

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 824**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2015 PCT/GB2015/051791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15193678**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2015 E 15736010 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3158336**

54 Título: **Métodos de inmunoensayo mejorados**

30 Prioridad:

20.06.2014 GB 201411060

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

22.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MURRAY, ANDREA;
HAMILTON-FAIRLEY, GEOFFREY NEIL y
ALLEN, JARED**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 686 824 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de inmunoensayo mejorados

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la detección de anticuerpos, y en particular, se refiere a ensayos para la detección de anticuerpos en una muestra que comprende fluido corporal de paciente. El ámbito de protección se define por las reivindicaciones anexas.

10

Antecedentes de la invención

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

15

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

20

25

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

30

35

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

40

45

50

Además de ser indicativos de un estado patológico de cáncer, los anticuerpos y autoanticuerpos también pueden servir como marcadores biológicos de otras patologías o susceptibilidades a enfermedad, de las cuales no son sino ejemplos la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), cirrosis biliar primaria (PBC), tiroiditis autoinmunitaria (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto), gastritis autoinmunitaria (por ejemplo, anemia perniciosa), adenitis autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Addison), hipoparatiroidismo autoinmunitario, diabetes autoinmunitaria (por ejemplo, diabetes Tipo 1), miastenia grave, trastornos neurológicos paraneoplásicos, tales como el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis y hepatitis autoinmunitaria.

55

60

Se sabe que cuando se usan de modo diagnóstico o pronóstico los ensayos basados en la detección de anticuerpos para evaluar la patología, la progresión de la enfermedad o la susceptibilidad a la enfermedad de un individuo dentro de una población, pueden surgir dificultades para concebir una metodología de ensayo normalizada apropiada para toda la población de sujetos a analizar, ya que las cantidades absolutas de anticuerpo presente varían radicalmente de un individuo a otro. Esto puede producir una alta incidencia de resultados falsos negativos, por ejemplo entre individuos que tengan una baja cantidad de anticuerpos. De forma similar, existe la dificultad de asignar resultados

65

positivos verdaderos, ya que la variación en las cantidades absolutas de anticuerpos de un individuo a otro implica que es difícil establecer un umbral para un resultado de ensayo positivo que sea apropiado para todos los individuos dentro de la población explorada.

5 En el documento WO2006/126008 se determinó que el rendimiento y, más específicamente, la utilidad y fiabilidad clínica de los ensayos basados en la detección de anticuerpos, particularmente autoanticuerpos, como marcadores biológicos de enfermedad pueden mejorarse drásticamente mediante la inclusión de una etapa de titulación de antígeno. Ensayando la muestra sospechosa de contener anticuerpos contra una serie de cantidades diferentes de antígeno y construyendo una curva de titulación es posible identificar de forma fiable los resultados de la detección
10 positivos verdaderos, independientemente de la cantidad absoluta de anticuerpo presente en la muestra. Este enfoque es contrario a los métodos de la técnica anterior que titulan el antígeno simplemente para construir una curva de calibración para permitir la identificación de la concentración de antígeno más apropiada para usar para detectar anticuerpos en muestras de pacientes reales. En estos métodos sólo se propone una medición de un único punto para el diagnóstico real. Por lo tanto, estos métodos no permitirán variaciones en las cantidades del anticuerpo
15 a detectar de un individuo a otro, dando como resultado la presencia de falsos positivos y falsos negativos como se ha descrito anteriormente. El método de titulación de antígeno del documento WO2006/126008 proporciona mayor especificidad y sensibilidad que la medición de la reactividad de los autoanticuerpos a una única concentración de antígeno, o métodos en los que se titula la muestra de suero en lugar del antígeno.

20 Sumario de la invención

Se ha establecido que el método de titulación del antígeno descrito en el documento WO2006/126008 proporciona una sensibilidad de alrededor del 40 % y una especificidad de alrededor del 90 % para la detección del cáncer de pulmón. Por lo tanto, aproximadamente el 10 % de los pacientes sanos evaluados tuvieron un resultado positivo sin
25 presentar el estado patológico (falsos positivos). Debido a la baja incidencia de cáncer de pulmón en la población, el valor predictivo positivo (VPP), la proporción de resultados positivos que son verdaderos positivos en lugar de falsos positivos, se debe principalmente a la especificidad del ensayo. Por lo tanto, sería ventajoso aumentar la especificidad, es decir, reducir el número de resultados positivos falsos. Con esto en mente, se ha determinado sorprendentemente que la especificidad del método de prueba de titulación del antígeno se puede mejorar
30 evaluando tanto la cantidad de unión antígeno/anticuerpo como un parámetro de la curva secundario. Este método se denominará en la presente memoria "método de doble corte". Este método requiere la evaluación del nivel de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno y la evaluación de un parámetro de la curva secundario, y solo los resultados de la prueba se consideran positivos en comparación con los puntos de corte para que estas dos medidas se clasifiquen como positivas
35

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de detección de un anticuerpo en una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, comprendiendo el método las etapas de:

- 40 (a) poner en contacto dicha muestra de prueba con una pluralidad de diferentes cantidades de un antígeno específico para dicho anticuerpo;
(b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno;
(c) trazar o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (a);
45 (d) calcular un parámetro de la curva secundario a partir de la curva trazada o calculada en la etapa (c); y
(e) determinar la presencia o ausencia de dicho anticuerpo basándose en una combinación de:
- (i) la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno determinada en la etapa (b); y
50 (ii) dicho parámetro de la curva secundario determinado en la etapa (d).

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar dos o más anticuerpos en una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, comprendiendo el método las etapas de:

- 55 (a) poner en contacto dicha muestra de prueba con un panel que comprende dos o más conjuntos de antígenos, en el que cada uno de dichos antígenos en dicho panel es específico para al menos uno de dichos dos o más anticuerpos;
(b) detectar complejos de dichos antígenos unidos a anticuerpos presentes en dicha muestra de prueba;
(c) para cada antígeno trazar o calcular una curva separada de la cantidad de dicha unión específica frente a la
60 cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (a);
(d) calcular un parámetro de la curva secundario para cada curva trazada o calculada en la etapa (c); y
(e) determinar la presencia o ausencia de dichos dos o más anticuerpos basándose en una combinación de:
- (i) la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno determinada en la etapa (b); y
65 (ii) dicho parámetro de la curva secundario determinado en la etapa (d),

para cada una de las curvas trazadas o calculadas en la etapa (c).
 En todos los aspectos de la invención, el sujeto mamífero es preferiblemente un ser humano.

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

Una característica clave de la invención en todos sus aspectos es la determinación de un parámetro de la curva secundario y el hallazgo de que el uso de este parámetro de la curva secundario, en combinación con la cantidad de unión específica entre un anticuerpo en la muestra de prueba y el antígeno, aumenta la especificidad de los métodos de la invención, es decir, reduce el número de resultados positivos falsos, en comparación con los ensayos basados únicamente en la cantidad de unión específica entre un anticuerpo en la muestra de prueba. Debido a la baja incidencia de cáncer de pulmón en la población, el valor predictivo positivo (VPP) se basa principalmente en la especificidad del ensayo y este aumento en la especificidad aumenta el VPP.

En ciertas realizaciones, el aumento en la especificidad proporcionada por el método de doble corte permite que se aplique un mayor número de antígenos a la muestra de prueba simultáneamente, aumentando la sensibilidad, es decir, disminuyendo el número de resultados falsos negativos, con respecto a los métodos de la técnica anterior. En ciertas realizaciones, el aumento en la especificidad proporcionado por los métodos de la invención permite que se apliquen antígenos adicionales o variantes de antígenos múltiples a la muestra de prueba, aumentando la sensibilidad de los métodos de ensayo. Este enfoque es contrario a las investigaciones previas realizadas en esta área, que se centraron en el intento de identificar antígenos individuales que demuestran la mayor sensibilidad posible. El presente método aumenta la especificidad del ensayo, y por lo tanto del VPP, permitiendo que la sensibilidad del ensayo se incremente ensayando múltiples antígenos, con el método de doble corte, lo que evita una disminución resultante en la especificidad que se esperaría al analizar antígenos múltiples usando métodos de la técnica anterior. Esto evita la necesidad de identificar antígenos individuales que demuestren una sensibilidad particularmente alta.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1. Representación esquemática para demostrar la derivación de los parámetros de la curva secundarios: A = Pendiente, Ordenada en el origen, Área bajo la curva (AUC) y PendienteMax. B = constante de disociación (Kd).

Figura 2. Ejemplo de un conjunto de curvas de titulación obtenidas para la unión del anticuerpo a un panel de siete antígenos asociados a tumores:

(--▲-- p53), (-◆-- SOX2), (—▲— CAGE), (-□-- NY-ESO-1), (—◆— BU4-5), (---●--- MAGE A4), (---◇--- HuD) más un control (-■-- VOL).

Figura 3. Parámetros de curvas secundarias. Gráficos del parámetro de la curva secundario frente a la unión anticuerpo/antígeno (expresado en unidades de referencia calibradas (RU)) para p53. Tanto la reducción de regresión de datos lineal (diagrama de la izquierda) como logarítmica (diagrama de la derecha) se dan para cada parámetro. A = pendiente, B = ordenada en el origen, C = AUC, D = PendienteMax. Siete resultados del panel de antígenos obtenidos usando solo el corte comercial (es decir, EarlyCDT-Lung) para la unión anticuerpo/antígeno se codifican de la siguiente manera: ○ = verdaderos positivos, x = falsos positivos, Δ = verdaderos negativos, □ = falsos negativos. - · - · - · - representa el valor de corte estándar para la unión anticuerpo/antígeno.

