumor ha alcanzado la submucosa se pueden identificar biomarcadores en la sangre. Si estos marcadores son identificables en la sangre, frecuentemente se trata de formas “tardías” de cáncer de intestino y sus precursores. En general, la medida de biomarcadores en heces es ventajosa en comparación con la medida de biomarcadores en la sangre. Cuanto más pronto se detecta un cáncer de intestino y sus precursores, tanto mejor es el pronóstico. La terapia iniciada (por ejemplo colonoscopia curativa, cirugía “visceral reducida”) conduce a una curación casi del 100

20 % en el caso de cáncer de intestino en estado temprano.

La colonoscopia se considera “estándar de oro” para el control de un proceso maligno, en especial tumoral.

Solo médicos de cualificación especial pueden llevar a cabo la colonoscopia. La colonoscopia tiene además el inconveniente de no estar estandarizada. También se someten a colonoscopia los voluntarios “equivocados”. En el examen del intestino (colonoscopia), que es un componente central de la detección precoz, alrededor de un 70 % de

25 los diagnósticos son discretos. En solo aproximadamente un cuarto de los casos se diagnostican precursores y en un 1 % de los casos se diagnostica un carcinoma. Por lo tanto, la colonoscopia preventiva es un procedimiento de exploración muy ineficaz y además caro, ya que se someten a colonoscopia muchos voluntarios sanos (se reducen los costes sanitarios!).

30 Por lo tanto, es deseable anteponer a la colonoscopia una prueba no invasiva, económica y sensible, fiable, que mide varios biomarcadores de manera sincrónica para llevar a colonoscopia selectivamente a los voluntarios con un diagnóstico positivo (reducción de la mortalidad). Mediante el ensayo rápido Combi no invasivo según la invención se puede aumentar en gran medida la tasa de participación en un programa de exploración para la detección de

35 cáncer de intestino y sus precursores y, por consiguiente, alcanzar un aumento significativo de la tasa de supervivencia de pacientes (en contrapartida a voluntarios!) con cáncer de intestino, así como sus precursores. El cáncer de intestino y sus precursores, en tanto se detecten a tiempo, ofrecen una posibilidad de curación de casi del 100 % para los pacientes; diagnóstico: valores de M2-PK y/o valores de hemoglobina elevados conducen, con ayuda del historial médico, etc, a la activación de un “paquete” de medidas y a otros pasos, que conducen al diagnóstico del cáncer de intestino. El diagnóstico conduce a unas instrucciones operativas del médico, por ejemplo medidas terapéuticas quirúrgicas, y éstas conducen a su vez a la curación del cáncer de intestino, por ejemplo la terapia

40 mediante cirugía puede reducir la letalidad.

Como en todos los procedimientos de diagnóstico, también en el caso de ensayos in vitro las características de calidad decisivas son la denominada sensibilidad y la denominada especificidad. La sensibilidad es la probabilidad de identificar como enfermo a una persona enferma. Esta medida de calidad es especialmente importante desde el

45 punto de vista médico, ya que, en una intervención de detección precoz, naturalmente se deben pasar por alto la menor cantidad posible de personas enfermas. La especificidad es la probabilidad de identificar como sana a una persona sana. También esta medida es significativa en la detección precoz, ya que se debe evitar que las personas sanas que se diagnostican erróneamente como enfermas reciban un tratamiento innecesario.

Estado de la técnica

Prueba de guayaco (gFOBT) (material de muestra: heces)

50 Esta prueba fecal funciona a base de la resina de guayaco. Mediante una reacción química redox se identifican cantidades de sangre enmascaradas (ocultas) en las muestras fecales de los pacientes. Ya que la base de este ensayo químico es un potencial redox, y este potencial redox se interfiere mediante agentes oxidantes y agentes reductores, se producen interferencias del ensayo y una menor sensibilidad y especificidad. Los agentes oxidantes y los agentes reductores están contenidos en la nutrición. Por lo tanto, esta prueba posee una baja sensibilidad y

55 especificidad y, por consiguiente, se considera obsoleto y anticuado. Además, se pueden identificar solo formas fuertemente sangrantes, pero no ligeramente sangrantes de cáncer de intestino o sus precursores. Además se sabe

que existen formas de cáncer de intestino y sus precursores sangrantes, no sangrantes, y sangrantes de manera intermitente. Por consiguiente, según momento de la toma de muestras, se pueden pasar por el cáncer de intestino y sus precursores.

Prueba fecal inmunológica (iFOBT) (material de muestra: heces)

5 Los ensayos in vitro inmunológicos localizaban igualmente sangre oculta, que llega a las heces mediante los precursores (pólipos) o estados precoces. La identificación se efectúa mediante el empleo de anticuerpos específicos contra hemoglobina, o bien contra el complejo hemoglobina/heptoglobina. Más de 10 fabricantes/distribuidores ofrecen estos ensayos iFOB. No obstante, los ensayos ofrecidos en el mercado presentan diferencias de calidad extremas (según sensibilidad y especificidad), éstas diferencias las pueden identificar solo especialistas, pero no, como se desea, el gran número de médicos establecidos (usuarios).

15 Por lo demás, cabe mencionar que estas denominadas pruebas sanguíneas en heces identifican solo indirectamente cáncer de intestino y sus precursores, ya que éstos no son específicos para cáncer y sus precursores, sino sólo para la identificación de sangre (inespecíficos para cáncer de intestino). Estos ensayos, así como las pruebas de guayaco clásicas (gFOBT), pueden identificar solo formas sangrantes de cáncer de intestino o sus precursores. Además, es sabido que existen formas de cáncer de intestino y sus precursores sangrantes, no sangrantes y sangrantes de manera intermitente. Por consiguiente, según momento de la medida se pueden pasar por alto cáncer de intestino y sus precursores. Con el gFOBT y el iFOBT se pueden identificar solo tumores sangrantes y sus precursores. Estas pruebas “detectan” y “pasan por alto” cáncer de intestino y sus precursores.

20 General: por lo tanto, causalmente y también desde el punto de vista patofisiológico, la sangre oculta en las heces tiene que ver solo indirectamente con cáncer de intestino y sus precursores!

Prueba fecal enzimática (M2-PK) (material de muestra: heces)

25 En este caso se trata de una prueba que no puede identificar sangre oculta, sino una enzima típico de cáncer en heces. La enzima se presenta siempre en mayores cantidades en tejidos modificados de manera maligna de diversos tipos de cáncer – entre ellos también en cáncer de intestino o pólipos intestinales modificados de manera maligna. En esta prueba, que también se encuentra disponible en el mercado en el formato del ensayo de flujo lateral y ELISA, se identifica el tumor biomarcador M2-PK. El tumor M2-PK es una isoenzima especial de piruvatoquinasa (PK). En el tejido normal, la piruvatoquinasa (forma M1-, M2-PK) se presenta como forma tetramérica (tetrámero M2-PK). En el caso de cáncer y sus precursores se encuentra la forma dimérica de esta PK (dímero M2-PK = tumor M2-PK) de manera acrecentada. Contra esta molécula tumoral M2-PK especial se han generado dos anticuerpos monoclonales diferentes. Estos anticuerpos específicos para el tumor M2-PK especial se emplean en los ensayos que se encuentran en el mercado (empleados en formato ELISA y/o de flujo lateral).

35 General: causalmente y también desde el punto de vista patofisiológico, el biomarcador M2-PK tiene que ver directamente con cáncer y sus precursores. La enzima M2-PK (forma dimérica de la isoenzima M2-PK) es siempre detectable en todos los tumores investigados hasta la fecha (por ejemplo 12 tumores de diferentes tejidos/órganos), también en el caso de cáncer de intestino y sus precursores. Los análisis clínicos han dado por resultado que las pruebas para el tumor M2-PK disponibles en el mercado (en formato de flujo lateral y/o ELISA) pueden identificar cáncer de intestino y sus precursores tanto sangrantes, como también no sangrantes.

No obstante, estos ensayos (tiras de ensayo) también pueden “pasar por alto” cáncer de intestino y sus precursores. Por lo tanto, también es tarea de la presente invención ofrecer mejores ensayos para M2-PK (tiras de ensayo).

40 Solución técnica: el kit de ensayo según la invención, que comprende un ensayo rápido Combi constituido por un cassette de plástico, así como nueve tiras de ensayo, mejores según el estado de la técnica, para la determinación de M2-PK y de hemoglobina (“iFOBT”, “prueba inmunológica”, “prueba de sangre oculta”).

Prueba sanguínea (material de muestra: sangre)

45 Los tumores emiten ADN (y/o ADN metilado) en la circulación sanguínea. El cáncer de intestino deja una marca típica de este modo – un biomarcador. Este biomarcador es identificable con una prueba sanguínea. El médico extrae una muestra de sangre de voluntarios a tal efecto, y la envía a un laboratorio especial para la medida y la valoración relativamente compleja, costosa, por medio de tecnología PCR, no muy robusta para la vida cotidiana.

50 General: causalmente y también desde el punto de vista patofisiológico, una muestra de metilación de ADN, una marca, una huella típica (biomarcador SEPT9, prueba sanguínea de septina 9), tiene que ver con cáncer y sus precursores solo de manera indirecta.

Con las pruebas de M2-PK se pueden identificar tumores y sus precursores sangrantes y no sangrantes. No obstante, las pruebas de M2-PK "pasan por alto" también cáncer de intestino y sus precursores. Por lo tanto, una tarea de la presente invención es obtener una mejora. Esta tarea se resuelve mediante las reivindicaciones y la descripción técnica de la presente invención.

- 5 Un inconveniente de las pruebas para el tumor M2-PK (en formato de flujo lateral PCT/EP00/09303 y/o ELISA), así como de gFOBT y iFOBT, consiste en que ninguna de las tres pruebas, en sí mismas, cubre el intervalo de tiempo relevante para el diagnóstico total, en especial respecto al paciente.

10 Por el documento WO2007/071366A1 (Roche Diagnostics GmbH) es conocido un procedimiento en el que se determina tanto el tumor M2-PK, como también hemoglobina en heces. La determinación cuantitativa de ambos parámetros se efectúa en dos pruebas separadas, la valoración se debe efectuar a través de un algoritmo matemático. En la descripción del citado documento se cita una serie de posibles métodos, que pueden ser la base para el desarrollo de tal algoritmo (véase la página 7, línea 12 – página 9, línea 21), sin que se de a conocer de hecho un algoritmo de valoración. Por lo tanto, la enseñanza técnica del documento se refiere solo a un procedimiento de búsqueda de un algoritmo de valoración.

15 No obstante, en el estado de la técnica no se describe un planteamiento para la detección/el diagnóstico integral de todas las fases de la secuencia pólipocáncer. Por lo tanto, la tarea consistía en desarrollar una prueba para la detección de cáncer de intestino y sus precursores, que posibilitara identificar de manera fiable y completa todas las fases de la secuencia pólipocáncer detectables desde el punto de vista diagnóstico como prueba separada. La prueba debía posibilitar la determinación sincrónica de hemoglobina y tumor M2-PK.

20 El problema se soluciona mediante el procedimiento según la invención para el diagnóstico/la detección de una modificación patológica del intestino por medio de un kit de ensayo (ensayo rápido Combi) mediante la identificación específica de hemoglobina y tumor M2-PK. Con ayuda del procedimiento según la invención es posible identificar muy temprano con seguridad modificaciones patológicas ya en el caso de presencia de los analitos citados anteriormente (hemoglobina, tumor M2-PK).

25 Sorprendentemente se ha mostrado que, mediante el empleo según la invención del ensayo rápido Combi y dos nuevas tiras de ensayo mejoradas para la determinación de M2-PK y hemoglobina, así como los reactivos necesarios para la puesta en práctica sincrónica del procedimiento de detección inmunocromatográfico, se puede solucionar el problema técnico, el aumento de sensibilidad total en comparación con la aplicación de dos biomarcadores sobre dos cassettes separados o un cassette.

30 Por consiguiente, la invención se refiere en especial a un ensayo rápido Combi y a un cassette de ensayo rápido Combi y a componentes, así como a los reactivos necesarios para la puesta en práctica sincrónica de un procedimiento de detección inmunocromatográfico. No obstante, en el significado lingüístico de simultáneamente, pero también sincrónico en el significado técnico de ajuste conjunto, óptimo de pares de acción, condiciones cromatográficas (en especial para las dos nuevas tiras de ensayo) para la identificación de ambos biomarcadores tumor M2-PK y hemoglobina en un cassette de ensayo rápido Combi.

35 No obstante, esto era posible solo mediante la optimización del cassette y todos los componentes (selección de la membrana y especificación (velocidad de flujo capilar, etc.)), la selección de los denominados apoyos, la selección de detergentes y solubilizadores, materiales líquidos para esparcido frente a materiales proteicos para esparcido, especificidad de la membrana seleccionada (por ejemplo nitrocelulosa frente a nylon), la variedad de selección y especificación de almohadillas de muestras, selección y especificación de almohadillas de conjugados, selección y especificación de almohadillas absorbentes, selección y especificación de tarjeta adhesiva, selección y especificación de carcasa (cassette de plástico, cassette doble), esquemas de manufactura.

40 Las tiras de ensayo para diagnóstico in vitro basadas en el principio inmunocromatográfico son estado de la técnica desde hace tiempo. Si se considera una tira de ensayo inmunocromatográfica, mediante todas las mejoras de producto hasta el proceso final se emplean todos los principios de biología, química, física e ingenierías. Los siguientes números de patente describen una enseñanza técnica relevante a tal efecto:

Por ejemplo US 433734, US 4376110, US 4435504, US 4703017, US 4855240, US 4954452, US 5028535, US 5075078, US 95/16207, US 5654162, EP 0810436A1,

45 las cassettes de ensayo con más de una tira de ensayo (cassette de ensayo Combi) en una cassette de ensayo pertenecen al estado de la técnica (detección de drogas por medio de tira de ensayo). También estas cassettes son conocidas para la determinación del complejo hemo/heptoglobina y hemoglobina. Para la determinación sincrónica de M2-PK y hemoglobina, hasta la fecha son conocidas solo cassettes de ensayo individuales. Ambas pruebas por separado "pasan por alto" muchas modificaciones patológicas. El motivo, entre otros, consiste en el corte "mal" ajustado de la tira de ensayo y en las condiciones cromatográficas del sistema de ensayo mal seleccionadas. Un

desafío para el fabricante de un sistema de ensayo es la elección óptima de los denominados “cortes”. Este corte se puede extraer en principio del histograma de valores de medida de la población de voluntarios. El problema técnico es la diferenciación de voluntarios “sanos” y “enfermos”. Esto se resuelve técnicamente mediante el kit de ensayo y la puesta a disposición de ambas tiras de ensayo nuevas con corte mejorado, y las condiciones cromatográficas. El significado del corte se explica en un estudio de van Rossum, que mostraría la medida de hemoglobina y tumor M2-PK bajo aplicación de un corte optimizado. Es tarea de la presente invención mejorar el corte y las condiciones cromatográficas mal seleccionadas. Según la invención, esto se soluciona mediante la puesta a disposición de un kit de ensayo, una cassette de ensayo rápido Combi, que contienen dos nuevas tiras de ensayo con corte “bien” ajustado, así como las condiciones cromatográficas bien seleccionadas para la realización del ensayo rápido Combi.