Figura 4. Desarrollo de parámetros de la curva secundarios óptimos. Gráficos de los parámetros de la curva secundarios óptimos frente a la unión anticuerpo/antígeno (expresado en unidades de referencia calibradas (RU)) para el panel de siete antígenos; (A = p53), (B = SOX2), (C = CAGE), (D = NY-ESO-1), (E = MAGE A4), (F = HuD). Siete resultados del panel de antígenos obtenidos utilizando solo el corte comercial (es decir, EarlyCDT-Lung) para la unión anticuerpo/antígeno se codifican de la siguiente manera: ○ = verdaderos positivos, X = falsos positivos, A = verdaderos negativos, □ = falsos negativos. - · - · - · - representa el valor de corte estándar para la unión anticuerpo/antígeno. ----- representa el corte del parámetro de la curva secundario. El área sombreada en gris representa la zona de positividad.

Figura 5. Confirmación en un conjunto de muestras independiente. Gráficos de parámetro de la curva secundario óptimo frente a la unión anticuerpo/antígeno (expresado en unidades de referencia (RU)) calibradas para el panel de siete antígenos; (A = p53), (B = SOX2), (C = CAGE), (D = NY-ESO-1), (E = MAGE A4), (F = HuD). Los datos del conjunto de ensayo se muestran a la izquierda y los datos del conjunto de confirmación se muestran a la derecha. Siete resultados del panel de antígenos obtenidos utilizando solo el corte comercial (es decir, EarlyCDT-Lung) para la unión anticuerpo/antígeno se codifican de la siguiente manera: ○ = verdaderos positivos, X = falsos positivos, Δ = verdaderos negativos, □ = falsos negativos. - · - · - · - representa el valor de corte estándar para la unión anticuerpo/antígeno. ----- representa el corte del parámetro de la curva secundario. El área sombreada en gris representa la zona de positividad.

Figura 6. Mejora en el rendimiento del panel mediante la incorporación de antígenos adicionales. Gráficos del parámetro de la curva secundario óptimo frente a la unión anticuerpo/antígeno (expresado en unidades de

referencia (RU) calibradas) para cuatro antígenos adicionales; (A = alfa enolasa), (B = citoqueratina 8), (C = citoqueratina 20), (D = Lmyc2). Siete resultados del panel de antígenos obtenidos utilizando solo el corte comercial (es decir, EarlyCDT-Lung) para la unión anticuerpo/antígeno se codifican de la siguiente manera: \circ = verdaderos positivos, \times = falsos positivos, Δ = verdaderos negativos, \square = falsos negativos. - - - - - representa el valor de corte estándar para la unión anticuerpo/antígeno. ----- representa el corte del parámetro de la curva secundario. El área sombreada en gris representa la zona de positividad.

Figura 7. Mejora en el rendimiento del panel mediante la incorporación de variantes y antígenos mutados. Gráficos del parámetro de la curva secundario óptimo frente a la unión anticuerpo/antígeno (expresado en unidades de absorbancia) para las siete mutaciones o variantes seleccionadas para ser incluidas en el panel final; (A = p53-C term), (B = Kras G12C/Q61H), (C = p53 C-BirA), (D = Kras Q61H), (E = EGFR1-EP), (F = Kras G13C/Q61H) y (G = p53-95). Siete resultados del panel de antígenos obtenidos usando solo el corte comercial (es decir, EarlyCDT-Lung) para la unión anticuerpo/antígeno se codifican de la siguiente manera: \circ = verdaderos positivos, \times = falsos positivos, Δ = verdaderos negativos, \square = falsos negativos. - - - - - representa el valor de corte estándar para la unión anticuerpo/antígeno. ----- representa el valor de corte del parámetro de la curva secundario. El área sombreada en gris representa la zona de positividad.

Figura 8: Desarrollo de un panel de diagnóstico para CHC, que incorpora parámetros de la curva secundarios. Gráficos del parámetro de la curva secundario frente a la unión anticuerpo/antígeno (expresada en unidades de densidad óptica (OD)) para un panel inicial de seis antígenos en dos concentraciones de antígeno; (A = p53), (B = SOX2), (C = CAGE), (D = NY-ESO-1), (E = MAGE A4), (F = CK8), (i = antígeno a una concentración de 50 nM, ii = antígeno a una concentración de 160 nM). La clase de enfermedad de la cohorte se codifica de la siguiente manera: \circ = CHC, \times = enfermedad hepática benigna, \square = normal sano equiparable. Representa el corte relativo. El corte horizontal representa el corte estándar de unión anticuerpo/antígeno y el corte vertical representa el corte del parámetro de la curva secundario. El área sombreada en gris oscuro representa la zona de positividad.

Figura 9: Adición de antígenos a un panel de diagnóstico para CHC, incorporando parámetros de la curva secundarios. Gráficos del parámetro de la curva secundario frente a la unión anticuerpo/antígeno (expresado en unidades de densidad óptica (OD)) para seis antígenos adicionales en dos concentraciones; (A = AFP), (B = p62), (C = SSSX1), (D = HDGF), (E = VTN10), (F = IMP1), (i = antígeno a una concentración de 50 nM, ii = antígeno a una concentración de 160 nM) La clase de enfermedad de la cohorte se codifica de la siguiente manera: \circ = CHC, \times = enfermedad hepática benigna, \square = normal sano equiparable. ----- representa el corte relativo. El corte horizontal representa el corte estándar de unión anticuerpo/antígeno y el corte vertical representa el corte del parámetro de la curva secundario. El área sombreada en gris oscuro representa la zona de positividad.

Descripción detallada de la invención

La invención en general proporciona un método de inmunoensayo para detectar un anticuerpo, caracterizado por que una muestra a analizar para detectar la presencia del anticuerpo se analiza para determinar la unión específica contra diferentes cantidades de antígeno específico para dicho anticuerpo y una curva de titulación producida para anticuerpo/antígeno unión frente a la cantidad de antígeno probado. A continuación, se calcula un parámetro de la curva secundario a partir de la curva y se determina la presencia del anticuerpo en función de la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno y el parámetro de la curva secundario.

Los inventores han establecido que la unión antígeno/anticuerpo en muestras negativas (por ejemplo, muestras de pacientes normales) previamente categorizadas como falsos positivos muestran características de curva diferentes que la unión específica en muestras positivas. El uso de un método de doble corte, que examina tanto la cantidad de unión antígeno/anticuerpo como un parámetro de la curva secundario, por lo tanto, reduce el número de resultados positivos falsos, aumentando la especificidad. Debido a la baja incidencia de cáncer de pulmón en la población, el Valor Predictivo Positivo (VPP) se basa principalmente en la especificidad del ensayo y, por lo tanto, el método de la invención también aumenta el VPP en relación con los ensayos en función de la cantidad de unión específica entre un anticuerpo en la muestra de prueba.

Por lo tanto, en una realización no limitativa, la invención proporciona un método para detectar un anticuerpo en una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) poner en contacto dicha muestra de prueba con una pluralidad de diferentes cantidades de un antígeno específico para dicho anticuerpo;
- (b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno;
- (c) trazar o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (a);
- (d) calcular un parámetro de la curva secundario a partir de la curva trazada o calculada en la etapa (c); y
- (e) determinar la presencia o ausencia de dicho anticuerpo basándose en una combinación de:

- (i) la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno determinada en la etapa (b); y
- (ii) dicho parámetro de la curva secundario determinado en la etapa (d).

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

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

20 En el contexto de la presente invención, el término "antígeno" se utiliza para referirse a un reactivo inmunoespecífico que forma complejos con los anticuerpos presentes en la muestra de prueba. Un antígeno es una sustancia que comprende al menos un determinante antigénico o epítipo capaz de interaccionar específicamente con el anticuerpo diana que se desea detectar, o cualquier agente de captura que interacciona específicamente con la región variable o regiones determinantes de la complementariedad de dicho anticuerpo. El antígeno será generalmente una
25 macromolécula biológica de origen natural o sintético tal como, por ejemplo, una proteína o péptido, un polisacárido o un ácido nucleico, y puede incluir anticuerpos o fragmentos de los mismos tales como anticuerpos anti-idiotipo.

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

En los métodos de la invención, la cantidad relativa o absoluta de unión específica entre anticuerpo y antígeno se determina para cada cantidad diferente de antígeno (determinante antigénico o epítipo) probada y se usa para trazar o calcular una curva de la cantidad (relativa o absoluta) de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno probada. La presencia en la muestra de prueba de anticuerpo reactivo con el antígeno usado en el ensayo se determina basándose en la cantidad de unión específica observada para cada cantidad de antígeno y generalmente está indicada por una curva dosis-respuesta que generalmente es sigmoidea o en forma de S. Si no hay variación en la unión detectable a lo largo de las diferentes cantidades de antígeno probadas, entonces esto puede considerarse como una ausencia de una cantidad detectable del anticuerpo.
45

En una realización, la presencia o ausencia de anticuerpo se determina por comparación tanto de la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno como del parámetro de la curva secundario con valores de corte predeterminados. Aquí, se traza una curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación, y se compara el nivel de unión en muestras positivas conocidas (por ejemplo, poblaciones de pacientes con enfermedad) con el nivel de unión observado en muestras negativas conocidas (por ejemplo, individuos normales) en estudios de caso-control. Los valores de corte para la unión de anticuerpos en uno o más puntos en la curva de titulación se eligen para maximizar la sensibilidad (pocos falsos negativos) mientras se mantiene una alta especificidad (pocos falsos positivos). Siempre que la curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de valoración sea una curva de dosis-respuesta, se considera positiva una medición si la cantidad de unión específica determinada para uno o más puntos en la curva de titulación está por encima del punto de corte determinado.
50

Una medida de la cantidad absoluta de anticuerpo presente en una muestra particular puede derivarse, si se desea, de los resultados de los ensayos de titulación de antígeno.
60

Parámetros de la curva secundaria

Tras la detección de la cantidad de unión antígeno/anticuerpo para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación, y el trazado de una curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación, se calcula un parámetro de la curva secundario. El parámetro
65

de la curva secundario se puede calcular a partir de una curva de regresión lineal o logarítmica. En la presente memoria, un parámetro de la curva secundario es cualquier valor calculado que proporciona una indicación de la naturaleza de la curva. Por ejemplo, el parámetro de la curva secundario puede ser Pendiente, Ordenada en el origen, Área bajo la curva (AUC), PendienteMax o la constante de disociación (Kd). Estos parámetros de la curva secundarios se ilustran en la Figura 1.