Por las citas bibliográficas WO 01/21826 A2, WO 02/50546 A2 y WO 03/069343 A2 son conocidos diversos procedimientos para la detección de marcadores tumorales para tumores del tracto gastrointestinal, en los que se analizan las heces de un voluntario en relación con el marcador tumoral. Estos procedimientos han dado buen resultado en la práctica, aunque presentan aún un número elevado de resultados falso positivos y falso negativos. Esto requiere mejora.

Por otra parte, para la detección de marcadores tumorales para tumores son conocidos diversos procedimientos, que se basan en una detección de marcadores tumorales en sangre, o bien suero (véase, por ejemplo, Anticancer Research 19:2785-2820 (1999); WO 03/065003 A2; Leman ES et al., Cancer Res. 67(12):5600-5605 (2007) y Leman ES et al., Clinical Cancer Research 14:1349-1354 (2008)). Mientras que esto era ventajoso por una parte para diagnosticar una enfermedad tumoral en general, por otra parte la detección de un biomarcador para las más diversas enfermedades tumorales no permite una afirmación segura sobre el tipo y la localización del órgano o tejido afectado, ya que los marcadores tumorales son realmente específicos para los tejidos en los casos menos frecuentes y, por consiguiente, no es posible una conclusión segura sobre el tejido afectado en el caso de un resultado positivo de un análisis de sangre respecto al marcador tumoral. Por lo tanto, adicionalmente son necesarios métodos de diagnóstico costosos y complicados para verificar de manera segura el tipo de tumor presente de hecho. Por lo tanto, marcadores en sangre, plasma o suero se emplean principalmente para el control terapéutico y de desarrollo de tumores.

Además, este procedimiento de detección presupone que los marcadores tumorales formados en el tumor llegan al torrente sanguíneo, o bien al suero. En el estado temprano de la carcinogénesis, en especial en el caso de cáncer, aún no llegan cantidades suficientes de estos marcadores tumorales al torrente sanguíneo, de modo que no es posible una detección a través de análisis de sangre, o bien suero.

#### Detección sincrónica de biomarcadores

Además, para la detección sincrónica, precisa, de ambos biomarcadores según la invención (M2-PK y hemoglobina) se requiere adicionalmente la solución técnica para el ajuste común de la determinación (de la detección fiable = sin sobrepasar el intervalo de confianza estadístico) de ambos biomarcadores en una cassette de ensayo. Es decir, las condiciones cromatográficas comunes.

Véase la Figura 1 a la Figura 6

Esto se consigue mediante selección del ajuste común, óptimo, de las condiciones cromatográficas para la identificación de ambos biomarcadores M2-PK y hemoglobina en un cassette de ensayo rápido Combi en el sentido de una selección de parámetros inventiva.

En especial mediante la optimización del cassette y sus componentes (selección de la membrana y especificación, velocidad de flujo capilar, etc.), la selección de detergentes y solubilizadores, materiales líquidos para esparcido frente a materiales proteicos para esparcido, especificidad de la membrana seleccionada (por ejemplo nitrocelulosa frente a nylon), la variedad de selección y especificación de almohadillas de muestras, selección y especificación de almohadillas de conjugados, selección y especificación de almohadillas absorbentes, selección y especificación de tarjeta adhesiva, selección y especificación de carcasa, esquemas de manufactura.

La producción de este cassette Combi con dos campos de ensayo (empleo de membranas de nitrocelulosa) se efectúa según la directriz IVD de diagnóstico in vitro 98/78/EG y según la norma ISO 13485 y la gestión de calidad QM ISO 9001.

Problema técnico: mala sensibilidad y especificidad clínica debida a procedimientos de exploración aplicados (gFOBT, iFOBT, tumor M2-PK, colonoscopia de exploración).

Tarea de la invención: mejora de la sensibilidad (valor predictivo positivo) y especificidad clínica (valor predictivo negativo), en especial de la sensibilidad.

Solución técnica: empleo del cassette de ensayo Combi según la invención, con el cual se obtienen mejoras esenciales (aumento de la sensibilidad total) frente al empleo de dos cassettes de ensayo (eventualmente de dos fabricantes diferentes). Según el estado de la técnica, en el mercado existe un ensayo de flujo lateral (ensayo rápido ScheBo M2-PK Quick Test) para llevar de manera orientada voluntarios asintomáticos a la colonoscopia.

5 Problema técnico: mejora de la sensibilidad y la especificidad.

Solución técnica: empleo del cassette de ensayo Combi según la invención, que posibilita la determinación inmunoquímica sincrónica de biomarcadores sangre oculta y tumor M2-PK.

10 El cassette de ensayo Combi según la invención comprende dos tiras de ensayo de flujo lateral. Ambas tiras de ensayo no corresponden al estado de la técnica, sino que representan respectivamente procedimientos de ensayo de flujo lateral mejores según la invención. Es decir, en la forma preferente de realización según la invención, en el cassette de ensayo Combi se encuentra una prueba de tumor M2-PK optimizada = ensayo M2-PK plus y un ensayo iFOB mejor según el estado de la técnica = ensayo iFOBplus.

15 La detección sincrónica (en sentido técnico) de los biomarcadores tumor M2-PK y hemoglobina con cortes ajustados en un cassette Combi (un kit de ensayo con todos los reactivos y componentes necesarios para la puesta en práctica del ensayo) presenta ventajas frente a la modificación aplazada temporalmente (determinación) de ambos biomarcadores (tumor M2-PK y hemoglobina) por medio de dos cassettes de flujo lateral (dos kits de ensayo con dos composiciones diferentes de reactivos y componentes para la puesta en práctica del ensayo), ya que los anticuerpos en fase sólida/fase líquida especiales, así como todos los reactivos y componentes necesarios del kit de ensayo Combi, están ajustados entre sí. Ejemplo: si un usuario comprara el ensayo de flujo lateral ScheBo para la determinación del tumor M2-PK y otro ensayo de flujo lateral para la determinación de hemoglobina de otro fabricante, y lo ejecutara con desfase de tiempo, el mismo obtendría una peor sensibilidad y especificidad clínica por medio de estos dos ensayos diferentes, y no ajustados entre sí.

Tareas y soluciones técnicas de la invención:

- 25 1. Reducción de gastos sanitarios mediante una dirección selectiva a la colonoscopia.
2. Puesta a disposición de un “diagnóstico de entrada” selectivo, sencillo, manejable, para la detección temprana de cáncer de intestino.
- 30 3. Mejora del pronóstico de una enfermedad cancerosa individual mediante detección precoz por medio de puesta a disposición del cassette de ensayo rápido Combi según la invención para la determinación sincrónica del tumor M2-PK y la determinación iFOB para la selección optimizada de tales individuos (voluntarios), que requieren un diagnóstico de entrada mediante colonoscopia. El problema técnico de selección previa para la colonoscopia se puede solucionar con el cassette de ensayo rápido Combi según la invención. Solo los voluntarios que recibieron un diagnóstico positivo en la medida de uno de los analitos (prueba de tumor M2-PK y/o iFOB) en el resultado de ensayo se conducen selectivamente a la colonoscopia. El cassette de ensayo rápido Combi según la invención actúa como “filtro” doble en el proceso de selección desde el punto de vista técnico.
- 35 4. Puesta a disposición de un cassette de ensayo doble de flujo lateral según la invención y todos los reactivos correspondientes, anticuerpos especiales (anti-tumor M2-PK (epítipo especial), anti-hemoglobina (epítipo especial), que poseen propiedades físico-químicas especiales, por ejemplo constante de formación especial y características cinéticas especiales. Además, los anticuerpos en fase sólida y en fase líquida seleccionados, que están orientados a ambos analitos diferentes, por ejemplo en el procedimiento de medida de flujo lateral, poseen propiedades especiales (por ejemplo compatibilidad con fibra de vidrio, membrana de nitrocelulosa, buenas propiedades de acoplamiento, por ejemplo, en coloide de oro).
- 40 5. Empleo de anticuerpos especiales en el ensayo rápido Combi, que son específicos en su propiedad de enlace tanto para el tumor M2-PK, como también para hemoglobina, y son empleables en procedimientos inmunocromatográficos (por ejemplo “aptos para membrana”, “aptos para detergente”).
- 45 6. Reducción de la letalidad del cáncer de intestino mediante la puesta a disposición según la invención de un ensayo rápido Combi para la dirección selectiva al método invasivo – colonoscopia – y con ello la preparación selectiva (según medidas “diagnósticas” – árbol de decisiones/matriz de decisiones) para un procedimiento terapéutico (cirugía, quimioterapia).
- 50 7. Optimización de costes/beneficios de las medidas de exploración respecto a la detección de cáncer de intestino y sus precursores.

Por la referencia bibliográfica WO 01/21826 es sabido que el tumor M2-PK se puede identificar en una tira de ensayo por medio de un procedimiento cromatográfico. A modo de ejemplo, en esta prueba se puede emplear una tira de ensayo (nitrocelulosa), en la que están dispuestos los anticuerpos necesarios en forma soluble, o bien fijados en fase sólida, en diferentes zonas. La muestra (por ejemplo extracto fecal, una mezcla de muchas sustancias, pero también los analitos a identificar en la disolución de detergente), o bien la proporción de líquido de la muestra o un extracto, pueden atravesar la tira de ensayo y proporcionar una señal en el punto de detección si está presente, por

ejemplo, el tumor M2-PK y/o hemoglobina en la muestra. El empleo según la invención de anticuerpos de captura altamente específicos asegura el enlace de proteínas objetivo (por ejemplo tumor M2-PK) del extracto fecal. Mediante el empleo de coloides de oro en los que se encuentra un segundo anticuerpo altamente específico, en presencia, por ejemplo, de tumor M2-PK se forma un inmunocomplejo. Este complejo de detección de analito es visible como línea en la tira de ensayo a simple vista. La disposición exacta de los componentes aislados en una tira de ensayo es dependiente del procedimiento inmunológico aplicado y conocida por el especialista. Un desafío especial es el empleo de los anticuerpos óptimos. En el caso del ensayo rápido Combi según la invención se emplearon anticuerpos especiales, que enlazan especialmente el tumor M2-PK.

El anticuerpo específico para el tumor M2-PK se enlaza (también de manera estereoespecífica la forma dimérica de M2-PK) preferentemente a uno de los siguientes epítomos o fragmentos del mismo, que tienen al menos una longitud de 4 aminoácidos:

LAPITSDP	EAEAAIYH
VEASFKCC	SGAIIVLT
CSGAIIVLT	LQLFEE
TEATAVGA	QLFEELRR
LRRLAPITSDPTEATA	VEASFKC
KCCSGAIIV	KSGRSAHG

La presencia de uno de estos epítomos o fragmentos de éstos, que tienen al menos una longitud de 4 aminoácidos, o combinaciones de los mismos en un extracto fecal, es un indicio de modificaciones patológicas (cáncer de intestino o sus precursores) en el tracto gastrointestinal.

Las denominadas pruebas de sangre en heces (gFOBT) muestran una sensibilidad insuficiente de únicamente un 25 % para la detección de cáncer de intestino. La prueba de tumor M2-PK Test muestra una sensibilidad más elevada frente a ésta, de un 80 %. Con la prueba de tumor M2-PK se pueden identificar pólipos de más de 1 cm con una sensibilidad de un 60 % (FOBT: 20 %), pólipos menores que 1 cm con una sensibilidad de un 20 % (FOBT: 0 %) (todos los valores con una especificidad de un 95 %).

Generalmente, las pruebas de sangre en heces inmunocromatográficas muestran una sensibilidad más elevada para cáncer de intestino y sus precursores que los gFOBTs utilizados normalmente, por lo tanto, los gFOBTs son inferiores a los iFOBTs en su poder informativo.

Las tasas positivas, así como la especificidad y la sensibilidad bajo estos ensayos, varían en gran medida. Las muestras observadas sugieren que las diferentes tasas positivas se basan en diversos niveles de corte, distintos intervalos límite y valores límite de la prueba de diferentes fabricantes de diversos países. También es diferente la calidad de producción de la prueba de distintos fabricantes.

Los kits de ensayo de diferentes fabricantes adaptan diferentes cortes (= límite de tolerancia designa un valor de tolerancia). El valor de tolerancia establece a partir de qué momento un resultado de ensayo se debe valorar como positivo, o bien negativo. El corte se debe diferenciar del concepto de límite de identificación.

Lit: Inter-test agreement and quantitative crossvalidation of immunochromatographical fecal occult blood tests, Hermann Brenner et al.; Int. J. Cancer (2010).

Una consecuencia de ello es una fuerte variación a observar en las características de ensayo de diversas pruebas (problema técnico). A partir de esto, en la literatura científica se solicita disponer mejores kits de ensayo y encontrar y aplicar en este caso cortes optimizados (H. Brenner, S. Tao, European Journal of Cancer (2013)).

Otros estudios corroboran la elevada variabilidad de kits de ensayo, que se encuentran disponibles en el mercado (Brenner et al, Int. J. Cancer, 2010). De ello resulta una elevada demanda por parte del mundo técnico de un kit de

ensayo que sea apto para mostrar el tumor M2-PK y hemoglobina en muestras fecales bajo empleo de un corte, que garantice una eficiencia diagnóstica lo más elevada posible.

Este problema técnico se soluciona mediante la puesta a disposición del kit de ensayo que contiene el cassette Combi, que comprende dos tiras de ensayo mejoradas según el estado de la técnica. Mediante costosas medidas internas de la firma se encuentran y se determinan niveles de corte, intervalos límite y valores límite para ambos biomarcadores. La determinación se efectuó mediante análisis estadístico descriptivo e interpretación de histogramas de valores de biomarcadores (análisis Box-Plot y cálculos de Kruskal-Wallis). La producción de ambas tiras de ensayo, así como el ajuste de las condiciones cromatográficas para la determinación sincrónica de ambos biomarcadores para la consecución de mejores sensibilidades y especificidades clínicas, constituye un gran desafío. Éste se solucionó técnicamente mediante el ajuste de todas las condiciones químicas y físicas (véase reivindicaciones y ejemplos). De este modo se seleccionaron todas las condiciones para la determinación de ambos biomarcadores de modo que se produjeran la menor cantidad posible de resultados “falso positivos”, o bien “falso negativos” en la puesta en práctica del ensayo Combi, para aumentar claramente de este modo la eficiencia diagnóstica, que indica la relación de todos los resultados de ensayo positivos correctos y negativos correctos con la totalidad de resultados. Para la consecución de este objetivo se buscó y se encontró una solución técnica. Para la solución técnica resultó la detección sincrónica en sentido técnico de ambos biomarcadores bajo condiciones cromatográficas ajustadas y materiales ajustadas, es decir, la selección correcta de la membrana, condiciones operativas, etc. (véase ejemplos y reivindicaciones).

Los marcadores tumorales son productos génicos que se expresan en tejidos tumorales de manera diferenciada frente a tejidos comparativos normales, es decir, un marcador tumoral se sobre- o subexpone en tejido tumoral frente al tejido normal. Para la práctica son importantes marcadores tumorales que se sobreexpresan, ya que entonces un resultado analítico positivo (presencia de biomarcadores) de una muestra es indicio de la presencia del tumor específico del biomarcador. Los marcadores tumorales se presentan en el citoplasma de células de tejido, pero también pueden estar presentes en líquidos corporales, como sangre, orina, sudor, esperma, saliva, etc, aunque también en heces.

Un marcador tumoral debía tener las siguientes propiedades: i) alta especificidad, es decir, no identificable en enfermedades benignas y personas sanas, ii) alta sensibilidad, es decir, se puede identificar en un porcentaje elevado de pacientes con tumores, iii) especificidad respecto al órgano, iv) buena correlación con los estados tumorales, o bien la masa tumoral, v) relación con el pronóstico y vi) valores predictivos fiables. Los criterios de especificidad del 100 % y de sensibilidad del 100 %, así como los demás criterios indicados, no se cumplen por ninguno de los marcadores tumorales conocidos hasta la fecha.

Entre otros, los marcadores tumorales específicos para tumores del tracto gastrointestinal comprenden CCSA-2, CCSA-3, CCSA-4, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6a, CC6b, L1, L2, N1, N2, N3, N4, N5, y N6 (véase, por ejemplo, el documento WO 03/065003 A2; Leman ES et al., Cancer Res. 67(12):5600-5605 (2007) y Leman ES et al., Clinical Cancer Research 14:1349-1354 (2008)). No obstante, en el estado de la técnica, estos marcadores tumorales se emplean solo en el ámbito de análisis de sangre, o bien plasma, lo que lleva a los inconvenientes citados anteriormente.

Es deseable poder detectar lo más precozmente posible un episodio tumoral en el tracto gastrointestinal, en especial en una fase de crecimiento, en la que el tumor aún no ha tomado contacto con el sistema vascular del cuerpo (a modo de ejemplo ya en la “secuencia pólipo-cáncer”, es decir, temporalmente antes de la infiltración de la submucosa). En caso de sospecha de un episodio neoplásico en el tracto gastrointestinal, especialmente respecto a la denominada secuencia adenoma-carcinoma en pólipos, según el estado de la técnica se intenta identificar sangre oculta en heces por medio de diversos métodos de determinación. A tal efecto se emplean pruebas no inmunológicas (por ejemplo actividad de pseudoperoxidasa, detección de porfirina) y pruebas inmunológicas (Favenne L. et al. (1992) Ann. Biol. Clin. 50 : 311-313).

No obstante, ambos principios de ensayo no son muy específicos. Además, se puede interferir en la prueba no inmunológica basada en una reacción redox (principio de ensayo) a través de un gran número de magnitudes de influencia (falso positivo/falso negativo), por ejemplo debido al incumplimiento de prescripciones de dieta estrictamente necesarias por parte del paciente y por una serie de medicamentos, así como a causa de una administración excesiva de vitamina C (por ejemplo en verdura, zumos de fruta, etc.), Thomas L., Labor und Diagnose, 5. Auflage, 1998).

Una prueba positiva de sangre oculta en heces se debe clarificar de este modo hasta que se ha localizado la fuente de sangrado, o bien se ha encontrado la causa del sangrado. El diagnóstico clínico justifica en cualquier caso un diagnóstico ulterior a realizar rápidamente (“diagnóstico de exclusión”), por ejemplo mediante endoscopia, sonografía, rayos X.

Problema técnico de la invención

El ensayo de flujo lateral M2-PK existente según el estado de la técnica (tiras de ensayo) pasa por alto modificaciones patológicas. La tira de ensayo M2-PK plus según la invención también pasa por alto modificaciones patológicas. El iFOBT existente según la invención pasa por alto modificaciones patológicas. La tira de ensayo iFOBT plus según la invención pasa por alto modificaciones patológicas. Si se reúnen ambas pruebas mejoradas M2-PK plus e iFOBT plus como tiras de ensayo según la invención en un cassette Combi, se obtiene una tasa de detección más elevada para modificaciones patológicas en el intestino conforme a la tarea de la invención. Las soluciones técnicas de problemas, en especial la selección de pares de acción (véase ejemplos y lista de componentes según la invención y componentes activos, la selección correcta de anticuerpos y la selección correcta de cortes para ambos parámetros, la sensibilidad analítica, las velocidades de flujo capilares, etc.) para la detección sincrónica de ambos biomarcadores son objeto de esta selección inventiva de parámetros de la invención.

Por lo tanto, la invención toma como base el problema técnico de indicar un kit de ensayo de estructura simple (ensayo rápido Combi), que sirve como procedimiento para la identificación de marcadores, biomarcadores, en especial biomarcadores enzimáticos en heces humanas o animales, siendo apropiado el procedimiento para la detección de un episodio maligno en el tracto gastrointestinal y en la cavidad abdominal (esófago, estómago, intestino delgado, conductos biliares, páncreas e intestino grueso), en especial de tumores y precursores de tumores del intestino (pólipos, adenomas). El kit de ensayo Combi según la invención (ensayo rápido Combi) debe posibilitar en este caso la detección de modificaciones patológicas de manera sencilla, de modo que el ensayo se pueda llevar a cabo por personal técnico. La invención toma como base en especial el problema técnico de satisfacer la demanda asimismo creciente de procedimientos específicos, fácilmente realizables, de modo que se pueda detectar en una fase especialmente temprana y de manera inequívoca un episodio patológico, en especial un episodio neoplástico, especialmente respecto a la problemática de la denominada secuencia adenoma-carcinoma en el caso de pólipos.

#### Aspectos fundamentales de la invención y formas de realización preferentes

Para la solución de este problema técnico, la invención enseña un kit de ensayo (ensayo rápido Combi) para la detección de biomarcadores en heces humanas, constituido por un primer tubo de ensayo, que contiene un primer dispositivo de extracción de muestras fecales para la recogida de la cantidad de heces necesaria, una primera disolución tampón que contiene tampón Hepes 10-70 mM con valor de pH 7,6-8,2, un segundo tubo de ensayo, que contiene un segundo dispositivo para la toma de muestras fecales para la recogida de la cantidad de heces necesaria, una segunda disolución tampón que contiene tampón acetato 10-70 mM con valor de pH 5-6, un cassette de ensayo que contiene un sistema de ensayo de flujo lateral con una membrana de nitrocelulosa almacenada de uno a seis meses como fase estacionaria, la membrana de nitrocelulosa que contiene anticuerpo tumoral monoclonal M2-PK de ratón, esto es, el clon PATAM3AT, IgG1 y anticuerpo de ratón monoclonal acoplado a oro, esto es, el clon 1 E3, IgG1, y anticuerpo de hemoglobina monoclonal de ratón, esto es, el clon M1202100, IgG1, y anticuerpo de ratón monoclonal acoplado a oro, esto es, el clon HB11-2312, un primer orificio para la toma de una muestra fecal del primer tubo de ensayo, un segundo orificio para la toma de una muestra fecal del segundo tubo de ensayo, siendo positivo el resultado de análisis de la primera muestra fecal si el contenido en tumor M2-PK es mayor que  $4 \pm 1$  unidades/ml de extracto fecal, y siendo positivo el resultado de análisis de la segunda muestra fecal si el contenido en hemoglobina sobrepasa 24  $\mu\text{g}$  de hemoglobina por gramo de heces. El kit de ensayo se emplea para el diagnóstico in vitro de una modificación patológica del intestino. El procedimiento según la invención para el diagnóstico in vitro de un episodio maligno en el tracto gastrointestinal bajo empleo del kit de ensayo está caracterizado por la extracción de dos muestras fecales por medio de dos dispositivos de extracción para la recogida de la cantidad de heces necesaria en cada caso, la disgregación de la primera muestra fecal en la primera disolución tampón, la disgregación de la segunda muestra fecal en la segunda disolución tampón, la aplicación de la primera y la segunda disolución tampón que contiene heces en el orificio asignado en cada caso, el cumplimiento del tiempo de espera prescrito, la lectura de resultados en los respectivos orificios de lectura. El kit de ensayo se puede emplear para la identificación de un episodio patológico en el tracto gastrointestinal, aplicándose una muestra de heces humanas, disuelta en un tampón de extracción especial, sobre un soporte, y detectándose en el mismo tanto el tumor M2-PK, como también hemoglobina, sobre un soporte. En este caso, la lectura se efectúa de manera sencilla visualmente a simple vista (sin ayuda de un aparato). En una forma preferente de realización de la invención se determina hemoglobina en forma de complejo hemoglobina-heptoglobina (Hb-Hp). Se verificó que la medida de los biomarcadores citados anteriormente es apropiada en especial para la detección de modificaciones malignas tempranas, en especial neoplasmas. Mediante la medida de esta combinación de biomarcadores tumor M2-PK más hemoglobina; tumor M2-PK más complejo hemoglobina-heptoglobina (Hb-Hp) se produce una clara mejora de la exactitud de información (diagnóstico), en especial un descenso significativo de diagnósticos falso negativos, pero también falso positivos.

Esto es especialmente sorprendente, ya que las investigaciones exhaustivas respecto a otros analitos específicos (proteínas) en heces no dan ningún indicio sobre su aplicación como biomarcadores, en especial como marcadores tumorales. Aparentemente, ni la estructura ni tampoco las propiedades fisicoquímicas de los citados marcadores tumorales son perjudicadas de manera constante debido a la considerable actividad proteolítica y las particularidades fisiológicas extremas (por ejemplo valor de pH, ácido en el estómago, alcalino en el intestino) del tracto gastrointestinal. Esto se considera también para la detección de biomarcadores por medio de métodos inmunológicos. Por lo tanto, se determinó y se mostró que, a pesar de la desnaturalización de proteínas y la

digestión de proteínas citadas anteriormente, en el tracto gastrointestinal se puede llevar a cabo una detección específica de varios biomarcadores enzimáticos en las heces de pacientes con tumores.

Los sistemas necesarios para la determinación de biomarcadores enzimáticos no se encuentran disponibles comercialmente sin más. Para el desarrollo del ensayo rápido Combi según la invención se debían adaptar de manera muy costosa tanto los límites de detección, como también la composición de reactivos (según la invención; anticuerpos especiales para la fase líquida y para la fase sólida para ambos analitos optimizados para la medida sincrónica de analitos) y disoluciones tampón, detergentes, etc. De este modo, en el caso de una muestra fecal positiva en M2-PK y/o hemoglobina se muestra inmediatamente un indicio de un episodio patológico, posiblemente neoplástico, en especial maligno, en el tracto gastrointestinal, es decir, en especial en el intestino, el esófago, en el estómago, en los conductos biliares, en el páncreas y/o en el intestino grueso, y se posibilita, por lo tanto, una localización del episodio en el tracto gastrointestinal.

Se remite a que una muestra fecal no se puede considerar una muestra de "líquido corporal", ya que el tracto gastrointestinal total se encuentra fuera del cuerpo desde el punto de vista biológico.

Con el procedimiento según la invención, ahora es posible detectar un episodio tumoral maligno en heces en un procedimiento no invasivo de manera sencilla, mediante determinación de varias de las citadas proteínas de marcadores tumorales, y simultáneamente poder determinar de manera inequívoca que un tumor se encuentra en el tracto gastrointestinal y no en otro punto del cuerpo, en el caso de control de ensayo positivo.

Con este procedimiento se consigue no solo la generación de un diagnóstico de "primera sospecha", "diagnóstico principal", sino que también se puede efectuar un seguimiento. Debido a la distribución de proteínas individual es posible un diagnóstico individual.

Sorprendentemente, con el ensayo rápido Combi según la invención es posible detectar dichos biomarcadores enzimáticos como proteínas libres en las heces. Esto es ventajoso también debido a que la puesta en práctica del ensayo se puede efectuar mediante personal asistente, a modo de ejemplo un trabajador médico-técnico (MTA). Determinándose ambos analitos (tumor M2-PK y hemoglobina) de manera sincrónica, se evitan en especial errores de lectura (a modo de ejemplo de MTA), ya que para la puesta en práctica del ensayo se aplican ambas gotas de muestra de un paciente de manera sucesiva (naturalmente con algunos segundos de retraso), y una vez transcurrido un cierto intervalo de tiempo de algunos minutos se leen ambos resultados. Mediante este procedimiento se consigue no solo una comodidad más elevada de la puesta en práctica del ensayo, sino también una reducción de fuentes de errores (en comparación con ensayos convencionales).

Para el ensayo según la invención no es necesario un aislamiento de células de las heces ni el análisis de proteínas contenidas en las células. Se descubrió que los tumores sólidos desprenden los citados biomarcadores enzimáticos como proteínas solubles en el lumen del tracto gastrointestinal, y estos biomarcadores no se encuentran en células epiteliales gastrointestinales estratificadas. Dichos biomarcadores enzimáticos se liberan por células tumorales, atraviesan el tracto gastrointestinal como proteína, y finalmente se pueden detectar como proteína en las heces. Esta posibilidad, esto es, que estas proteínas sigan siendo detectables en heces, por ejemplo, tras el paso por el estómago, o bien el intestino, no era de esperar, ya que normalmente habría sido de esperar una descomposición sensible de las proteínas en cuestión en el transcurso del proceso de digestión normal. En el ámbito de la invención se determinó que dichos biomarcadores enzimáticos siguen siendo detectables cuantitativamente incluso en el caso de muestras fecales homogeneizadas, almacenadas durante más tiempo (por ejemplo en el caso de envío de muestras). También en el caso de fuerte dilución de heces se obtiene una clara reacción. Además, la detección se puede efectuar selectivamente también sin extracción previa en la muestra fecal. No obstante, es preferente emplear un procedimiento de extracción, a modo de ejemplo, bajo empleo de un detergente especial (por ejemplo CHAPS) (el procedimiento de extracción se explica más detalladamente en el ejemplo 2).