La pendiente se calcula usando la ecuación:

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

donde b es la Pendiente, x se refiere a la concentración de antígeno (nM), e y se refiere al valor de OD en unidades de absorbancia (AU).

La pendiente se puede calcular a partir de las curvas de regresión lineal o logarítmica, o de las curvas de regresión tanto lineal como logarítmica, para cada muestra.

La ordenada en el origen de la línea de regresión es el valor de la línea en el eje y cuando x = 0.

La ordenada en el origen puede calcularse a partir de las curvas de regresión lineal o logarítmica, o de las curvas de regresión tanto lineal como logarítmica, para cada muestra.

El área bajo la curva (AUC) puede calcularse usando la regla trapezoidal sumada, que se puede obtener estimando la integral definida entre cada conjunto de concentraciones de antígeno siguiendo la fórmula:

$$\int_a^b f(x) dx \approx (b - a) \left[\frac{f(a) + f(b)}{2} \right].$$

Este cálculo se repite para cada par de concentraciones consecutivas de antígeno y los valores resultantes se suman para dar un valor total para el Área bajo la curva (AUC).

El Área bajo la curva (AUC) se puede calcular a partir de las curvas de regresión lineal o logarítmica, o de las curvas de regresión tanto lineal como logarítmica, para cada muestra.

La PendienteMax puede calcularse usando la misma fórmula que la de la Pendiente, descrita anteriormente. Sin embargo, para determinar el mayor valor posible para la Pendiente para cada muestra, se obtiene un valor de Pendiente para cada par de concentraciones de antígeno consecutivas, donde el valor de Pendiente de mayor magnitud representa la PendienteMax.

La PendienteMax puede calcularse a partir de las curvas de regresión lineal o logarítmica, o de las curvas de regresión tanto lineal como logarítmica, para cada muestra.

La constante de disociación (Kd) se puede calcular ajustando una curva logística de cuatro parámetros para cada conjunto de puntos de titulación y se usa un método de resolución iterativa para dar los valores de los parámetros de la asíntota mínima (A), factor de pendiente (B), punto de inflexión (C) y asíntota máxima (D) usando la fórmula $F(x) = \frac{(A-D)}{1 + ((x/C)^B)} + D$, por lo que la suma de los residuos al cuadrado se minimiza. El punto de inflexión para estos datos de resolución corresponde a la Kd de la unión antígeno-anticuerpo.

En otra realización, el parámetro de la curva secundario puede determinarse ajustando una curva logística, tal como una curva logística de 4 parámetros, a la curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación. En esta realización, el parámetro de la curva secundario puede ser asíntota máxima, asíntota mínima, pendiente de Hill (o factor de pendiente) o punto de inflexión.

Una curva logística de 4 parámetros (4PL) es una curva definida por la fórmula:

$$F(x) = \frac{(A-D)}{1 + ((x/C)^B)} + D,$$

en la que A = mínima asíntota, B = pendiente de Hill (o factor de pendiente), C = punto de inflexión y D = asíntota máxima.

Para determinar los parámetros de la curva secundarios en esta realización, se calcula una curva 4PL para cada muestra y antígeno utilizando una función de resolución iterativa. Aquí los 4 parámetros se establecen en valores cercanos al valor esperado para cada uno, con las siguientes restricciones: el valor de la asíntota mínima se fija en

0, el valor de la pendiente de Hill se limita a valores positivos y el punto de inflexión se limita a un valor máximo de 1000.

5 La diferencia entre cada punto de la curva de titulación y el punto correspondiente en la curva 4PL (expresado por la fórmula $F(x) = ((AD)/(1 + ((x/C)^B))) + D$) puede calcularse, las diferencias elevarse al cuadrado y sumarse los valores de todas las diferencias al cuadrado.

10 Los valores utilizados para los 4 parámetros de la curva secundarios se ajustan luego y la suma de las medias de los cuadrados se calcula repetidamente de forma iterativa hasta que la suma de las medias de los cuadrados es lo más cercana posible a cero. La solución iterativa se puede realizar utilizando la función SOLVER de Microsoft Excel.

15 Una vez que se ha obtenido un parámetro de la curva secundario, se combinará con los datos de unión antígeno/anticuerpo para determinar la presencia o ausencia del anticuerpo. Aquí, la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno se comparará con un valor de corte como se describió anteriormente.

20 El valor de corte para el parámetro de la curva secundario se determina utilizando muestras positivas conocidas (por ejemplo, un conjunto de conjuntos de muestras de casos y controles que consiste en una cohorte de pacientes con enfermedad) y muestras negativas conocidas (p. ej., una cohorte de individuos normales en estudios de caso-control). Para cada muestra, se traza una curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación, y los parámetros de la curva secundarios observados en la muestra positiva conocida (por ejemplo, pacientes con enfermedad) se comparan con los parámetros de la curva secundarios observados en la muestra negativa conocida (por ejemplo, individuos normales). Los valores de corte para los parámetros de la curva secundarios se eligen para maximizar la especificidad (pocos falsos positivos) cuando se usan en combinación con el valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno descrita anteriormente.

30 Cuando se calcula el valor de corte para el parámetro de la curva secundario, también se determina la direccionalidad requerida para una lectura positiva, es decir, si un valor por encima o por debajo del corte se considera positivo. La direccionalidad requerida para una lectura positiva dependerá del antígeno y del parámetro de la curva secundario.

35 Se considera que una medición es finalmente positiva, es decir, indicativa de la presencia de anticuerpos en la muestra de prueba, si está por encima del valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno y demuestra la direccionalidad requerida para una lectura positiva en comparación con el valor de corte para el parámetro de la curva secundario.

40 Los inventores han determinado que incluir un parámetro de la curva secundario en la metodología de ensayo aumenta la especificidad del inmunoensayo, incrementando el valor del predictor positivo (VPP), en comparación con los métodos de la técnica anterior basados únicamente en la cantidad de unión específica entre un anticuerpo en la muestra de prueba.

45 Debe entenderse que aunque la descripción de la invención incluida en la presente memoria se centra en el uso de un único parámetro de la curva en combinación con la medición de la cantidad de unión antígeno/anticuerpo, se contempla el uso de múltiples parámetros de la curva secundarios. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los métodos de la invención utilizan dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más parámetros de la curva secundarios.

50 El método de la invención es ventajoso para su uso en ensayos clínicos de diagnóstico, pronóstico, predicción y/o control en los que las cantidades absolutas de anticuerpos diana presentes y el nivel de unión observado en ausencia del anticuerpo diana pueden variar enormemente de un paciente a otro. Los inventores han observado que si tales ensayos se basan en la detección de unión de anticuerpos usando una sola cantidad/concentración de antígeno de prueba, las muestras de pacientes que contienen una cantidad de anticuerpo que está en el extremo muy bajo o muy alto del rango fisiológico normal de cantidad de anticuerpos en toda la población se puede perder debido a las limitaciones de la metodología de ensayo; las muestras con una cantidad baja de anticuerpo pueden calificarse como resultados negativos falsos, mientras que aquellas con niveles muy altos de anticuerpo pueden estar fuera de la escala para una detección precisa dentro de la metodología de ensayo elegida. El uso del método de titulación en combinación con el cálculo de un parámetro de la curva secundario permite a los inventores tener en cuenta estas diferencias en los niveles de anticuerpos y las diferencias en el nivel de unión observado.

60 El método de ensayo de titulación de antígenos de doble corte de la invención también es particularmente adecuado para la detección de anticuerpos como marcadores biológicos del estado patológico o susceptibilidad a la enfermedad en los que existe una variación considerable de un paciente a otro en la especificidad y afinidad de los anticuerpos por el antígeno diana. Las respuestas de anticuerpos por su propia naturaleza pueden variar significativamente de un paciente a otro, y la variación se produce tanto en las cantidades absolutas de anticuerpos presentes como en la especificidad y/o afinidad de los anticuerpos. El método de la invención puede tener en cuenta esta variación de paciente a paciente, permitiendo así que se desarrolle un formato de ensayo estándar para cualquier anticuerpo dado.

Por lo tanto, en una realización no limitativa, la invención proporciona un método para detectar un estado patológico o susceptibilidad a la enfermedad en un sujeto mamífero, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (a) poner en contacto una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de dicho sujeto mamífero con una pluralidad de diferentes cantidades de un antígeno específico de un anticuerpo asociado con dicho estado patológico o susceptibilidad a la enfermedad;
- (b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno;
- (c) trazar o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (a);
- 10 (d) calcular un parámetro de la curva secundario a partir de la curva trazada o calculada en la etapa (c); y
- (e) determinar la presencia o ausencia de dicho estado patológico o susceptibilidad a la enfermedad basándose en una combinación de:
- 15 (i) la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno determinada en la etapa (b); y
- (ii) dicho parámetro de la curva secundario determinado en la etapa (d).

En una realización preferida de cada aspecto de la invención, el anticuerpo es un autoanticuerpo. La medición de las interacciones entre los autoanticuerpos y sus antígenos diana es complicada debido a la unión no específica de anticuerpos en pacientes normales, lo que puede presentarse como un resultado falso positivo. Los métodos de la invención son particularmente ventajosos para la detección de la unión de autoanticuerpos porque permiten que esta unión no específica de baja afinidad se distinga de la unión específica entre un antígeno, tal como un antígeno tumoral, y su autoanticuerpo.