En el procedimiento según la invención se determina preferentemente el episodio maligno en el tracto gastrointestinal de una persona. Además, los marcadores tumorales se detectan por vía inmunoquímica por medio de anticuerpos monoclonales, que no presentan reactividad cruzada con otros componentes de las heces, en especial con otras proteínas fecales. Fragmentos en el sentido de la invención son proteínas o polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia parcial de uno de dichos marcadores tumorales. La longitud de un fragmento puede ascender a 5 aa (aa = aminoácidos) hasta n-1 aa (n = longitud del marcador tumoral del que procede el fragmento). La longitud ascenderá típicamente a más de 10 aa. Los anticuerpos empleables según la invención se pueden obtener según procedimientos conocidos según el estado de la técnica. Para el especialista son bien conocidos los procedimientos para la obtención de anticuerpos monoclonales específicos. A modo de ejemplo, a tal efecto se emplea el antígeno, es decir, en el presente caso un marcador bioenzimático, para la generación de anticuerpos. En principio, a tal efecto se puede aplicar el procedimiento que se describió en primer lugar por Koehler y Milstein, conociendo el especialista también variaciones y perfeccionamientos de este procedimiento. Con esta producción se pueden obtener anticuerpos específicos, pudiéndose determinar la especificidad mediante selección. La selección se efectúa sobre anticuerpos específicos, que se enlazan a un

biomarcador enzimático, pero no a otras proteínas fecales. Como se ha descrito, la detección se efectúa según el principio de inmunoensayo. Un inmunoensayo se efectúa de modo que a) se pone en contacto la muestra con al menos dos receptores diferentes, de los cuales el primer receptor R1 se presenta en fase sólida y es apto para enlace con el marcador tumoral, y el segundo receptor R2 se presenta en fase líquida y es igualmente apto para enlace con el mismo biomarcador enzimático, portando el receptor R2 una marca o aportando el mismo el enlace a una molécula detectable, b) se separa la fase sólida de la fase líquida, y c) se determina la marca o la molécula detectable en una de las fases, preferentemente en la fase sólida, y se cuantifica correspondientemente la cantidad de biomarcadores enzimáticos presentes en la muestra, empleándose como al menos uno de los receptores R1 o R2 un anticuerpo que es apto para enlace específicamente con el tumor M2-PK, y se enlaza en especial a otra proteína fecal. Se emplea como receptor R1, como también a modo de receptor R2, un anticuerpo contra el tumor M2-PK. Según la invención, se entiende por tumor M2-PK la forma dimérica de este biomarcador enzimático, que se diferencia de la forma tetramérica. La determinación de hemoglobina se efectúa según el principio de ensayo representado anteriormente para el tumor M2-PK. Además de la puesta en práctica del procedimiento en forma de un inmunoensayo, y en especial de un ELISA, también se pueden emplear otras tecnologías de detección, por ejemplo la tecnología de cristal piezoeléctrico, la tecnología de micropesada, la tecnología de flujo lateral, la tecnología de candelabro, la tecnología TRACE, o la tecnología de electroquimioluminiscencia, pero también la aglutinación con micro- o nanopartículas (medida mediante nefelometría), así como tecnologías multiplex en la fase líquida o sólida, o tecnologías matriciales, como por ejemplo por medio de chips proteicos. Estas tecnologías son bastante familiares para el especialista y, por lo tanto, no requieren explicación más detallada en este caso. Según la invención se emplea la tecnología de flujo lateral. Por lo tanto, es objeto de la presente invención un ensayo rápido Combi para la detección y/o para el diagnóstico tentativo de un episodio tumoral maligno en el tracto gastrointestinal en personas, que está previsto en especial para la puesta en práctica del procedimiento descrito anteriormente, por medio de determinación de una combinación de biomarcadores enzimáticos, determinando el ensayo rápido Combi el tumor M2-PK y hemoglobina o hemoglobina/heptoglobina de manera sincrónica. El ensayo rápido Combi contiene un anticuerpo para tumor M2-PK, que no presenta reactividad cruzada con otra proteína fecal, y un anticuerpo que identifica específicamente hemoglobina/heptoglobina y no presenta reactividad cruzada con otra proteína fecal. El kit de ensayo puede contener, en caso dado, otros reactivos necesarios para la puesta en práctica de un inmunoensayo o para la puesta en práctica del procedimiento de ensayo previsto en cada caso. El kit de ensayo contiene anticuerpo enlazado a una fase sólida, específico para al menos uno de los citados biomarcadores enzimáticos. Se describen anticuerpos, en especial anticuerpos monoclonales, que enlazan específicamente uno de dichos biomarcadores enzimáticos y preferentemente no presentan reactividad cruzada con ninguna otra proteína fecal. Los anticuerpos se pueden generar, a modo de ejemplo, según el método de Koehler y Milstein (Nature 256,495-497 (1995)).

Además se describen aptámeros o especulómeros y su empleo en lugar de los anticuerpos descritos anteriormente (se consideran análogamente todas las explicaciones referidas a anticuerpos), que se enlazan específicamente a uno de dichos biomarcadores enzimáticos, y no presentan reactividad cruzada opcionalmente con ninguna otra proteína fecal. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos que presentan propiedades enlazantes específicas. Tales aptámeros se pueden obtener, o bien identificar, según los métodos descritos en el documento US 5,270, 163 o en Sumedha, Clin. Chem. 45 (1999), 1628-1650. Los especulómeros son aptámeros que se forman a partir de L-oligonucleótidos.

La valoración de los ensayos según la invención se efectúa bajo utilización de la clasificación automática, análisis de agrupaciones, identificación de muestras. En especial se aplican procedimientos de "método de probabilidad máxima", o bien de pertenencia a agrupaciones a través de distribuciones de probabilidad.

Para el personal de laboratorio y el médico tratante, el resultado se presenta preferentemente en forma de una reproducción multicolor (semáforo de peligro), matriz de resolución y otros algoritmos para la toma de decisiones.

A modo de ejemplo, los parámetros medidos (M2-PK y hemoglobina) se pueden asignar de la siguiente manera:

	M2-PK	Hb	Significado
Grado 1 (verde)	-	-	Se puede excluir cáncer de intestino con seguridad de > 97 %
Grado 2 (amarillo)	-	+	Se ofrece evaluación adicional (por ejemplo colonoscopia)
Grado 3 (naranja)	+	-	Se ofrece evaluación adicional (por ejemplo colonoscopia)
Grado 4 (rojo)	+	+	Probabilidad del 90% de neoplasias avanzadas

En cualquier caso, un kit de ensayo según la invención contiene un dispositivo de extracción de muestras para heces. A tal efecto entran en consideración dispositivos comunes aceptados, a modo de ejemplos los dispositivos descritos en el documento DE 102 05 709 A1. Un desafío especial para la consecución del principio de función óptimo era la selección de pares de acción óptimos. Estos pares de acción se indican en los siguientes ejemplos, listas y reivindicaciones, y en especial en las figuras 1-6. Por ejemplo, las figuras 2, 3, 4 y 6 representan diferentes funciones. Un reto especial de esta invención era especialmente seleccionar los pares de acción óptimos para la consecución del principio de función óptimo (selección de parámetros) entre las muchas funciones diferentes (posibilidades de combinación). A modo de ejemplo, la valoración tiene lugar automáticamente. A modo de ejemplo, el kit de ensayo según la invención se puede fotografiar, y el resultado de la prueba se puede asignar al correspondiente grado de riesgo a través de un programa de valoración. Se describen tales dispositivos para fotografiar el kit de ensayo, así como los programas de valoración para la representación del resultado de la prueba, preferentemente en forma de una reproducción multicolor (semáforo de peligro). La asignación se representa en la figura 10 de manera ejemplar.

#### Ejemplos

##### 15 Ejemplo 1: kit de ensayo

El kit de prueba a base de un inmunoensayo está constituido por dos dispositivos de extracción y preparación de muestras, así como una cassette de ensayo. Ambos dispositivos de extracción contienen una varilla, que puede recoger la cantidad de heces necesaria (4-30 mg, preferentemente 25 mg). Además, los dispositivos de extracción de muestras contienen respectivamente un tubo para la extracción de muestras, que están cargados con disolución tampón. La disolución tampón acuosa para el ensayo de tumor M2-PK contiene los siguientes componentes:

Tampón 1 = tampón fosfato 10-70 mM (pH 6,7-7,6) o tampón 2 = tampón Hepes 10-70 mM (pH 7,6-8,2) o tampón 3 = trietanolamina 10-70 mM (pH 7,3-7,7) mezclas preferentes de los mismos volumen respectivamente 1:1:1

25 Detergente 1 = CHAPS 1-propanosulfonato de (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio], 10 mM-50 mM (Sigma), detergente 2 = dodecilsulfato sódico (SDS) 0,01% - 0,1 %, por ejemplo de biocromo, detergente 3 = óxido de laurildimetilamina (10 mM-50mM), por ejemplo de biocromo o mezclas de los mismos,

la disolución tampón acuosa para el ensayo de hemoglobina contiene los siguientes componentes:

tampón 1 = tampón fosfato 10-70 mM (pH 6,7-7,6) o tampón 2 = tampón Hepes 10-70 mM (pH 7,6-8,2) o tampón 3 = trietanolamina 10-70 mM (pH 7,3-7,7) o mezclas de los mismos.

##### 30 Anticuerpos empleados

Los 4 anticuerpos requeridos para la medida (respectivamente 1 en la "fase líquida" y 1 anticuerpo en la "fase sólida"), anticuerpos enlazantes de manera específica existentes, pueden ser respectivamente policlonales, pero de modo preferente monoclonales. Los anticuerpos policlonales, así como los monoclonales, son obtenibles según el estado de la técnica mediante los métodos clásicos de inmunización de animales con el respectivo antígeno, o preferentemente mediante el empleo del método de hibridoma según Köhler y Mielstein. Los anticuerpos policlonales, así como los anticuerpos monoclonales, que enlazan la piruvatoquinasa humana, también sus isoenzimas de piruvatoquinasa, pertenecen al estado de la técnica. Son preferentes anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales que enlazan la forma dímera, es decir tumoral, de piruvatoquinasa. La estructura cuaternaria de una proteína se refiere a la disposición espacial de las subunidades de la proteína. El "M2-PK" normal posee una estructura tetramérica (forma cuaternaria). El M2-PK de personas sanas se diferencia del "tumor M2-PK". El "tumor M2-PK" posee una estructura dimérica. Los anticuerpos policlonales y los anticuerpos monoclonales son obtenibles frente a estas formas especiales (tumor M2-PK dímero o M2-PK tetrámero) mediante métodos de inmunización clásicos, así como mediante métodos de hibridoma (tecnología de Köhler-Mielstein).

45 De este modo, la forma tumoral de M2-PK se puede purificar y emplear como antígeno. Otra posibilidad consiste en comprar comprar M2-PK exprimido mediante técnica génica, también la forma tumoral, y emplear ésta para la inmunización. Otra vía es emplear fragmentos especiales, léase secuencias de aminoácido, y emplear los mismos en la inmunización.

#### Anticuerpo de tumor M2-PK

50 Para la pulverización sobre la membrana de nitrocelulosa es preferente un anticuerpo monoclonal de ratón (clon PATAM3AT, IgG1). Este clon se ha generado mediante hibridación de células de mieloma con linfocitos B de ratón.

- Como inmunógeno sirvió el tumor M2-PK humano recombinante de *E. coli* con los aminoácidos 1-531. El anticuerpo se encuentra disponible, entre otras, en la firma Prospec (Esst Brunswick, USA). Opcionalmente, como se ha descrito aquí, se puede emplear un anticuerpo monoclonal de ratón (clon AT1 E3, IgG1). Como inmunógeno sirvió el tumor M2-PK humano recombinante. El anticuerpo se encuentra disponible, entre otras, en la firma Novus Biologicals (Littleton, USA). Para el acoplamiento en oro es especialmente preferente un anticuerpo de ratón monoclonal (clon 1 E3, IgG1). Como inmunógeno sirvió el tumor M2-PK humano recombinante con la secuencia de aminoácidos 47-574. El anticuerpo se encuentra disponible, entre otros, en la firma Novus Biologicals (USA). Opcionalmente se puede emplear un anticuerpo policlonal generado en oveja (fracción Ig) de la firma Randox (Reino Unido). Como inmunógeno sirvió el tumor P2-PK humano recombinante de *E. coli*.
- 5
- 10 Anticuerpo de hemoglobina
- Para la pulverización sobre la membrana de nitrocelulosa es preferente un anticuerpo monoclonal de ratón (clon M1202100, IgG1). El anticuerpo se generó inmunizándose con hemoglobina humana. El anticuerpo se encuentra disponible, entre otras, en la firma Thermo Scientific (Rockford, USA). Alternativamente, como se ha descrito aquí, se puede emplear un anticuerpo monoclonal contra hemoglobina humana. Este anticuerpo del clon 7202 SPR-5 tiene una constante de afinidad de  $1 \times 10^{-10}$  l/mol y un punto isoeléctrico de 5,8. Éste se puede adquirir en la firma Medix (Finlandia). Para el anticuerpo de hemoglobina acoplado a oro se utilizó el anticuerpo de ratón monoclonal (clon HB11-2312). Como inmunógeno se utilizó hemoglobina humana purificada. El anticuerpo se puede adquirir en la firma Thermo Scientific (Rockford, USA).
- 15
- 20 Una de las condiciones importantes para la selección del anticuerpo consiste en que éste no debe presentar reactividad cruzada con otros componentes de las heces, en especial con otras isoenzimas piruvatoquinasa (por ejemplo M1-PK, M2-PK (forma tetramera) L-PK, R-PK).
- Los anticuerpos de hemoglobina citados anteriormente son especialmente apropiados para el enlace a una membrana (fase sólida), de forma preferente nitrocelulosa. Los anticuerpos citados anteriormente no presentan reactividad cruzada con hemoglobina de cerdo, caballo, oveja y vaca. Los anticuerpos de hemoglobina citados anteriormente son apropiados preferentemente para el enlace a partículas de látex o nanopartículas – preferentemente coloides de oro – (fase líquida). Éstos no presentan reactividad cruzada con hemoglobina de oveja, caballo, vaca o cerdo. Los anticuerpos citados anteriormente se enlazan a hemoglobina A0 y A1 de modo igualmente conveniente, A2 parcialmente con constante de enlace menor, y AS parcialmente con constante de enlace muy deficiente. Los anticuerpos en fase sólida se mezclan preferentemente 1 : 1 w/w. Los anticuerpos en fase líquida se mezclan preferentemente 1 : 1 w/w.
- 25
- 30
- Detergente 1 (*CHAPS (1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio], 10 mM (Sigma)*), detergente 2 = dodecilsulfato sódico (SDS) 0,01% - 0,1 %), por ejemplo de, detergente 3 = óxido de laurildimetilamina (10 mM-50mM), por ejemplo de Biochrom, o mezclas de los mismos.
- 35
- El dispositivo de extracción para la puesta en práctica del ensayo de hemoglobina contiene uno de los tampones descritos anteriormente (1,5-2,5 ml). La persona a analizar pica en las heces con la jeringa de dosificación y traslada la muestra fecal al tubo cargado con el correspondiente tampón. El dispositivo de extracción para el ensayo de tumor M2-PK, que es entregado por el doctor a la persona a analizar, no contiene tampón. El paciente pica en las heces con la jeringa de dosificación y traslada la muestra fecal al tubo vacío.
- 40
- El kit de ensayo según la invención contiene además un cassette de ensayo, en la que se llevan a cabo ambos inmunoensayos mejorados según el estado de la técnica mediante tecnología de flujo lateral. Con este fin, el cassette de ensayo contiene dos ranuras, preferentemente redondas, para la aplicación de las muestras fecales, así como dos ranuras, preferentemente longitudinales, para la lectura de los resultados de ensayo. El cassette de ensayo contiene en su interior como fase estacionaria nitrocelulosa de la siguiente velocidad de flujo capilar preferente de 135 sec/4 cm.
- 45
- 50
- En las investigaciones en el ámbito del desarrollo del kit de ensayo según la invención se ha demostrado que la nitrocelulosa tiene una fuerte influencia sobre la distribución de los resultados. Esta distribución es especialmente grande en el caso de nitrocelulosa recién obtenida, pero se reduce mediante un almacenaje de tres a seis meses (maduración). En el caso de la nitrocelulosa empleada en el ámbito de la presente invención se trata de aquella que se almacenó de tres a seis meses hasta someterse a ensayos ulteriores. Mediante el empleo de tal nitrocelulosa “madurada” se pudo obtener una clara reducción de la distribución de resultados. En especial se pudo conseguir que entre diversas cargas del kit de ensayo obtenido se produzcan variantes claramente menores que en el caso de nitrocelulosa “fresca”.

## ES 2 663 952 T3

Los anticuerpos están acoplados a coloides, preferentemente coloides de oro o coloides de látex, preferentemente a coloides de oro con 20 nanómetros de diámetro.

5 La fase estacionaria = nitrocelulosa (preferentemente con la velocidad de flujo capilar de 90 sec/4cm) contiene anticuerpo de hemoglobina 1, anticuerpo de hemoglobina 2, es preferente una proporción de mezcla como se indica anteriormente.

La fase estacionaria = nitrocelulosa (preferentemente con la velocidad de flujo capilar de 135 sec/4cm) contiene además anticuerpo de tumor M2-PL (del clon P1F3), anticuerpo de tumor M2-PK (del clon P5A1), preferentemente una mezcla de anticuerpos de los clones P1F3 y P5A1 en el siguiente volumen en proporción de mezcla 1:3,5 w/w.

10 Los anticuerpos del clon P1F3 y del clon P5A1 son especialmente apropiados como anticuerpos de captura (fase estacionaria) para enlazarse a una membrana, preferentemente nitrocelulosa. Los anticuerpos de tumor M2-PK del clon P1A6 son apropiados preferentemente para el enlace a coloides de oro o coloides de látex, preferentemente coloides de oro con 80 nanómetros de diámetro.

Aparato y protocolo para la producción del kit de ensayo, en especial para la producción de ambas tiras de ensayo:

Aparato de sellado – aparato de sellado de láminas (de la firma Kopp) sistema de envasado Reichenbach

15 Temperatura de sellado 60°, tipo MSC 440 vatios

Aparato Biodot

### 2. Aparato Biodot

Cutter de la firma Zeta Corporation, [www.zetacorporation.com](http://www.zetacorporation.com) tipo de aparato GC1800-081101

El aparato tiene marca CE

20 Protocolo de laminación y corte de membrana de nitrocelulosa, número de tarjetas M2-PK laminadas

Ajuste de aparato y manejo del aparato de laminación Matrix 2210 de la firma Kinematic

Protocolo de laminación y corte de la membrana de nitrocelulosa, ajuste de aparato, manejo del aparato de laminación Matrix 2210, realización del ajuste del aparato y manejo

Ajuste del aparato y manejo del aparato de corte GSI-800 de la firma Zeta Corporation

25 Fabricación de cassettes y colocación de los kits de ensayo rápido SchaBo M2-PK

Fabricación de cassettes de ensayo

Almacenaje de los productos semielaborados en refrigeradores

Control de calidad

La temperatura y la humedad del aire de los espacios en los que se encuentra la producción se registran.

30 Aparato de climatización FUJITSU DG Inverts para la climatización del espacio y el mantenimiento constante de la humedad del aire. El mantenimiento de la temperatura del aire y de la humedad del aire es especialmente significativo para la garantía de calidad de las membranas de ensayo.

Selección del tipo de operación/ajuste del termostato 1 ajuste del índice de revoluciones del ventilador.

En especial, son factores de éxito críticos para el ajuste óptimo de ambas tiras de ensayo en la cassette Combi:

- a) Curvas de Heidelberg para la determinación de Hb
- b) Curvas de Heidelberg para la determinación de M2-PK.

5 Sorprendentemente se descubrió que si se mezcla con el tampón de extracción M2-PK un 6,7 ‰ de bilis de buey (agente humectante natural, purificado, de la firma Schmincke, N° de pedido: 50031, Schmincke, Erkrath, Alemania) como concentración final, se obtienen resultados inmunocromatográficos especialmente buenos, reproducibles.

Sorprendentemente se descubrió que si se mezcla con el tampón de extracción para hemoglobina un 2,8 ‰ de bilis de buey como concentración final, se obtienen resultados inmunocromatográficos especialmente buenos, reproducibles.

Sobre la determinación sincrónica técnica de ambos analitos en el cassette Combi

10 Optimización del “retraso temporal” del punto inicial de cromatografía. El usuario inicia la cromatografía mediante goteo de extracto de muestras fecales de M2-PK en la ventana de ensayo izquierda del cassette (ajusta el temporizador entonces a 5 minutos). El goteo del extracto de muestra fecal Hb se efectúa después de 1 minuto tras goteo del extracto de muestra fecal M2-PK en la ventana de muestra derecha del cassette. Es decir, ambas cromatografías se inician en diferentes momentos. No obstante, el resultado de ambos ensayos se lee una vez  
15 transcurrido el tiempo de detención de 5 minutos.

La cromatografía, en especial los procedimientos de ensayo inmunocromatográficos – como el nombre indica – son sensiblemente dependientes del tiempo, así como de las afinidades de enlace (el enlace de los anticuerpos a los antígenos en fase líquida y sólida, pero también las diversas cinéticas dentro de la membrana de nitrocelulosa), es decir, están sujetos a diversas cinéticas.

20 Los resultados de ensayo, que se leen más tarde, no son válidos! (esto se indica en la descripción de ensayo del la prueba Combi). La formación de la línea de ensayo rosada en el intervalo de prueba de tiras de ensayo de nitrocelulosa es el resultado de una reacción de aglutinación compleja desde el punto de vista biofísico (diversas cinéticas y afinidades juegan un papel especial en este caso; véase también la curva de Heidelberg a describir más detalladamente con anterioridad). Para el procesado paralelo según la invención, es decir, sincrónico en el sentido  
25 técnico, o la determinación de los analitos 1 según la invención. Inicio de la “cromatografía” M2-PK seguida de un segundo inicio de la cromatografía Hb.

La determinación sincrónica en sentido técnico es un desafío, ya que las determinaciones inmunocromatográficas son muy complejas.

Muchos parámetros son de especial importancia para la solución de las diversas tareas inventivas:

30 (todas las tareas se resolvieron en ScheBo Biotech AG).

Estas tareas se resolvieron según la invención, por ejemplo, mediante determinación de pares de acción especiales/esenciales:

- 35 1. Constante/afinidad de enlace de los anticuerpos individuales a las respectivas sustancias (proteínas), los analitos según la invención. También es crítica la composición de oro “desecado” y la “liberación de oro” de la almohadilla de secreción, es decir, la disolución de las partículas de oro desecadas (que se encuentran en una matriz de fibra de vidrio/matriz sacárica desecada) mediante la adición gota a gota de tampón de extracción, que contiene los correspondientes analitos (extracto de muestra fecal).

Sobre la producción del kit de ensayo según la invención que contiene un cassette doble para la determinación inmunocromatográfica de dos analitos.

40 Para la realización de la misma, hemos sometido a ensayo la determinación inmunocromatográfica de ambos analitos, primeramente en un formato denominado varilla. Este formato de varilla es sensiblemente menos complicado, ya que no contiene la almohadilla de liberación de conjugado.

Según la invención había que resolver los siguientes cometidos y desafíos:

Las soluciones técnicas según la invención no eran “obvias” casi en su totalidad.

Observaciones generales:

Para la producción de las tiras de ensayo es de especial importancia mantener la humedad del aire entre un 40-60 % a 18°C hasta 25°C.

5 Mediante series de ensayos que se llevaron a cabo en el departamento F&E en ScheBo-Biotech AG se determinó de manera inventiva una humedad del aire óptima de un 35 % a 20°C.

Tareas/desafíos:

- 10 a. Líquido que fluye lentamente en la membrana o incluso detención/interrupción del flujo de líquido cromatográfico.  
b. La muestra en el líquido se detiene en la mitad (en sentido de marcha de la membrana) de la tira de membrana.

¿Es la membrana seleccionada demasiado lenta en la velocidad de flujo para la aplicación?

¿Se volvió hidrófoba la membrana?

¿Se empleó la mecha correcta?

La membrana de nitrocelulosa contiene "sustancias tensioactivas" y "reactivos de humectación".

15 La membrana de ensayo posee una alta "coloración de fondo" (esta coloración de fondo se resolvió mediante soluciones según la invención, no evidentes).

Se debe clarificar si se pueden emplear reactivos de bloqueo especiales.

Ajustar de manera óptima y completa la liberación de oro sobre la membrana de nitrocelulosa (resuelto mediante solución según la invención, no evidente)

20 El frente de líquido no es lineal (resuelto mediante solución según la invención, no evidente).

La línea de ensayo es demasiado gruesa o "difusa", "difuminada" (resuelto mediante solución según la invención, no evidente).

Una señal demasiado débil en la línea de ensayo se observa/halla de manera reproducible (resuelto mediante solución según la invención, no evidente).

25 La línea de ensayo muestra resultados falso positivos/falso negativos (resuelto mediante solución según la invención, no evidente).

30 El kit de ensayo según la invención contiene coloides metálicos, es decir, coloide de oro. También se describen, por ejemplo, partículas de látex, además de nanopartículas. Las partículas de látex pueden estar también teñidas, provistas de colorantes fluorescentes, y poseer diferente tamaño (tamaño se refiere al intervalo de micrómetros, pero también al intervalo de nanómetros).

También partículas magnéticas (cuantificación de activación por medio de aparatos de lectura especiales (reader).

Los grandes requisitos técnicos se refieren especialmente a la garantía de calidad. Preparación de protocolos de manufactura correcta (resuelto mediante solución según la invención, no evidente).

35 Objetivo/cometido: consecución de una intervariabilidad, o bien variabilidad entre ensayos óptima, reducida. Especialmente importante: muy buena variabilidad de lote a lote (es decir, una variabilidad de lote a lote lo más reducida posible.

Esta variabilidad lote a lote reducida se debe garantizar en el ámbito de una garantía de calidad en los procedimientos de obtención según la invención (resuelto mediante solución según la invención, no evidente).

Obtención de un gran número, mayor que 100000 kits de ensayo con el mismo número de lote, de la misma fecha de caducidad (resuelto mediante solución según la invención, no evidente).

Desafío: garantía de una calidad extremadamente buena – ventaja para los clientes (resuelto mediante solución según la invención, no evidente).

5 Aglutinación – Definición

Aglutinación en medicina designa la adhesión, o bien aglomeración de patógenos celulares.

Las reacciones de aglutinación se utilizan en el laboratorio para dar informaciones cuantitativas. La aglomeración se mide por medio de métodos de determinación nefelométricos.

10 La línea de ensayo roja se produce en cinética complicada debido a una reacción de aglutinación. En la estructura tridimensional de nitrocelulosa de la tira de ensayo tiene lugar una aglomeración. Esta "aglomeración" es identificable como línea rosa a simple vista.

15 Esta línea rosa es el resultado de una detección de sustancia mediante reacción antígeno/anticuerpo. Esta reacción antígeno/anticuerpo está sometida a diversos efectos. Uno de estos efectos es el denominado efecto gancho (también caracterizado como efecto gancho de dosis elevada), que se produce en determinaciones falsas de bajo valor de analitos, que se presentan en concentración muy elevada de disoluciones de muestra (es decir, concentraciones elevadas de analito pueden parecer señales de medida falso negativas en el caso especial).

Tan pronto la concentración de analito es demasiado elevada, los puntos de enlace de anticuerpos pueden estar cubiertos con analito, y las moléculas de analito adicionales ya no se determinan en el ámbito de la curva de enlace. Se llega a valores de medida falsos de bajo valor.

20 Una tarea técnica era evitar el efecto gancho. Mediante medidas paralelas de diversas diluciones de una muestra se puede observar la presencia de un efecto de dosis elevada, y corregir la medida correspondientemente (el cometido del problema técnico se resolvió mediante soluciones según la invención, no evidentes).

25 En contrapartida con formas de realización del estado de la técnica, el kit de ensayo descrito en las reivindicaciones según la invención no presenta efecto gancho de dosis elevada. Esto se demostró de manera convincente mediante ensayos con muestras, con concentraciones de tumor M2-PK que sobrepasaban el corte en más de 200 veces (hasta 160.000 ng/ml).

Generalmente, los procedimientos de detección inmunobioanalíticos, especialmente los procedimientos inmunocromatográficos, están sujetos a los siguientes fallos:

- 30
1. Fallos por reactividad cruzada y enlaces inespecíficos.
  2. Fallos por efectos de matriz.
  3. Fallos por "anticuerpos anti-animales"
  4. Fallos por componentes endógenos de la muestra
  5. Fallos por heterófilos y otros agentes interferentes reticulantes

(Estos fallos 1-5 se pudieron resolver mediante soluciones según la invención, no evidentes).

35 Era una particularidad el empleo de un tampón LowCross especial (producido por ScheBo Biotech AG). Éste contiene diversos detergentes, proteínas, anticuerpos policlonales, sustancias tensioactivas, así como sustancias que modifican la tensión superficial.