20

Los métodos de la invención también proporcionan una protección contra la variación diaria en el rendimiento de inmunoensayos usados para la detección de autoanticuerpos/anticuerpos con fines de diagnóstico, pronóstico y/o control (estado patológico o terapia). A menudo se observa que puede haber una considerable variación de un día a otro en la intensidad de la señal al realizar inmunoensayos para la detección de anticuerpos en muestras que comprenden fluidos corporales del paciente. Dicha variación podría surgir, por ejemplo, debido a las diferencias en la forma en que las muestras se obtuvieron y almacenaron antes de la prueba. Tales factores hacen que sea difícil puntuar los resultados de los ensayos clínicos con certeza, por ejemplo, basándose en un valor umbral simple de unión anticuerpo/antígeno. La presente invención minimiza los efectos de dicha variación diaria ya que es probable que el parámetro de la curva secundario varíe menos día a día que la medición de un nivel de señal absoluto.

25

30

Otras ventajas adicionales del método de la invención con respecto a los métodos que utilizan solo una única concentración de antígeno son que permite un intervalo dinámico de ensayo más amplio que los métodos que utilizan una única concentración de antígeno. Esto significa que rara vez se requiere una dilución adicional de la muestra del paciente para llevar el resultado dentro del rango dinámico, y también que generalmente producirá el mismo resultado de detección cualitativa (positivo/negativo) utilizando fluidos corporales de diferentes fuentes en un individuo (p.ej., o suero frente a líquido de ascitis o derrame pleural), aunque la concentración absoluta de anticuerpos puede ser diferente en los diferentes fluidos. También significa que se debe mejorar la sensibilidad analítica a muestras bajas con baja abundancia de anticuerpos.

35

40

Formatos de ensayo

Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo en cualquier formato adecuado que permita el contacto entre una muestra sospechosa de contener el anticuerpo y múltiples cantidades diferentes de un antígeno. Convenientemente, el contacto entre la muestra y diferentes cantidades del antígeno puede tener lugar en cámaras de reacción separadas pero paralelas, tales como los pocillos de una placa de microtitulación. Se pueden recubrir cantidades variables del antígeno sobre los pocillos de la placa de microtitulación preparando diluciones seriadas a partir de muestras de reserva de antígeno en los pocillos de la placa de microtitulación. Las muestras de reserva de antígeno pueden ser de concentración conocida o desconocida. Se pueden añadir alícuotas de la muestra de prueba a los pocillos de la placa, con el volumen y la dilución de la muestra de prueba mantenidos constantes en cada pocillo. Las cantidades absolutas de antígeno añadidas a los pocillos de la placa de microtitulación pueden variar dependiendo de factores tales como la naturaleza del anticuerpo diana, la naturaleza de la muestra en prueba, la dilución de la muestra de prueba, etc. como apreciarán los expertos en la técnica. Generalmente, las cantidades de antígeno y la dilución de la muestra de prueba se seleccionarán para producir un rango de intensidades de señal que caigan dentro del rango de detección aceptable de la lectura elegida para la detección de la unión anticuerpo/antígeno en el método. Convenientemente, las cantidades probadas de antígeno pueden variar en el intervalo de 1,6 nM a 160 mM.

45

50

55

60

Como se mencionó anteriormente, también es posible construir una curva de titulación comenzando con una muestra de reserva única de antígeno incluso cuando se desconoce la concentración absoluta de antígeno en la muestra de reserva. Siempre que se use la misma solución de reserva individual y se diluya en serie de la misma manera, es posible comparar los resultados de los ensayos de titulación separados para esta prueba de antígeno en diferentes muestras de prueba de partida. El método de doble corte de la presente solicitud es particularmente ventajoso en este escenario, ya que el parámetro de la curva secundario será consistente independientemente de si

65

se conoce la dilución absoluta del antígeno.

En una realización adicional de la invención, pueden inmovilizarse diferentes cantidades del antígeno (determinantes antigénicos o epítomos) en ubicaciones discretas o sitios de reacción en un soporte sólido. El soporte completo puede a continuación ponerse en contacto con la muestra de prueba y detectar o medir por separado la unión del anticuerpo al antígeno detectado en cada una de las ubicaciones discretas o sitios de reacción. Los soportes sólidos adecuados también incluyen micromatrices, por ejemplo matrices en las que los sitios o manchas discretos en la matriz comprenden diferentes cantidades del antígeno. Las micromatrices pueden prepararse inmovilizando diferentes cantidades de un antígeno particular en sitios de reacción discretos y resolubles en la matriz. En otras realizaciones, la cantidad real de moléculas de antígeno inmovilizadas puede mantenerse sustancialmente constante, pero el tamaño de los sitios o manchas en la matriz varía con el fin de alterar la cantidad de epítomo de unión disponible, proporcionando una serie de titulación de sitios o manchas con diferentes cantidades de epítomo de unión disponible. En tales realizaciones, la concentración superficial bidimensional del epítomo o epítomos de unión en el antígeno es importante en la preparación de la serie de titulación, en lugar de la cantidad absoluta de antígeno. Las técnicas para la preparación y análisis de micromatrices de proteína/péptido son generalmente conocidas en la técnica.

Se entenderá a partir de la descripción anterior que en todas las realizaciones de la invención, la variación en la cantidad de antígeno se puede lograr cambiando el antígeno o la densidad del epítomo contra el que se prueba la muestra, o manteniendo la densidad del antígeno o del epítomo pero aumentando el área superficial sobre la cual el antígeno está inmovilizado, o ambos. Se pueden utilizar micromatrices para realizar múltiples ensayos de anticuerpos de diferente especificidad en una sola muestra en paralelo. Esto se puede hacer usando matrices que comprenden múltiples conjuntos de antígenos, comprendiendo cada conjunto un antígeno particular en múltiples cantidades o concentraciones diferentes.

El término "antígeno" se usa en la presente memoria en un sentido amplio para referirse a cualquier sustancia que muestre reactividad inmunológica específica con un anticuerpo diana a detectar. Los antígenos adecuados pueden incluir, pero sin limitación, proteínas de origen natural, proteínas o polipéptidos recombinantes o sintéticos, péptidos sintéticos, péptidomiméticos, polisacáridos y ácidos nucleicos. Específicamente, cuando se usa "antígeno" en la presente memoria, se pretende abarcar cualquier agente de captura, ya sea de origen humano, de origen mamífero o de otro modo, capaz de interacción inmunológica específica con las regiones determinantes variables o complementarias del anticuerpo a detectar. Por ejemplo, los anticuerpos antiidiotípicos se pueden considerar como un antígeno para este fin, como los antígenos generados por presentación del fago. Un conjunto de antígenos (o un conjunto de un antígeno) se refiere a un único antígeno a analizar en diferentes cantidades/concentraciones en el método de la invención.

En la presente memoria, la expresión "antígenos distintos" abarca antígenos derivados de diferentes proteínas o polipéptidos (tales como antígenos derivados de proteínas no relacionadas codificadas por genes diferentes) y también antígenos que se derivan de epítomos peptídicos diferentes de una sola proteína o polipéptido. Un conjunto de antígenos distintos se refiere a un único antígeno a analizar en diferentes cantidades/concentraciones en el método de la invención. Una micromatriz dada puede incluir exclusivamente conjuntos de antígenos distintos derivados de diferentes proteínas o polipéptidos, o exclusivamente conjuntos de antígenos distintos derivados de diferentes epítomos peptídicos de una sola proteína o polipéptido, o una mezcla de los dos en cualquier proporción. Debe observarse que cada conjunto individual de antígenos de diferentes cantidades o concentraciones en cualquier realización de la invención generalmente comprenderá solo un antígeno y no mezclas de los mismos.

La expresión "variante de antígeno" se usa en la presente memoria para referirse a variantes alélicas u otras variantes de un único antígeno, tal como un único antígeno de proteína como se definió anteriormente. Las variantes de antígeno generalmente se derivarán de un solo gen, y diferentes variantes de antígeno se pueden expresar en diferentes miembros de la población o en estados de enfermedad diferentes. Las variantes de antígeno pueden diferir por secuencia de aminoácidos o por una modificación postraduccionales tal como glicosilación, fosforilación o acetilación. Además, la expresión "variante de antígeno" abarca mutaciones de antígeno tales como sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Generalmente, una variante de antígeno contendrá menos de cinco (por ejemplo, menos de cuatro, menos de tres, menos de dos o una) mutaciones relativas al antígeno de tipo silvestre. Un conjunto de variantes de antígenos se refiere a una única variante de antígeno a analizar en diferentes cantidades/concentraciones en el método de la invención.

Una matriz útil para los métodos de la presente invención puede comprender múltiples conjuntos de antígenos distintos, conjuntos múltiples de variantes de antígenos o conjuntos múltiples de ambos antígenos distintos y variantes de antígenos, comprendiendo cada conjunto un antígeno particular en múltiples cantidades o concentraciones diferentes. Específicamente, una matriz puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más conjuntos de antígenos.

Ciertos antígenos pueden comprender o derivar de proteínas o polipéptidos aislados de fuentes naturales, que incluyen pero no se limitan a proteínas o polipéptidos aislados de tejidos del paciente o fluidos corporales (p.ej.

- plasma, suero, sangre total, orina, sudor, linfa, heces, líquido cefalorraquídeo), ascitis, derrame pleural, líquido seminal, esputo, aspirado de pezón, seroma postoperatorio y líquido de drenaje de la herida). En tales realizaciones, el antígeno puede comprender sustancialmente la totalidad de la proteína de origen natural, es decir, proteína sustancialmente en la forma en que se aísla de la fuente natural, o puede comprender un fragmento de la proteína de origen natural. Para ser eficaz como un antígeno en el método de la invención, cualquier "fragmento" de este tipo debe retener la reactividad inmunológica con los anticuerpos para los que se usará para analizar. Los fragmentos adecuados podrían, por ejemplo, prepararse por escisión química o enzimática de la proteína aislada.
- Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "fluido corporal", cuando se refiere al material a analizar para detectar la presencia de anticuerpos usando el método de la invención, incluye *inter alia* plasma, suero, sangre total, orina, sudor, linfa, heces, líquido cefalorraquídeo, ascitis, derrame pleural, líquido seminal, esputo, aspirado de pezón, seroma postoperatorio, saliva, líquido amniótico, lágrimas o líquido de drenaje de la herida. Como se mencionó anteriormente, los métodos de la invención se llevan a cabo preferiblemente *in vitro* en una muestra de prueba que comprende fluido corporal extraído del sujeto de prueba. El tipo de fluido corporal utilizado puede variar dependiendo de la identidad del anticuerpo a analizar y la situación clínica en la que se utiliza el ensayo. En general, se prefiere realizar los ensayos en muestras de suero o plasma. La muestra de ensayo puede incluir componentes adicionales además del fluido corporal, tales como, por ejemplo, diluyentes, conservantes, agentes estabilizantes, tampones, etc.
- Dependiendo de la naturaleza precisa del ensayo en el que se utilizará, el antígeno puede comprender una proteína de origen natural, o un fragmento de la misma, unida a una o más moléculas adicionales que imparten alguna característica deseable que no está presente de forma natural en la proteína. Por ejemplo, la proteína o fragmento puede conjugarse con una etiqueta reveladora, tal como, por ejemplo, una etiqueta fluorescente, una etiqueta coloreada, una etiqueta luminiscente, un radiomarcador o un metal pesado tal como oro coloidal. En otras realizaciones, la proteína o fragmento puede expresarse como una proteína de fusión. A modo de ejemplo, las proteínas de fusión pueden incluir un péptido marcador en el extremo N o C para facilitar la purificación del antígeno expresado de forma recombinante.
- Dependiendo del formato del ensayo en el que se va a usar, el antígeno se puede inmovilizar sobre un soporte sólido tal como, por ejemplo, los pocillos de una placa de microtitulación, microperlas o microgránulos o microesferas magnéticas. La inmovilización puede efectuarse mediante adsorción no covalente, unión covalente o mediante etiquetas.
- Se puede usar cualquier medio de unión adecuado siempre que esto no afecte negativamente a la capacidad del antígeno para reaccionar inmunológicamente con el anticuerpo diana en un grado significativo.
- La invención no se limita a ensayos en fase sólida, sino que también abarca ensayos que, en su totalidad o en parte, se llevan a cabo en fase líquida, por ejemplo ensayos de perlas en fase de solución o ensayos de competencia.
- En una realización, los antígenos pueden marcarse con un ligando que facilitaría la inmovilización, tal como la biotina. Luego, el antígeno se puede diluir a un rango de valoración adecuado y se le permite reaccionar con anticuerpos en muestras de pacientes en solución. Los inmunocomplejos resultantes se pueden inmovilizar en un soporte sólido a través de una interacción ligando-receptor (por ejemplo, biotina-estreptavidina) y el resto del ensayo se realiza como se describe a continuación.
- Para facilitar la producción de antígenos biotinilados para su uso en los métodos de ensayo de la invención, los ADNc que codifican un antígeno de longitud completa, una versión truncada del mismo o un fragmento antigénico del mismo se pueden expresar como una proteína de fusión marcada con una proteína o etiqueta polipeptídica a la que el cofactor de biotina se puede unir, por ejemplo, a través de una reacción enzimática.
- Los vectores para la producción de antígenos biotinilados recombinantes están disponibles en el mercado a partir de varias fuentes. En otra alternativa, los antígenos biotinilados pueden producirse por enlace covalente de biotina a la molécula de antígeno después de la expresión y purificación.
- Como se mencionó anteriormente, el "inmunoensayo" usado para detectar anticuerpos de acuerdo con la invención puede basarse en técnicas estándar conocidas en la técnica, con la excepción de que se usan múltiples cantidades de antígeno para crear una curva de titulación y la curva se analiza posteriormente para calcular un parámetro de la curva secundario. En una realización la más preferida, el inmunoensayo puede ser un ELISA. Los ELISA son generalmente bien conocidos en la técnica. En un ELISA "indirecto" típico, un antígeno que tiene especificidad por los anticuerpos de prueba, se inmoviliza sobre una superficie sólida (por ejemplo, los pocillos de una placa de ensayo de microtitulación estándar, o la superficie de una microperla o una micromatriz) y una muestra que comprende fluido corporal a probar para detectar la presencia de anticuerpos se pone en contacto con el antígeno inmovilizado. Cualquier anticuerpo de la especificidad deseada presente en la muestra se unirá al antígeno inmovilizado. Los complejos anticuerpo/antígeno unidos pueden detectarse entonces usando cualquier método adecuado. En una realización preferida, se usa un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina humana marcado, que reconoce específicamente un epítipo común a una o más clases de inmunoglobulinas humanas, para detectar

los complejos anticuerpo/antígeno. Generalmente, el anticuerpo secundario será anti-IgG o anti-IgM. El anticuerpo secundario normalmente está marcado con un marcador detectable, generalmente un marcador enzimático tal como, por ejemplo, peroxidasa o fosfatasa alcalina, que permite la detección cuantitativa mediante la adición de un sustrato para la enzima que genera un producto detectable, por ejemplo un producto de color, quimioluminiscente o fluorescente. Se pueden usar otros tipos de marcadores detectables conocidos en la técnica con un efecto equivalente.

Identidad de los anticuerpos

En algunas realizaciones, el anticuerpo detectado mediante el método de la invención se puede asociar con una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad. Es decir, el anticuerpo puede ser un marcador biológico de un estado patológico o susceptibilidad a una enfermedad. Dentro de esta realización, los métodos de la invención pueden usarse para detectar un estado patológico o una susceptibilidad a una enfermedad.

En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo puede ser un autoanticuerpo. El término "autoanticuerpo" se refiere a un anticuerpo de origen natural dirigido a un antígeno que el sistema inmunitario de un individuo reconoce como extraño a pesar de que ese antígeno en realidad se originó en el individuo. Los autoanticuerpos incluyen anticuerpos dirigidos contra formas alteradas de proteínas de origen natural producidas por una célula enferma o durante un proceso de enfermedad. La forma alterada de la proteína se origina en el individuo pero puede ser vista por el sistema inmunitario del individuo como "no propia" y por lo tanto provocar una respuesta inmunitaria en ese individuo en forma de autoanticuerpos inmunológicamente específicos para la proteína alterada. Tales formas alteradas de una proteína pueden incluir, por ejemplo, mutantes que tienen una secuencia de aminoácidos alterada, opcionalmente acompañados por cambios en la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, formas truncadas, variantes de corte y empalme, glicofomas alteradas, etc. En otras realizaciones, el autoanticuerpo puede dirigirse a una proteína que se sobreexpresa en un estado patológico, o como resultado de la amplificación génica o regulación transcripcional anormal. La sobreexpresión de una proteína que normalmente no se encuentra en las células del sistema inmunitario en cantidades significativas puede desencadenar una respuesta inmunitaria que conduzca a la producción de autoanticuerpos. En otras realizaciones más, el autoanticuerpo puede dirigirse a una forma fetal de una proteína que se expresa en un estado patológico. Si una proteína fetal que normalmente se expresa solo en etapas tempranas del desarrollo antes de que el sistema inmunitario sea funcional, se expresa en un estado patológico, la forma fetal expresada en un estado patológico en el ser humano completamente desarrollado puede ser reconocida por el sistema inmunitario como "extraña", desencadenando una respuesta inmunitaria que conduce a la producción de autoanticuerpos.

En una realización, el anticuerpo puede ser un autoanticuerpo específico de una proteína marcadora tumoral, y más particularmente un autoanticuerpo antitumoral "asociado al cáncer". La expresión "autoanticuerpo antitumoral asociado al cáncer" se refiere a un autoanticuerpo que se dirige contra un epítipo presente en formas de proteínas marcadoras tumorales que se expresan preferentemente en el estado patológico de cáncer. La presencia de tales autoanticuerpos es característica del estado patológico de cáncer, o de predisposición al cáncer en pacientes asintomáticos.

En aplicaciones preferidas, el método de la invención se usará para detectar la presencia de autoanticuerpos antitumorales asociados al cáncer en sujetos humanos o pacientes, y lo más preferiblemente adoptará la forma de un inmunoensayo *in vitro*, realizado en una muestra de prueba que comprende una muestra de fluido corporal tomada del sujeto/paciente. La muestra de fluido corporal se puede diluir en un tampón adecuado o se puede tratar para almacenamiento a largo plazo o de lo contrario antes de la prueba.

Los inmunoensayos *in vitro* no son invasivos y pueden repetirse tantas veces como se considere necesario para desarrollar un perfil de producción de autoanticuerpos en un paciente, ya sea antes de la aparición de la enfermedad, como en el cribado de individuos "en riesgo" o durante todo el curso de la enfermedad (descrito más detalladamente en relación con las aplicaciones preferidas del método).

Ensayos de panel

Como se ha descrito anteriormente, el uso de un doble corte en los métodos de la invención aumenta la especificidad, es decir, reduce el número de resultados positivos falsos. Este aumento en la especificidad permite aplicar un mayor número de antígenos a la muestra de prueba simultáneamente, aumentando la sensibilidad, es decir, menos falsos negativos de lo que se esperaría cuando se aplicaron antígenos adicionales a una muestra de prueba utilizando métodos de la técnica anterior basados solamente en la cantidad de unión específica de un anticuerpo en la muestra de prueba. En ciertas realizaciones, se pueden aplicar antígenos múltiples a la muestra de prueba en forma de un panel.

En una realización particular, pero no limitativa, la invención se refiere, por lo tanto, a un método para detectar dos o más anticuerpos en una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto dicha muestra de prueba con un panel que comprende dos o más conjuntos de antígenos, en el que cada uno de dichos antígenos en dicho panel es específico para al menos uno de dichos dos o más anticuerpos;

(b) detectar complejos de dichos antígenos unidos a anticuerpos presentes en dicha muestra de prueba;

5 (c) para cada antígeno trazar o calcular una curva separada de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (a);

(d) calcular un parámetro de la curva secundario para cada curva trazada o calculada en la etapa (c); y

(e) determinar la presencia o ausencia de dichos dos o más anticuerpos basándose en una combinación de:

10 (i) la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno determinada en la etapa (b); y

(ii) dicho parámetro de la curva secundario determinado en la etapa (d),

para cada una de las curvas trazadas o calculadas en la etapa (c).