40 Todo esto, junto con los reactivos, sustancias etc. del kit de ensayo según la invención descritos anteriormente, da por resultado un ajuste óptimo de pares de acción en el sentido técnico. Todo esto permite la determinación sincrónica de ambos analitos en un cassette de ensayo Combi.

Sorprendentemente se descubrió que, para la solución de la determinación conjunta, sincrónica (en sentido técnico) de ambos analitos en las tiras de ensayo, la humedad de control (Humidity control) y la desgasificación de los líquidos en la liberación precisa de líquidos de anticuerpos y del oro coloidal eran de significado decisivo.

Era necesario un trabajo creativo, pero también sistemático, para poder poner a disposición el kit de ensayo según la invención.

Era necesaria una costosa serie de ensayos para la identificación de pares de acción y su ajuste común, óptimo.

5 Ésta es una condición básica para desarrollar un ensayo robusto, reproducible y fiable en forma de un ensayo rápido (pruebas de plataforma y/o diagnóstico).

La variabilidad extremadamente elevada de las muestras de material disponible (voluntarios para muestras fecales), reactivos y anticuerpos respectivamente de dos parejas se debe ajustar entre sí para obtener gradualmente resultados reproducibles.

10 En el diseño y en el desarrollo de tal plataforma compleja se encuentran numerosos fenómenos físicos y químicos, que pueden influir sobre el resultado de ensayo de manera inesperada.

Otra forma de realización de lo que se describe en este caso es el empleo, tras ensayo de “todos” los pares de acción óptimos, esenciales, la determinación cualitativa, semicuantitativa y cualitativa de ambos analitos (biomarcadores por medio de otros principios de ensayo inmunológicos, por ejemplo ELISA), la aglutinación, preferentemente el empleo de nanopartículas para el desencadenamiento de la aglutinación en una fase líquida. La técnica de medida turbométrica, nefelométrica, según el estado de la técnica posibilita la generación de datos de medida. Estos datos de medida se pueden procesar por medio de un correspondiente software informático. Por medio de una curva de calibrado “interna” (también dependiente de la carga) es posible, por ejemplo, una determinación de ambos analitos según la invención. También son posibles diversas representaciones gráficas, por ejemplo representación Log-Log, Log-decimal. En este caso se describen las valoraciones estadísticas, por ejemplo algoritmos, a partir de los ámbitos de análisis de lógica difusa, clasificación, así como detección de muestras e imágenes, análisis de datos explorativo, visualización de datos, estadística robusta y computerizada, análisis de datos (IDA) y sistemas en evolución (ES), extracción de datos y análisis de datos explorativo, sistemas difusos, redes neuronales, algoritmos evolutivos. Son preferentes los algoritmos del Profesor Dr. Frank Klawonn. El Profesor Klawonn tiene buenas estrategias de valoración, que mejoran una fiabilidad de datos. El Profesor Klawonn es el director del instituto de informática aplicada. Además, en este caso se describe una intersección con WLAN. También son posibles desarrollos temporales de pacientes. Para la valoración es posible una serie de datos de paciente individual.

Son concebibles otros aparatos, instalaciones, etc., para la medida de ambos analitos.

Otras formas de realización: son concebibles plataformas “ELISA”.

30 Son posibles diversas matrices: fases líquidas (luminex) o sólidas (matrices). Son concebibles todos los procedimientos de detección inmunológicos.

#### Aglutinación

Sorprendentemente se descubrió que el tamaño de gota (volumen en el intervalo de nanolitros) y la distancia de estas gotas son decisivos.

35 El tamaño de gota y la distancia entre estas gotas son especialmente significativos. Por consiguiente, no se dispersa ninguna “línea”, sino gotas aisladas. Las fuerzas capilares de la membrana de nitrocelulosa absorben gotas en fracciones de segundos, y permiten producir una línea. Los anticuerpos que se encuentran en el líquido se distribuyen en la estructura tridimensional de la nitrocelulosa.

40 Sorprendentemente se descubrió que el “grado de secado” es decisivo para la consecución de una línea muy precisa.

45 Sorprendentemente se descubrió también que la hidrofobicidad es muy muy importante. Para garantizar que la membrana de nitrocelulosa a emplear esté seca, ésta se selló previamente en láminas de aluminio revestidas por un lado, que no dejaban pasar la humedad, se abrió, se dotó de anticuerpos, e inmediatamente se selló de nuevo en las láminas de aluminio más agente desecante. Estos pasos de obtención eran sorprendentemente importantes y se efectuaron en un ciclo de 6 minutos.

Sorprendentemente era curioso que la composición de la tira de ensayo se efectuara en el orden correcto para garantizar un flujo constante a través de la membrana.

En la zona de reacción de las tiras de ensayo (región de líneas de resultado de ensayo) se producen las correspondientes líneas (líneas rosadas).

5 La línea de resultado de ensayo de color (un resultado positivo) es el resultado de una reacción antígeno-anticuerpo, y la "curva de Heidelberg" determinada muestra la señal de medida en función del exceso de anticuerpo y del exceso de antígeno. El objetivo es utilizar la zona de equivalencia según la "curva de Heidelberg".

La utilización óptima de la reacción antígeno-anticuerpo, es decir, el ajuste de anticuerpos estacionarios a las partículas de oro acopladas a anticuerpos presentes en la fase líquida en la zona de equivalencia de la tira de ensayo M2-PK proporciona una señal óptima para M2-PK en la tira de ensayo.

10 La utilización óptima de la reacción antígeno-anticuerpo, es decir, el ajuste de anticuerpos estacionarios a las partículas de oro acopladas a anticuerpos presentes en la fase líquida en la zona de equivalencia de la tira de ensayo Hb proporciona una señal óptima para Hb en la tira de ensayo.

La tarea inventiva era la utilización óptima de la reacción antígeno-anticuerpo en la zona de equivalencia de una tira de ensayo M2-PK y en la zona de equivalencia de la tira de ensayo Hb.

15 La tarea inventiva se solucionó mediante el ajuste óptimo de pares de acción, en especial mediante la selección correcta de anticuerpos, la selección correcta de detergentes, etc., pero en especial mediante las liberaciones reproducibles, altamente precisas, de disoluciones de anticuerpos en ambas membranas de ensayo de nitrocelulosa.

Esto posibilitaba la detección sincrónica de ambos analitos en muestras fecales de voluntarios. Todos estos pares de acción y las soluciones técnicas a tal efecto se describen en la solicitud. Para ello se disponía frecuentemente de disoluciones no evidentes, también casualidades afortunadas condujeron a un resultado positivo.

20 El tubo de ensayo de hemoglobina y el tubo de M2-PK se debían entregar en la consulta médica en el intervalo de 48 horas. La jeringa de dosificación con la muestra fecal se traslada a un tubo cargado con tampón descrito anteriormente. Tanto el tubo para el ensayo M2-PK como también el tubo para el ensayo de hemoglobina se agitan intensivamente.

25 Los extractos de muestras fecales preparados se aplican inmediatamente de manera sucesiva sobre ambas ranuras. Después de 5-10 minutos se lee por medio de la línea marcada si uno o ambos biomarcadores medidos son positivos.

30 Para la determinación segura de un episodio maligno en el tracto gastrointestinal es decisiva la selección del denominado "corte". El corte marca la concentración mínima de analito en la muestra, que indica un resultado positivo. El corte del ensayo de hemoglobina en el kit de ensayo según la invención se sitúa entre 18 y 38  $\mu\text{g}$  de hemoglobina por gramo de heces, preferentemente en 24  $\mu\text{g}$  de hemoglobina por gramo de heces. El corte en el caso del tumor M2-PK se sitúa entre 3 y 6 U/ml de extracto fecal, según la invención  $4 \pm 1$  U/ml.

El límite de detección asciende a 150 nanogramos de hemoglobina/ml de extracto fecal.

35 La valoración del resultado de ensayo y la asignación a grados de riesgo, como se representa a modo de ejemplo en la Figura 10, se puede efectuar de manera manual, semiautomática o completamente automática. A modo de ejemplo, un cassette de ensayo según la invención se puede fijar manualmente en un dispositivo de lectura, que efectúa una valoración por medio una fotocélula o cámara, y representa el resultando entonces en un monitor. La representación se efectúa preferentemente en color (semáforo de peligro). Por motivos de seguridad es especialmente preferente una representación paralela de otra forma (por ejemplo grados de riesgo 1-4, o similares).

40 Naturalmente, el cassette de ensayo también puede estar configurado de modo que sea posible una valoración completamente automática, por ejemplo mediante detección de las partículas de oro por vía electroquímica o mediante registro óptico (escaneo) del kit de ensayo.

Ejemplo 2:

45 El cassette de ensayo rápido Combi según la invención no contiene tiras de ensayo de flujo lateral disponibles en el mercado para la determinación de M2-PK, sino una nueva tira de ensayo de flujo lateral mejorada, según la invención, para la determinación de M2-PK (tumor M2-PK plus), por ejemplo Sartorius.

Por lo demás, el cassette de ensayo rápido Combi no contiene una tira de ensayo de flujo lateral disponible en el mercado para la determinación de hemoglobina, sino una nueva tira de ensayo de flujo lateral mejorada, según la invención, para la determinación de hemoglobina (iFOBplus), por ejemplo Sartorius.

5 La invención se refiere en especial al ensayo rápido Combi y a componentes, así como a todos los reactivos necesarios para la puesta en práctica sincrónica del procedimiento de detección inmunocromatográfico. Sincrónico en el significado lingüístico de simultáneamente, pero también sincrónico en el significado técnico de ajuste conjunto, óptimo, de las condiciones cromatográficas para la detección de ambos biomarcadores M2-PK y hemoglobina en un cassette de ensayo rápido Combi.

Detección de reactivos:

Se pueden emplear diversos reactivos de detección: bolas de látex, partículas de oro coloidales, partículas de plata coloidales, etc. Una de las propiedades más importantes de estas partículas es que la población debe ser monodispersa con un tamaño esférico constante.

10 Según la invención se emplean partículas de oro. La obtención de partículas de oro coloidales es conocida en principio. Habitualmente se reduce por vía química una disolución que contiene  $Au^{3+}$  bajo agitación rápida, de modo que precipitan partículas de oro atómicas, que se agregan en el transcurso del tiempo. La agregación se puede impedir mediante agentes de estabilización. Mediante la selección del aditivo correcto se puede ajustar el tamaño de los coloides formados. Como fuente de  $Au^{3+}$  se emplea frecuentemente  $H[AuCl_4]$ . Como agente reductor se puede  
15 emplear disolución de citrato sódico, borhidruro sódico o hidroquinona. Para la estabilización se emplean frecuentemente compuestos de azufre (como por ejemplo alcanotioles). Las disoluciones que contienen partículas de oro son obtenibles a partir de diversas fuentes.

Composición polimérica y enlace proteico

20 Para la obtención de ensayos de flujo lateral se emplea nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno, nylon modificado en carga, polietersulfona.

Las dimensiones de superficie del polímero son dependientes del tamaño de poro, la porosidad, el grosor, y otras características estructurales.

25 La superficie no aumenta linealmente con el tamaño de poro, sino que asciende linealmente con el grosor y asciende no linealmente con la porosidad. El enlace proteico a una zona de superficie dada es dependiente de la densidad de la proteína, su estructura y su radio trazado (diámetro efectivo). Además, el enlace de la proteína al polímero es dependiente del valor de pH y de la disolución de inmovilización.

En el ensayo rápido Combi según la invención se emplearon preferentemente fibras de vidrio para la denominada almohadilla de muestra, nitrocelulosa para la membrana de ensayo, y celulosa para la almohadilla absorbente.

Almohadilla de conjugado/muestra = 22 mm (+/- 0,2 mm) x 5 mm (+/- 0,2 mm)

30 Membrana de nitrocelulosa = 25 mm (+/- 0,2 mm) x 5 mm (+/- 0,2 mm)

Almohadilla absorbente = 16,5 mm (+/- 0,2 mm) x 5 mm (+/- 0,2 mm)

Velocidad de flujo capilar: normalmente 1-6 cm/min.; según la invención 3,74 cm/min.

Límite de detección

35 El corte de 4 U M2-PK/ml se halló por medio de diversos estudios, que analizaron el ensayo fecal M2-PK ELISA. Las condiciones cromatográficas según la invención, por ejemplo del valor de corte del ensayo rápido Combi según la invención, se determinaron por medio del valor de corte calculado previamente del ensayo fecal M2-PK ELISA.

Las velocidades de flujo capilares para membranas de nitrocelulosa

40 La sensibilidad analítica desciende con el tiempo de flujo capilar, es decir, la nitrocelulosa con el tiempo de flujo capilar más lento proporciona la máxima sensibilidad analítica. Los tiempos de flujo capilares se sitúan entre 240 - 75 sec/4 cm. Velocidad de flujo capilar según la invención 120 sec/4 cm.

Lista de componentes según la invención y componentes activos según la invención

componente	Reactivos	Cantidad
Línea de captura	Anticuerpo anti-M2-PK anti-ratón monoclonal	0,20 - 130 $\mu\text{g}$ de proteína; 0,5 - 3 $\mu\text{g}/\text{cm}$ de proteína
1 <sup>er</sup> anticuerpo	Anticuerpo anti-hemoglobina de ratón	
2 <sup>o</sup> anticuerpo		
Línea de captura Conjugado	Partículas de oro coloidales, en las que se acoplaron los anticuerpos anti-M2 según la invención, o bien anticuerpos antihemoglobina.	0,01 - 0,07 $\mu\text{g}$ de proteína
Líneas de control Anticuerpo	Anticuerpo anti-ratón-IgG especial, por ejemplo de la firma Jackson Immunochemical (USA).	0,20 - 1,30 $\mu\text{g}$ de proteína
		0,05 - 1 $\mu\text{g}/\text{cm}$ de proteína

Tampón de extracción/elución

Reactivos	Cantidad
Triton X-100 p. A.	< 0,50%
Azida sódica	< 0,05%

En las investigaciones en el ámbito del desarrollo del kit de ensayo según la invención se descubrió sorprendentemente que tanto la sensibilidad y la especificidad clínica como también la sensibilidad química analítica aumentan claramente si el líquido eluyente en el principio de ensayo inmunocromatográfico presenta un valor de pH entre 5 y 6, preferentemente un valor de pH de 5,7. Este hallazgo es especialmente sorprendente, ya que, según el estado de la ciencia respecto a propiedades de proteínas, éstas se deberían presentar parcialmente desnaturalizadas a un valor de pH de 5,7. Por lo tanto, es sorprendente que en este intervalo se alcance una mejora de sensibilidad, especificidad, pero también sensibilidad. Todos los kits de ensayo disponibles en el mercado hasta la fecha para la determinación inmunocromatográfica de hemoglobina presentan un valor de pH de 7 a 7,5 del tampón eluyente. Hasta el momento no se puede dar una explicación científica concluyente a tal efecto. Posiblemente, sin pretender vincularse a esta explicación, se produce una desnaturalización parcial de modo que los epítopos de los analitos son más accesibles para los diferentes anticuerpos. Para la puesta en práctica de esta forma de realización de la invención con un líquido eluyente con un pH de 5-6, en especial 5,7, se requiere un tampón correspondiente, es decir, un tampón acetato (pH  $\approx$  5,7), que aún contiene ventajosamente un 0,1 % de albúmina como estabilizador. Tales sistemas tampón son familiares para el especialista, y no requieren una profundización adicional en este punto.

Descripción de las figuras

Figura 1 Vista esquemática de una tira de ensayo en el cassette de plástico de un ensayo rápido de flujo lateral.

1	Sample Port	Entrada de muestra
2	Test Line	Línea de ensayo
3	Control Line	Línea de control
4	Housing	Envase

5	SamplePad	Almohadilla de muestra
6	ConjugatePad	Almohadilla de compuesto
7	Membrane	Membrana
8	AbsorbentPad	Almohadilla absorbente

Figura 2 Proporción entre “punto de burbujeo” y tamaño de poro

El “punto de burbujeo” de una membrana es la presión que se requiere para comprimir el aire a través de una membrana húmeda

5 Figura 2

Efecto de la velocidad de flujo capilar sobre la sensibilidad analítica de un ensayo rápido de flujo lateral

Ejemplos:

Velocidad de flujo = 1,00 cm/min → concentración de analito efectiva = 1,00 x

Velocidad de flujo = 1,25 cm/min → concentración de analito efectiva = 0,65 x

10 Figura 4

Efecto de una concentración de detergente o agente humectante sobre diversas características de rendimiento de una membrana

1	Protein Binding	Enlace proteico
2	Capillary Flow Rate	Velocidad de flujo capilar
3	Striping Consistency	Consistencia de tira
4	Stripe Width	Anchura de tira

Figura 5

15 Cálculo de la anchura de banda como función de la tasa de distribución

Volumen volumen de lecho de membrana =  $10\mu\text{L}/\text{cm}^2$

Tasa de liberación de reactivos =  $1\mu\text{L}/\text{cm}$

$$\text{Anchura de banda} = \frac{\text{tasa de liberación de reactivo}}{\text{volumen de lecho de membrana}} = \frac{1\mu\text{L}/\text{cm}}{10\mu\text{L}/\text{cm}^2} = 0,1 \text{ cm}$$

Figura 6

Relaciones típicas entre velocidad de flujo y función de un ensayo inmunocromatográfico

1	Surface Quality	Calidad de superficie
2	Specificity	Especificidad
3	Sensitivity	Sensitividad
4	Total Assay Time	Tiempo de ensayo total
5	ReagentCosts	Costes de reactivos
Sensitividad = sensibilidad analítica = detección en $\mu\text{g}$ = masa		

Figuras 7-9

5 Las Figuras 7-9 muestran de manera ejemplar un kit de ensayo según la invención. En la Figura 7 se pueden identificar los dispositivos de extracción de muestras. La Figura 9 muestra el verdadero cassette de ensayo.

Figura 10

10 La Figura 10 muestra de manera ejemplar la asignación de los diferentes resultados de medida a grados de riesgo. Para la simplificación de la lectura, el resultado se representa ventajosamente en color. Para evitar lecturas erróneas, por ejemplo por personas daltónicas, se pueden aplicar características de diferenciación adicionales (por ejemplo diferentes formas, cifras y/o letra). Por consiguiente, en este caso se describen:

1. Agente auxiliar = clasificador para diagnóstico (diagnosis) y asignación en la matriz de veracidad de diagnósticos: clasificaciones correctas y falsas. Ya que se trata de un si/no, también se dice que el test es *positivo* (clasificación llamativa) o *negativo* (clasificación no llamativa). Si el ensayo es positivo solo para un biomarcador, se indica una evaluación adicional del diagnóstico positivo mediante una colonoscopia.
- 15 2. Agente auxiliar para la clasificación, por medio de determinadas características (determinación de M2-PK/hemoglobina).
3. Agente auxiliar para resolución: si se debe llevar a cabo colonoscopia para el diagnóstico ulterior: si/no.
4. Agente auxiliar para facilitar instrucciones médicas mediante diagnóstico de entrada (considerables beneficios adicionales).
- 20 5. Agente auxiliar para facilitar decisiones médicas mediante medidas, por ejemplo aplicación de otros procedimientos diagnósticos, por ejemplo colonoscopia, etc, o medidas terapéuticas, por ejemplo cirugía, quimioterapia, etc.
6. Agente auxiliar para la mejora de la precisión informativa, diagnóstico en base a muestras fecales de voluntarios.
- 25 7. Kit de ensayo con gran sensibilidad total y especificidad total para hemoglobina y M2-PK para la detección de cáncer de intestino. El kit de ensayo sirve como "filtro previo doble" en el ámbito de la exploración preventiva del cáncer de intestino por medio de colonoscopia.
8. Kit de ensayo con menor desviación "lote a lote", que permite la mejor comparación posible de resultados de ensayo, no solo dentro de una carga de obtención, sino también entre las cargas.
- 30 9. Agente auxiliar para el pronóstico del éxito terapéutico.
10. Agente auxiliar para la mejora de la monitorización terapéutica.
11. Agente auxiliar para la visualización del resultado de ensayo (semáforo de peligro).
12. El kit de ensayo según la invención sirve para la prevención de problemas predictiva.
- 35 1. La prevención (Latín: praeveniere, anticipación, evitación) en el sentido de anticipación de desarrollos no deseados
  - a. Según evitación de enfermedades, de patogénesis y manifestación de enfermedades (nivel de gravedad)
  - b. Evitación de tratamientos médicos, por ejemplo medidas innecesarias, peligrosas, costosas (cirugía, quimioterapia, efectos secundarios).
- 40

El Kit de ensayo según la invención se debe observar en el contexto de la consideración óptima de daños/beneficios/riesgo en comparación con la colonoscopia de diagnóstico. No obstante, también es muy importante el mantenimiento de la calidad de vida y una prevención de una muerte prematura.

- 5 13. Tarea del kit de ensayo según la invención: el kit de ensayo sirve para la solución de un problema sanitario urgente a nivel mundial. El kit de ensayo sirve para la “selección” de voluntarios llamativos (aumento de eficiencia).

10 Este agente auxiliar se obtiene según la invención mediante la puesta a disposición de un ensayo rápido Combi. Ensayo rápido Combi para la determinación analítica sincrónica del biomarcador enzimático tumor M2-PK y del biomarcador sangre (hemoglobina). El ensayo rápido Combi que contiene las tiras de ensayo (tumor M2-PKplus) + las tiras de ensayo (iFOBplus) en un cassette de ensayo.

Ensayo rápido Combi para la determinación analítica sincrónica del biomarcador enzimático tumor M2-PK y del biomarcador complejo hemo-heptoglobina (complejo Hb-Hp).

Ensayo rápido Combi que contiene las tiras de ensayo (tumor M2-PKplus) + las tiras de ensayo (complejo Hb-Hp-plus) en un cassette de ensayo.

- 15 El procedimiento de detección es el procedimiento inmunocromatográfico. También se describen procedimientos inmunoquímicos en formato de matriz, minimatriz, también procedimientos turbidimétricos. También se describen anticuerpos monoclonales. Empleo de anticuerpos especiales en ensayo rápido Combi, que son tanto específicos en sus propiedades de enlace para el tumor M2-PK o hemoglobina, como también empleables en procedimientos inmunocromatográficos (por ejemplo “apto para membrana”, “apto para detergente”).

- 20 Empleo de un anticuerpo especial (clon P1F3 AK identifica específicamente la conformación espacial dimérica de M2-PK) para la puesta a disposición del ensayo rápido Combi según la invención. Este anticuerpo específico para el tumor M2-PK se enlaza preferentemente a uno de los siguientes epítopos o fragmentos de éstos, o combinaciones (epítopos o fragmentos de estos) de los mismos, que tienen al menos una longitud de 4 aminoácidos:

LAPITSDP	EAEAAIYH
VEASFKCC	SGAIIVLT
CSGAIIVLT	LQLFEE
TEATAVGA	QLFEELRR
LRRLAPITSDPTEATA	VEASFKC
KCCSGAIIV	KSGRSAHG

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Kit de ensayo para la detección de biomarcadores en heces humanas, constituido por un primer tubo de ensayo, que contiene un primer dispositivo de extracción de muestras fecales para la recogida de la cantidad de heces necesaria,
- 5 una primera disolución tampón que contiene tampón Hepes 10-70 mM con valor de pH 7,6-8,2, un segundo tubo de ensayo, que contiene un segundo dispositivo para la toma de muestras fecales para la recogida de la cantidad de heces necesaria, una segunda disolución tampón que contiene tampón acetato 10-70 mM con valor de pH 5-6,
- 10 un cassette de ensayo que contiene un sistema de ensayo de flujo lateral con una membrana de nitrocelulosa almacenada de uno a seis meses como fase estacionaria, la membrana de nitrocelulosa que contiene anticuerpo tumoral monoclonal M2-PK de ratón, esto es, el clon PATAM3AT, IgG1 y anticuerpo de ratón monoclonal acoplado a oro, esto es, el clon 1 E3, IgG1, y anticuerpo de hemoglobina monoclonal de ratón, esto es, el clon M1202100, IgG1, y anticuerpo de ratón monoclonal acoplado a oro, esto es, el clon HB11-2312,
- 15 un primer orificio para la toma de una muestra fecal del primer tubo de ensayo, un segundo orificio para la toma de una muestra de heces del segundo tubo de ensayo, siendo positivo el resultado de análisis de la primera muestra fecal si el contenido en tumor M2-PK es mayor que  $4 \pm 1$  unidades/ml de extracto fecal, y siendo positivo el resultado de análisis de la segunda muestra fecal si el contenido en hemoglobina sobrepasa 24  $\mu$ g de hemoglobina por gramo de heces.
- 20 2.- Kit de ensayo según la reivindicación 1, caracterizado por que los anticuerpos de captura están enlazados a coloides de oro.
- 3.- Kit de ensayo según la reivindicación 1, caracterizado por que los cuatro posibles resultados de ensayo se representan mediante diferentes colores, letras, cifras, signos y/o formas geométricas.
- 25 4.- Empleo de un kit de ensayo según al menos una de las reivindicaciones 1-3 para el diagnóstico in vitro en una modificación patológica del intestino.
- 5.- Procedimiento para el diagnóstico in vitro de un episodio maligno en el tracto gastrointestinal bajo empleo de un kit de ensayo según al menos una de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por la extracción de dos muestras fecales por medio de dos dispositivos de extracción para la recogida de la cantidad de heces necesaria,
- 30 disolución de la primera muestra fecal en la primera disolución tampón, disolución de la segunda muestra fecal en la segunda disolución tampón, aplicación de la primera y de la segunda disolución tampón que contiene heces en el orificio asignado respectivamente, cumplimiento del tiempo de espera prescrito, lectura de resultados en los respectivos orificios de lectura.
- 35 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la representación de los 4 posibles resultados de ensayo se efectúa de la siguiente manera:

## ES 2 663 952 T3

M2-PK	Hb	Resultado
-	-	Grado 1 (verde)
-	+	Grado 2 (amarillo)
+	-	Grado 3 (naranja)
+	+	Grado 4 (rojo)