15 Estos métodos, que pueden denominarse en lo sucesivo como “ensayos de panel”, utilizan un panel de dos o más conjuntos de antígenos para controlar la respuesta inmunitaria global de un individuo. Estos métodos, por lo tanto, detectan un “perfil” de la respuesta inmunitaria en un individuo dado. En una realización, los “ensayos de panel” utilizan un panel de dos o más conjuntos de antígenos para controlar la respuesta inmunitaria global de un individuo a un tumor u otro cambio carcinogénico/neoplásico. Por lo tanto, estos métodos detectan un “perfil” de la respuesta inmunitaria en un individuo dado, lo que indica qué marcadores tumorales provocan una respuesta inmunitaria que da como resultado la producción de autoanticuerpos.

20 El uso de un panel de dos o más antígenos para controlar la producción de anticuerpos es generalmente más sensible que la detección de anticuerpos a marcadores individuales y da una frecuencia mucho más baja de resultados negativos falsos (ver los documento WO 99/58978, WO 2004/044590 y WO2006/126008). En general, se acepta que la sensibilidad de un ensayo aumentará al analizar múltiples antígenos. Sin embargo, esta mayor sensibilidad se asocia normalmente con una disminución proporcional de la especificidad y los métodos de la técnica anterior están, por lo tanto, limitados en el número de antígenos que pueden usar. Los métodos de la presente invención no están tan limitados debido a que la especificidad incrementada proporcionada por el método de doble corte permite un aumento desproporcionado de la sensibilidad a la pérdida de especificidad cuando se analizan múltiples antígenos. En algunas realizaciones, los métodos de la invención contemplan, por lo tanto, el uso de un panel que comprende antígenos múltiples, tales como aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, , aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20 o más antígenos.

25 En ciertas realizaciones, los dos o más antígenos del panel pueden ser antígenos distintos, como se definió previamente para abarcar antígenos derivados de diferentes proteínas o polipéptidos (tales como antígenos derivados de proteínas no relacionadas codificadas por diferentes genes) y también antígenos que se derivan de diferentes péptidos epitopos de una sola proteína o polipéptido.

30 En otras realizaciones, los dos o más antígenos del panel pueden ser variantes de antígeno, como se definió anteriormente para incluir variantes alélicas u otras variantes de un único antígeno, generalmente derivadas de un único gen. El uso de variantes de antígenos múltiples asegura que se ensayará la variante específica de antígeno expresada por el paciente y/o el tumor en cuestión. Esto aumenta la sensibilidad del método de ensayo, con el método de doble corte de la invención asegurando que este aumento en la sensibilidad no vaya acompañado de una disminución proporcional en la especificidad. Los inventores han observado (Ejemplo 4) que los pacientes individuales pueden producir anticuerpos contra un único antígeno (por ejemplo, p53) que tienen especificidades diferentes. Por lo tanto, parece que no todos los pacientes producen las mismas formas alteradas de antígenos asociados a tumores durante el curso de su enfermedad. La invención por lo tanto contempla el uso de diferentes formas variantes, o mutaciones, de un único antígeno para mejorar el rendimiento del método de la invención.

35 En otras realizaciones más, el panel puede comprender tanto antígenos distintos como variantes de antígenos. Dentro de esta realización, el panel puede comprender inmunoensayos para detectar (simultáneamente) una o más variantes de antígeno (tal como aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20 o más) de uno o más (tales como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho , nueve, diez o más) antígenos distintos.

40 Para cada realización del ensayo de panel, será evidente que el panel comprende un conjunto de cada antígeno (es decir, de cada antígeno distinto y de cada variante de antígeno), en el que un conjunto de antígenos se refiere a un único antígeno a analizar a diferentes cantidades/concentraciones en el método de la invención.

45 Usando los ensayos del panel de la invención, la presencia o ausencia de cada anticuerpo diana se determina usando el método de doble corte para al menos una de las curvas producidas usando el ensayo de panel. Específicamente, la presencia o ausencia de cada anticuerpo diana se determinará en función de una combinación de (i) la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno y (ii) el parámetro de la curva secundario para

una o más de las curvas representadas o calculadas, como uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más de las curvas calculadas.

5 Como se describió anteriormente en relación con ensayos que no son de panel, la presencia o ausencia de anticuerpo se determina por comparación de la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno y el parámetro de la curva secundario con valores de corte predeterminados para cada uno de las curvas calculadas. Aquí, para cada antígeno del panel, se traza una curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación, y se compara el nivel de unión en
10 muestras positivas conocidas (por ejemplo, poblaciones de pacientes con enfermedad) con el nivel de unión observado en muestras negativas conocidas (por ejemplo, individuos normales) en estudios de caso-control para cada antígeno en el panel. Para cada antígeno, los valores de corte para la unión del anticuerpo en uno o más puntos en la curva de titulación se eligen para maximizar la sensibilidad (pocos falsos negativos) mientras se mantiene una alta especificidad (pocos falsos positivos). Siempre que la curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de valoración sea una curva de respuesta a la dosis, una medición se considera positiva si la cantidad de unión específica determinada para uno o más puntos en la curva de titulación está por encima del punto de corte determinado.

20 Una vez que se ha obtenido un parámetro de la curva secundario para cada antígeno, se combinará con los datos de unión antígeno/anticuerpo para determinar la presencia o ausencia del anticuerpo. Aquí, la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno se comparará con un valor de corte como se describió anteriormente.

25 Aquí debe observarse que el parámetro de la curva secundario calculado para cada antígeno dentro del panel no tiene que ser necesariamente el mismo. Sin embargo, en algunas realizaciones, el parámetro de la curva secundario calculado para cada antígeno dentro del panel puede ser el mismo.

30 Para cada antígeno, el valor de corte para el parámetro de la curva secundario se determina utilizando muestras positivas conocidas (por ejemplo, un conjunto de conjuntos de muestras de casos y controles que consiste en una cohorte de pacientes con enfermedad) y muestras negativas conocidas (por ejemplo, una cohorte de individuos normales en estudios de caso-control). Para cada antígeno, se traza una curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación, y los parámetros de la curva secundarios observados en la muestra positiva conocida (por ejemplo, pacientes con enfermedad) se comparan con los parámetros de la curva secundarios para el mismo antígeno observado en la muestra negativa conocida (por ejemplo, individuos normales). Los valores de corte para los parámetros de la curva secundarios se eligen para maximizar la especificidad (pocos falsos positivos) cuando se usan en combinación con el valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno descrito anteriormente.

40 Cuando se calcula el valor de corte para el parámetro de la curva secundario, también se determina la direccionalidad requerida para una lectura positiva, es decir, si un valor por encima o por debajo del corte se considera positivo. La direccionalidad requerida para una lectura positiva dependerá del antígeno y del parámetro de la curva secundario.

45 Se considera que una medición es finalmente positiva, es decir, indicativa de la presencia de anticuerpos en la muestra de prueba, si está por encima del valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno y además demuestra la direccionalidad requerida para una lectura positiva en comparación con el valor de corte para el parámetro de la curva secundario.

50 En una realización, el ensayo de panel se puede usar para detectar la presencia o ausencia de un estado patológico o susceptibilidad a una enfermedad. Por lo tanto, en una realización, la invención incluye un método para detectar un estado patológico o susceptibilidad a una enfermedad en un sujeto mamífero, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de dicho sujeto mamífero con un panel que comprende dos o más conjuntos de antígenos específicos de los anticuerpos asociados con un estado patológico o susceptibilidad a una enfermedad;
- (b) detectar complejos de dichos antígenos unidos a anticuerpos presentes en dicha muestra de prueba;
- (c) para cada antígeno trazar o calcular una curva separada de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (a);
- (d) calcular un parámetro de la curva secundario para cada curva trazada o calculada en la etapa (c); y
- (e) determinar la presencia o ausencia de dicho estado patológico o susceptibilidad a una enfermedad basándose en una combinación de:

- (i) la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno determinada en la etapa (b); y
- (ii) dicho parámetro de la curva secundario determinado en la etapa (d),

65 para cada una de las curvas trazadas o calculadas en la etapa (c).

Dentro de esta realización, la presencia o ausencia del estado patológico o susceptibilidad a una enfermedad se determina basándose en una combinación de (i) la cantidad de unión específica entre el anticuerpo y el antígeno y (ii) el parámetro de la curva secundaria para una o más de las curvas trazadas o calculadas en la etapa (c) con los valores de corte que se determinan como se ha descrito anteriormente.

5

Proteínas marcadores tumorales

El método de la invención no se limita a la detección de anticuerpos con cualquier especificidad específica. Sin embargo, en una realización, el método de la invención puede adaptarse para su uso en la detección de autoanticuerpos frente a una proteína marcadora tumoral. En la presente memoria, el método se puede relacionar con la detección de autoanticuerpos contra esencialmente cualquier proteína marcador tumoral para la que se pueda preparar un antígeno adecuado, como un único ensayo marcador o como un componente de un ensayo de panel.