Figura 1

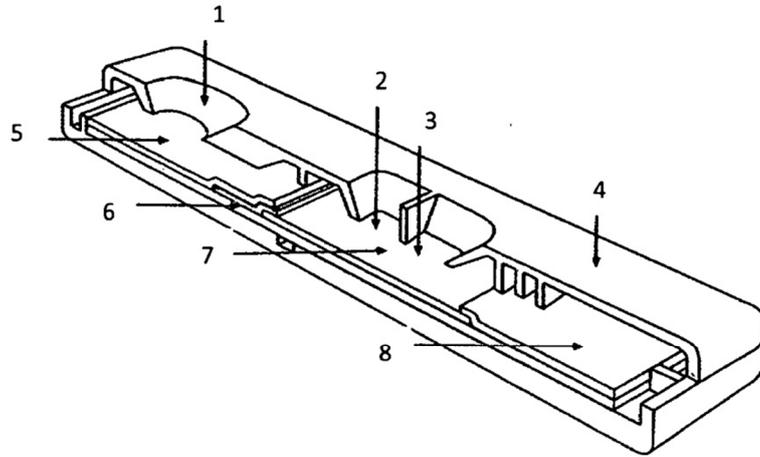


Figura 2

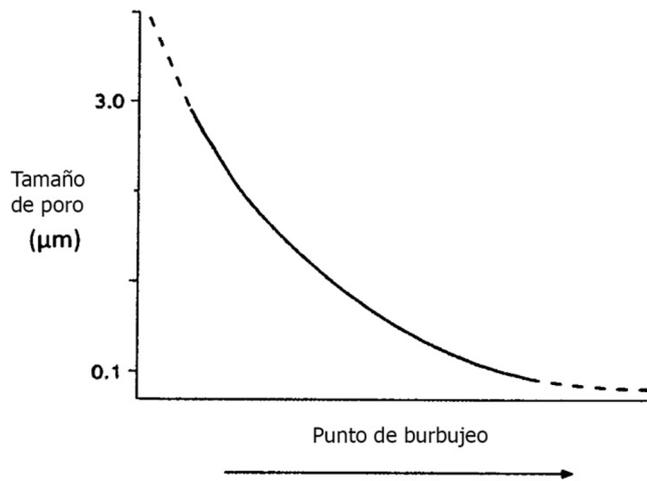


Figura 3

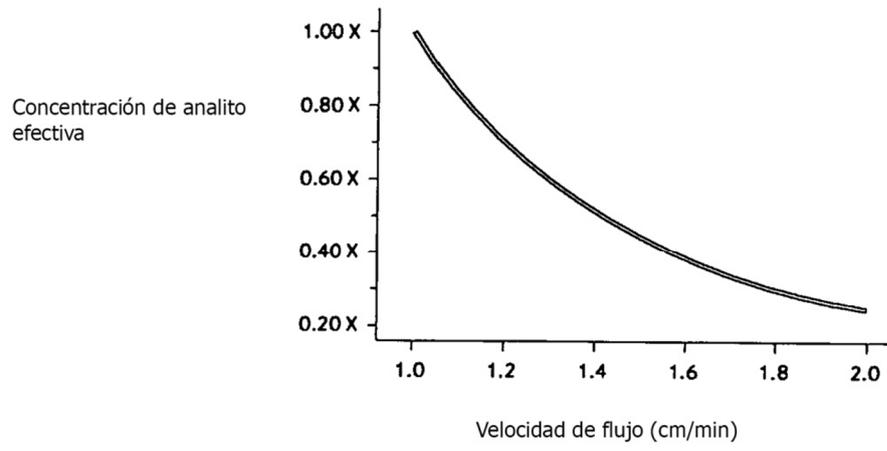


Figura 4

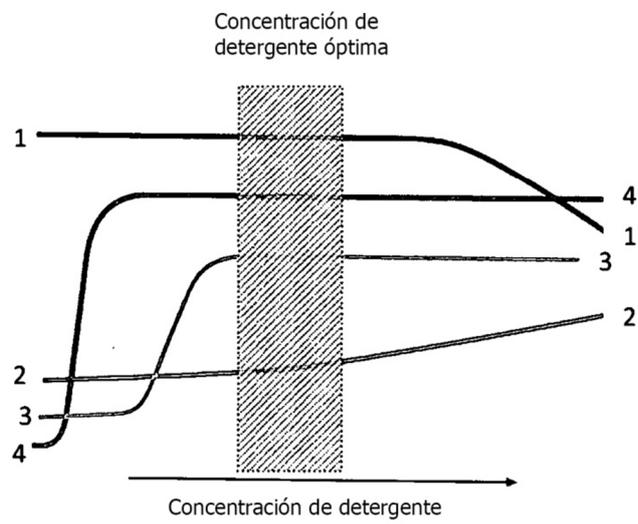


Figura 5

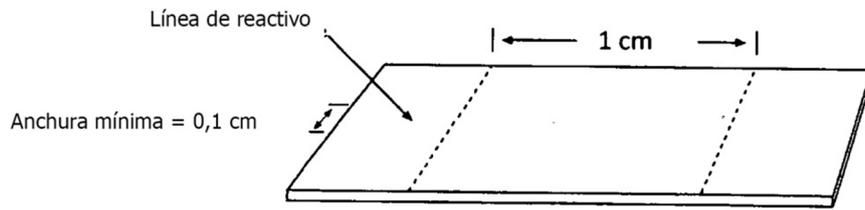


Figura 6

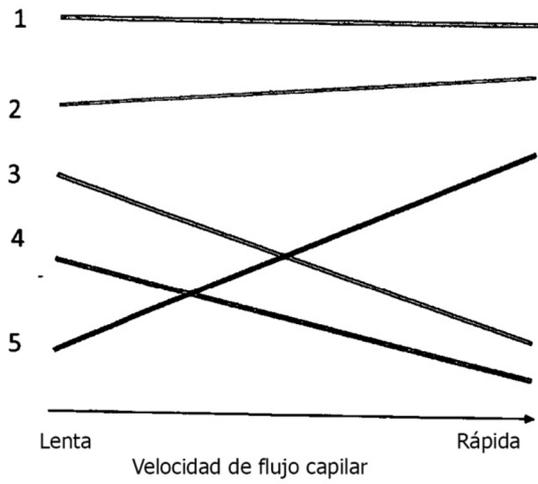


Figura 7

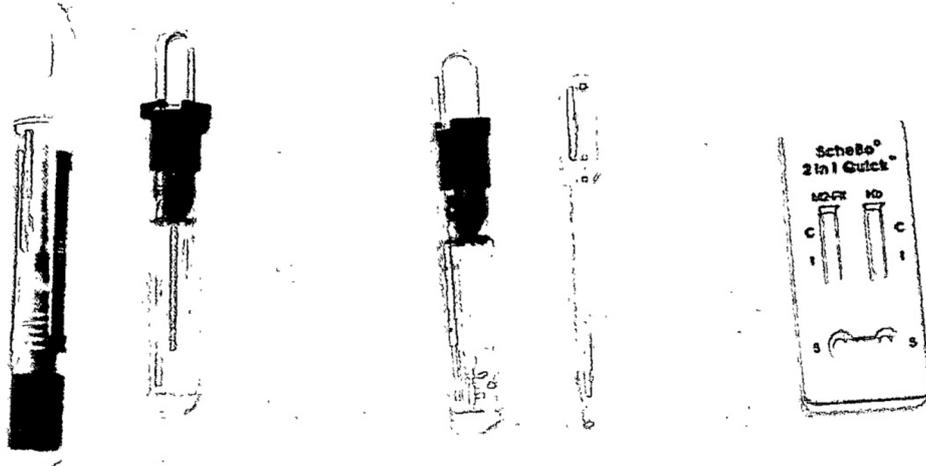


Figura 8

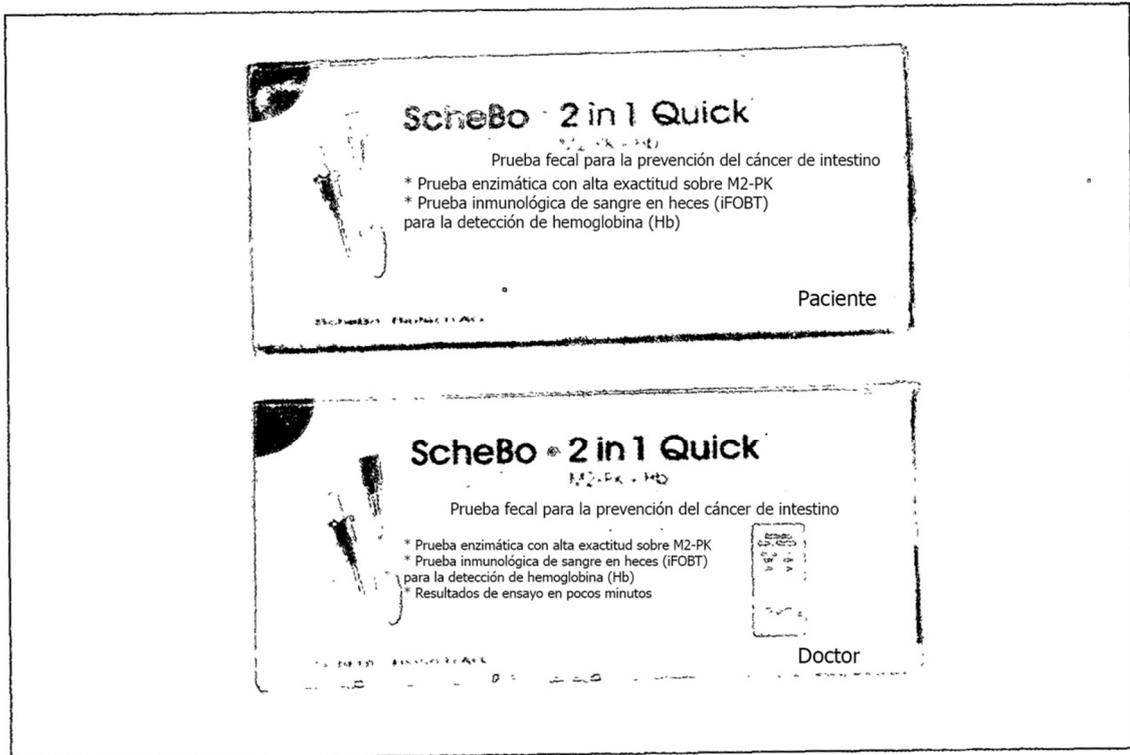
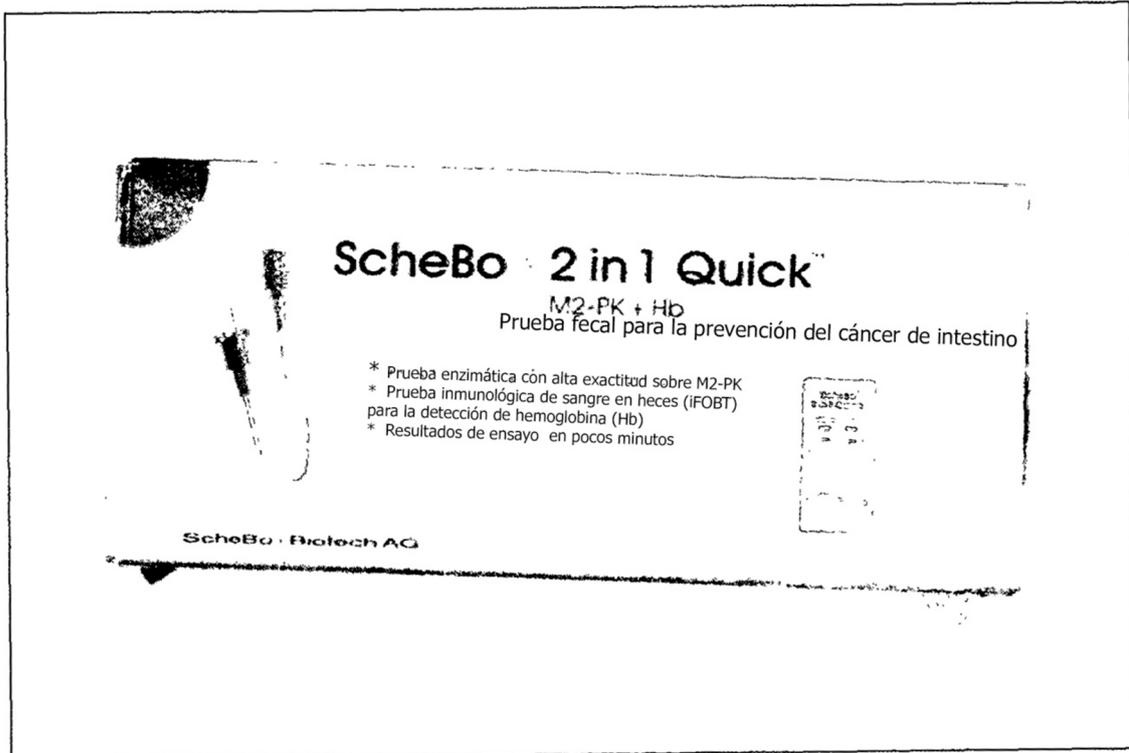


Figura 9

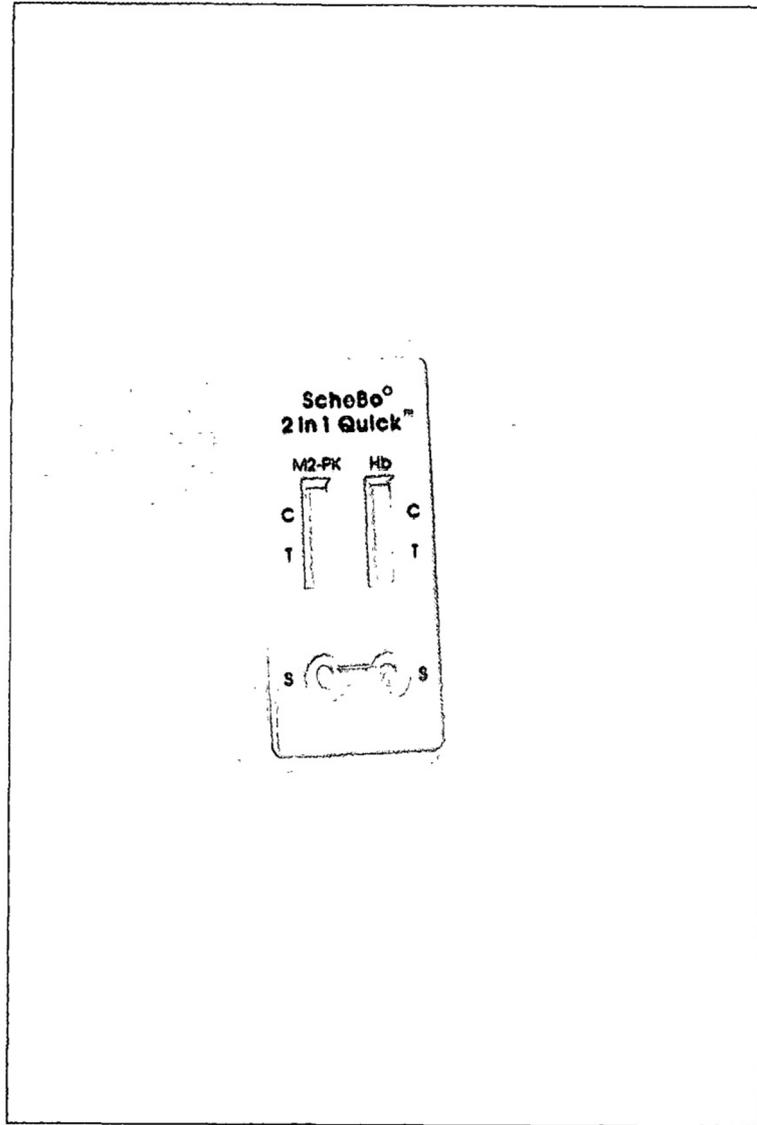
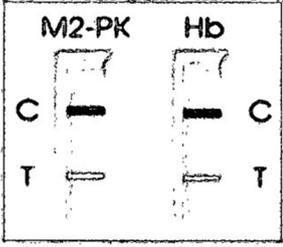
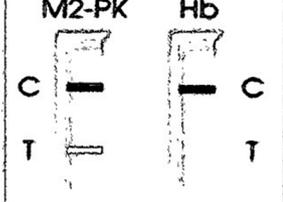
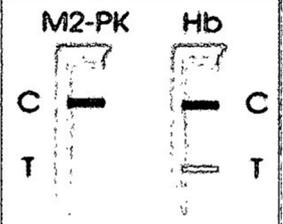
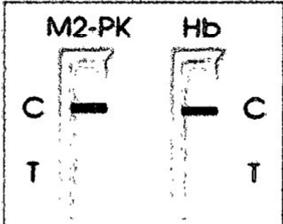


Figura 10

 <p>M2-PK (+) Hb (+)</p>	<p>Grado 4 (rojo)</p>	<p>Probabilidad del 90 % de neoplasias avanzadas. Colonoscopia en lo posible sin demora.</p>
 <p>M2PK (+) Hb (-)</p>	<p>Grado 3 (naranja)</p>	<p>Se ofrece evaluación adicional (por ejemplo colonoscopia)</p>
 <p>M2PK (-) Hb (+)</p>	<p>Grado 2 (amarillo)</p>	<p>Se ofrece evaluación adicional (por ejemplo colonoscopia)</p>
 <p>M2PK (-) Hb (-)</p>	<p>Grado 1 (verde)</p>	<p>Se puede excluir cáncer de intestino con seguridad &gt; 97 %</p>