10

En particular, el método puede adaptarse para detectar/medir autoanticuerpos contra la proteína receptora del factor de crecimiento epidérmico EGFR (Downward et al (1984) *Nature*. 307: 521-527; Robertson et al. (2001) *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 126:177-81), la glicoproteína MUC1 (Batra, S. K. et al. (1992) *Int. J. Pancreatol.* 12: 271-283), las proteínas de transducción de las señales/ciclo celular Myc (Blackwood, E. M. et al. (1994) *Molecular Biology of the Cell* 5: 597-609), c-myc, L-myc2 (Nau et al., *Nature*, 318(6041), 69-73), p53 (Matlashewski, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3: 3257-3262; Wolf, D. et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 1887-1893) y ras (o Ras) (Capella, G. et al. (1991) *Environ Health Perspectives*. 93: 125-131), y también BRCA1 (Scully, R. et al. (1997) *PNAS* 94: 5605-10), BRCA2 (Sharan, S. K. et al. (1997) *Nature*. 386: 804-810), APC (Su, L. K. et al. (1993) *Cancer Res.* 53: 2728-2731; Munemitsu, S. et al. (1995) *PNAS* 92: 3046-50), CA125 (Nouwen, E. J. et al. (1990) *Differentiation*. 45: 192-8), PSA (Rosenberg, R. S. et al. (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* 248: 935-939), antígeno carcinoembriónico CEA (Duffy, M.J. (2001) *Clin Chem*, Apr 47(4):624-30), CA19.9 (Haga, Y. et al (1989) *Clin Biochem* (1989) Oct 22(5): 363-8), NY-ESO-1, (antígeno de cáncer/testículo; Chen, Y.-T. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 1914-1918, 1997), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata; Israeli, R. S. et al., *Cancer Res.* 53: 227-230, 1993), PSCA (antígeno de las células madre de la próstata; Reiter, R. E. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 1735-1740, 1998) y EpCam (molécula de adhesión celular epitelial; Szala, S. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 3542-3546, 1990), HER2 (también conocido como c-erbB2 Coussens, L. et al., *Science* 230: 1132-1139, 1985), CAGE (Jager D, et al., *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59(24):6197-204; Mashino K, et al., *Br J Cancer.* 2001 Sep 1;85(5):713-20), CAGE1, CAGE2, citoqueratinas (Moll R, et al., *Cell.* 1982 Nov;31(1):11-24; Braun S, et al., *N Engl J Med.* 2000; 342: 525-533), recoverina (Maeda A, et al., *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1914-20, calicreínas (Kim H, et al., *Br J Cancer* 2001;84:643-650; Yousef GM, et al., *Tumor Biol* 2002;23:185-192); anexinas (Hudelist G, et al., *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Aug;86(3):281-91), α -fetoproteína (AFP; Stiller D, et al., *Acta Histochem Suppl.* 1986;33:225-31), GRP78 (Block TM, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Jan 18;102(3):779-84; Hsu WM, et al., *Int J Cancer.* 2005 Mar 1;113(6):920-7), mamoglobina (Zehentner BK, et al., *Clin Chem.* 2004 Nov;50(11):2069-76; Zehentner BK, Carter D. *Clin Biochem.* 2004 Apr;37(4):249-57), raf (Callans LS. et al., *Ann Surg Oncol.* 1995 Jan;2(1):38-42; Pratt MA, et al., *Mol Cell Biochem.* 1998 Dec;189(1-2):119-25), beta-gonadotropina coriónica humana b-HCG (Ayala AR, et al., *Am J Reprod Immunol.* 1983 Apr-May;3(3):149-51; Gregory JJ Jr, et al., *Drugs.* 1999 Apr;57(4):463-7), o antígeno 4-5 (Krause P, et al., *J Immunol Methods.* 2003 Dec;283(1-2):261-7), SOX2 (Stevanovic et al., *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 1994, 5(10), 640-2), GBU4-5 (Krause et al., *J Immunol Methods* 2003; 283: 261-7), MAGE (Serrano, et al., *International journal of cancer.* *Journal international du cancer*, 1999, 83(5), 664-9), HuD (Szabo et al., *Cell*, 1991, 67(2), 325-33), HE4, SALL4 (Al-Baradie et al., *American journal of human genetics*, 2002, 71(5), 1195-9), alfa enolasa (Lee et al., *Arthritis and rheumatism*, 2003, 48(7), 2025-35), p62 (Zhang et al., *The Journal of experimental medicine*, 1999, 189(7), 1101-10), RalA (Bhullar et al., *FEBS Letters*, 1990, 260(1), 48-52), Ciclina B1 (Pines et al., *The Journal of cell biology*, 1991, 115(1), 1-17), Calreticulina R (Opas et al., *Journal of cellular physiology*, 1991,149(1), 160-71), IMP1 (Nielsen et al., *Molecular and cellular biology*, 1999, 19(2), 1262-70), Vitronectinas (p.ej., VTN10; Hayman et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80(13), 4003-7), SSX1 (Crew et al., *The EMBO journal*, 1995, 14(10), 2333-40), TMP21 (Blum et al. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(29), 17183-17189), NPC1L1C (Davies et al., *Genomics*, 2000, 65(2), 137-45), TMD1 (Sung et al., *The Journal of biological chemistry*, 1992, 267(4), 2616-21), CAMK1 (Haribabu et al., *The EMBO journal*, 1995, 14(15), 3679-86), RGS1 (Watson et al., *Nature*, 1996, 383(6596), 172-5), PACSIN1 (Qualmann et al., *Molecular biology of the cell*, 1999, 10(2), 501-13), RCV1 (*Investigative ophthalmology & visual science*, 34(1), 81-90), MAPKAPK3 (Sithanandam et al., *Molecular and cellular biology*, 1996, 16(3), 868-76), Ciclina E2 (Lauper et al., *Oncogene*, 1998, 17(20), 2637-43), citoqueratina 8 (CK8), 18 (CK18), 19 (CK19), 20 (CK20), SCC (Kato et al., *Cancer*, 1977, 40(4), 1621-1628), proGRP, amiloide A sérico (Rosenthal et al., *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 1976,116(5), 1415-8), alfa-1-anti-tripsina (Laurell et al., *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 1963, 15(2), 132-140), apolipoproteína CIII (Ginsberg et al., 1986), timosina β 4 (Dalakas et al., 1986), HDJ1 (Ohtsuka, *Biochemical and biophysical research communications*, 1993, 197(1), 235-40) and HDGF (Zhou et al. (2010). "Overexpressed HDGF as an independent prognostic factor is involved in poor prognosis in Chinese patients with liver cancer." *Diagn Pathol* 5: 58).

Sin embargo, la invención no pretende limitarse a la detección de autoanticuerpos contra estos marcadores tumorales particulares.

65

Aplicaciones de métodos de la invención

Los métodos de ensayo de acuerdo con la invención, y específicamente los métodos que detectan autoanticuerpos dirigidos a proteínas marcadoras tumorales (en forma de ensayo de panel único o panel), pueden emplearse en una variedad de situaciones clínicas diferentes. En particular, el método puede usarse en la detección o diagnóstico del cáncer, en la evaluación del pronóstico de un paciente diagnosticado con cáncer, en la predicción de la respuesta al tratamiento, en el control del progreso del cáncer u otra enfermedad neoplásica en un paciente, en la detección precoz de un cambio neoplásico o carcinogénico en un sujeto humano asintomático, en el cribado de una población de sujetos humanos asintomáticos con el fin de identificar a aquellos sujetos con mayor riesgo de desarrollar cáncer o para diagnosticar la presencia de cáncer, en la predicción de la respuesta de un paciente con cáncer para el tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, resección quirúrgica, vacunación, terapias contra factores de crecimiento o la transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, terapia con anticuerpos humanos, quimioterapia) para controlar la respuesta de un paciente con cáncer al tratamiento anticanceroso (por ejemplo, resección quirúrgica, vacunación, terapias contra factores de crecimiento o transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, quimioterapia con anticuerpos humanos), en la detección de enfermedad recurrente en un paciente previamente diagnosticado con cáncer que se ha sometido a un tratamiento contra el cáncer para reducir la cantidad de cáncer presente, o en la selección de una terapia contra el cáncer (por ejemplo, resección quirúrgica, vacunación, terapias contra factores de crecimiento o transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, quimioterapia con anticuerpos humanos), para uso en un paciente en particular.

Los inventores generalmente han observado que los niveles de autoanticuerpos asociados al cáncer muestran una correlación positiva con el estado de la enfermedad (ver también el documento WO 99/58979). Además, los inventores han observado ahora que ciertos parámetros de la curva secundarios están asociados con un estado patológico. Por lo tanto, cuando el método de la invención se usa en aplicaciones clínicas, los niveles aumentados de autoanticuerpos marcadores tumorales o un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con controles adecuados, se consideran generalmente como una indicación del estado de enfermedad del cáncer. Por ejemplo, cuando los inmunoensayos se usan en el diagnóstico del cáncer, la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario alterado que muestra la direccionalidad requerida, en comparación con individuos de control "normales", se considera como una indicación de que el individuo tiene cáncer. Los individuos control "normal" preferiblemente serán controles de la misma edad que no tengan ningún diagnóstico de cáncer basado en criterios clínicos, de imagen y/o bioquímicos.

Cuando los inmunoensayos se utilizan en la predicción de la respuesta de un paciente con cáncer a un tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, resección quirúrgica, vacunación, terapias contra factores de crecimiento o transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, quimioterapia con anticuerpos humanos), la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario alterado que muestra la direccionalidad requerida, en comparación con los individuos de control "normales", se pueden considerar como una indicación de que el individuo es probable que responda o no al tratamiento contra el cáncer. Los individuos de control "normal" preferiblemente serán controles de la misma edad que no tengan ningún diagnóstico de cáncer basado en criterios clínicos, de imagen y/o bioquímicos. Se puede establecer una relación entre el nivel de autoanticuerpos o el parámetro de la curva secundario, en comparación con los controles, y el éxito probable del tratamiento mediante la observación del resultado de dicho tratamiento en pacientes cuyo estado de autoanticuerpos y el parámetro de la curva secundario se controla durante el tratamiento. La relación previamente establecida se puede usar para predecir la probabilidad de éxito para cada tratamiento en un paciente dado en función de la evaluación del estado del autoanticuerpo y el parámetro de la curva secundario.

Cuando los inmunoensayos se usan para controlar la progresión del cáncer u otra enfermedad neoplásica en un paciente, se considera que la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario alterado que muestre la direccionalidad requerida, en comparación con un "control normal" es una indicación de la presencia de cáncer en el paciente. El "control normal" puede ser niveles de autoanticuerpos y parámetros de la curva secundarios presentes en individuos de control, preferiblemente de la misma edad, que no tienen ningún diagnóstico de cáncer basado en criterios clínicos, de imagen y/o bioquímicos. En otra alternativa, el "control normal" puede ser un nivel de "línea base" establecido para el paciente particular a analizar. El nivel de la "línea base" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos y el parámetro de la curva secundario presente cuando se realizó un primer diagnóstico de cáncer o un diagnóstico de cáncer recurrente. Cualquier aumento por encima del nivel de línea base de autoanticuerpos o cualquier alteración en el parámetro de la curva secundario que muestre la direccionalidad requerida se tomaría como una indicación de que la cantidad de cáncer presente en el paciente ha aumentado, mientras que cualquier disminución por debajo del nivel de línea base de autoanticuerpos o cualquier alteración en el parámetro de la curva secundario que muestra una inversión de la direccionalidad requerida para una lectura positiva, se consideraría como una indicación de que la cantidad de cáncer presente en el paciente ha disminuido. El valor de la "línea base" también puede ser, por ejemplo, el nivel antes de que comience un nuevo tratamiento. Un cambio en el nivel de autoanticuerpos o un cambio en el parámetro de la curva secundario que muestre la direccionalidad requerida se consideraría como una indicación de la efectividad de la terapia. Para cualquier tratamiento dado, se determinará la dirección del "cambio" en los niveles de autoanticuerpos o el parámetro de la curva secundario que indica un resultado positivo (es decir, si un valor es superior o inferior al valor de corte se considera positivo) calculando los valores de corte. La direccionalidad requerida para una lectura positiva dependerá del antígeno y del parámetro de la curva secundario.

5 Cuando los inmunoensayos se utilizan en el cribado de una población de sujetos humanos asintomáticos, esto puede ser para identificar a los sujetos que tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer. Los individuos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con los individuos de control "normales", se identifican como "en riesgo" de desarrollar cáncer. Los individuos de control "normal" preferiblemente serán controles de la misma edad no identificados por tener predisposición a desarrollar cáncer o cualquier riesgo significativamente elevado de desarrollar cáncer. Una excepción a esto puede ser que la edad misma sea un factor de riesgo importante.

10 Cuando los inmunoensayos se usan para cribar una población de sujetos humanos asintomáticos, esto puede ser para diagnosticar cáncer en aquellos sujetos que ya han desarrollado un cáncer. Los individuos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario alterado en comparación con individuos de control "normales". se consideran que tienen cáncer o alguna forma de cambio neoplásico. Los individuos de control "normal" preferiblemente serán controles de la misma edad no identificados por tener alguna predisposición a desarrollar cáncer. Una excepción a esto puede ser que la edad misma sea un factor de riesgo importante. Como alternativa, el "control normal" puede ser un nivel de la "línea base" establecido para el paciente particular a analizar. El nivel de la "línea de base" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos y el parámetro de la curva secundario presente cuando el paciente se analizó por primera vez y se encontró que tenía niveles no elevados por encima de una población de "control normal". Cualquier aumento a partir de entonces frente a esta medición de referencia se consideraría como una indicación de la presencia de cáncer en ese individuo. Por lo tanto, el individuo podría, mediante dicha prueba de referencia, convertirse en su propio control para la medición futura de autoanticuerpos.

25 Cuando los inmunoensayos se utilizan para controlar la respuesta de un paciente con cáncer al tratamiento contra el cáncer por ejemplo, resección quirúrgica, vacunación, terapias contra factores de crecimiento o transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, quimioterapia con anticuerpos humanos, la presencia de un nivel alterado de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario alterado después de tomar el tratamiento como una indicación de que el paciente ha respondido positivamente al tratamiento. Se puede usar un nivel de la línea de base de autoanticuerpos y un parámetro de la curva secundario de la línea base antes de comenzar el tratamiento para propósitos de comparación con el fin de determinar si el tratamiento produce un "aumento o disminución" en los niveles de autoanticuerpos. Un cambio en el nivel de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario que muestre la direccionalidad requerida se tomaría como una indicación de la efectividad de la terapia. Para cualquier tratamiento dado, la dirección del "cambio" en los niveles de autoanticuerpos o en el parámetro de la curva secundario que indica un resultado positivo (es decir, si un valor superior o inferior al valor de corte se considera positivo) se determinará al calcular los valores de corte. La direccionalidad requerida para una lectura positiva dependerá del antígeno y del parámetro de la curva secundario.

40 El método de la invención puede usarse en la predicción y control de la respuesta de un individuo a esencialmente cualquier tratamiento conocido contra el cáncer. Esto incluye, por ejemplo, la terapia con anticuerpos humanos en la que se infunden anticuerpos monoclonales o policlonales en el paciente, siendo un ejemplo específico no limitante el tratamiento con el anticuerpo anti-factor de crecimiento Herceptin™ (Baselga, J., D. Tripathy y col., J Clin Oncol., 14 (3), 737-744, 1996). La presencia de una respuesta de autoanticuerpo natural puede potenciar o inhibir la efectividad del tratamiento con anticuerpos terapéuticos perfundidos artificialmente. Usando el método de la invención, es posible correlacionar la respuesta con cualquier tratamiento contra el cáncer, que incluye terapia de anticuerpos, con niveles naturales de autoanticuerpos y parámetros de la curva secundarios antes y durante el transcurso del tratamiento en cualquier paciente o grupo de pacientes. Este conocimiento puede a su vez ser utilizado para predecir cómo otros pacientes (o el mismo paciente en el caso de tratamiento repetido) responderán al mismo tratamiento.

50 Cuando los inmunoensayos se usan en la detección de la enfermedad recurrente, la presencia de un nivel aumentado de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario alterado que muestra la direccionalidad requerida en el paciente, en comparación con un "control normal", se considera como una indicación de que la enfermedad ha recurrido. El "control normal" pueden ser niveles de autoanticuerpos y parámetros de la curva secundarios presentes en individuos de control, preferiblemente de la misma edad sin diagnóstico de cáncer basado en criterios clínicos, de imagen y/o bioquímicos. En otra alternativa, el "control normal" puede ser un nivel de la "línea base" establecido para el paciente particular a analizar. El nivel de la "línea de base" puede ser, por ejemplo, el nivel de autoanticuerpos y el parámetro de la curva secundario presente durante un período de remisión de la enfermedad basándose en criterios clínicos, de imagen y/o bioquímicos.

60 A lo largo de las diversas aplicaciones de los métodos de la invención se ha indicado que la presencia de un nivel alterado de autoanticuerpos o un parámetro de la curva secundario alterado que muestra la direccionalidad requerida son indicativos de un resultado positivo. Para evitar dudas, debe entenderse que en algunos casos puede requerirse la presencia de un nivel alterado de autoanticuerpos y un parámetro de la curva secundario alterado que muestre la direccionalidad requerida para un resultado positivo.

65 El método de ensayo de la invención se puede aplicar en la detección de muchos tipos diferentes de cáncer, de los cuales son ejemplos el cáncer de mama, vejiga, colorrectal, próstata, pulmón, páncreas, ovario, carcinoma

hepatocelular (CHC), gastrointestinal y melanoma. Los ensayos pueden complementar los métodos existentes de detección y vigilancia. Por ejemplo, en el caso del cáncer de mama primario, los inmunoensayos para autoanticuerpos podrían usarse para alertar a los médicos a realizar biopsias de lesiones pequeñas en mamografías que radiográficamente no parecen sospechosas o para realizar imágenes mamarias o repetir imágenes antes de lo planeado. En la clínica, se espera que los métodos de ensayo de la invención sean más objetivos y reproducibles en comparación con las técnicas de imagen actuales (es decir, mamografía y ultrasonido), cuyo éxito puede depender del operador.

Los “ensayos de panel” se pueden adaptar teniendo en cuenta la aplicación clínica particular. Un panel de antígenos para la detección de autoanticuerpos para al menos p53 y c-erbB2 es particularmente útil para muchos tipos de cáncer y opcionalmente se puede complementar con otros marcadores que tengan una asociación conocida con el cáncer particular, o una etapa del cáncer particular, a ser detectado. Por ejemplo, para el cáncer de mama, el panel podría incluir MUC 1 y/o c-myc y/o BRCA1 y/o BRCA2 y/o PSA, mientras que para el cáncer de vejiga podría incluir opcionalmente MUC 1 y/o c-myc, para el cáncer colorrectal ras y/o APC, para el cáncer de próstata PSA y/o BRCA 1 y/o BRCA2 o para el cáncer de ovario BRCA1 y/o BRCA2 y/o CA125, para el cáncer de pulmón SOX2 y/o CAGE, para el hepatocarcinoma celular la alfafetoproteína hepática. Existen otras realizaciones preferidas en las que p53 o c-erbB2 no son necesariamente esenciales.

La utilidad del método de la invención no se limita a la detección de autoanticuerpos antitumorales, aunque el ensayo es particularmente útil para este fin. El cáncer es solo un ejemplo de una enfermedad en la que la detección de niveles de anticuerpos y un parámetro de la curva secundario se puede usar como un marcador biológico para el estado de enfermedad/susceptibilidad a la enfermedad. Los inventores han demostrado que se obtienen ventajas sustanciales mediante el uso de un enfoque de valoración para detectar anticuerpos en muestras de pacientes, y posteriormente se calcula un parámetro de la curva secundario para realizar un método de doble corte. Por lo tanto, es razonable concluir que se obtendrán ventajas similares mediante el uso de este enfoque para detectar autoanticuerpos que son marcadores biológicos para enfermedades distintas del cáncer. El método es por lo tanto aplicable a la detección de cualquier autoanticuerpo que sirva como un marcador biológico para un estado de enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad, en cualquier enfermedad que se haya demostrado (o pueda mostrarse) que está asociada con la producción de autoanticuerpos.

Otras aplicaciones del método de la invención incluyen, pero no se limitan a, detección de autoanticuerpos que son marcadores biológicos de enfermedades autoinmunitarias, tales como por ejemplo artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), cirrosis biliar primaria (PBC), tiroiditis autoinmunitaria (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto), gastritis autoinmunitaria (p. ej., anemia perniciosa), adenitis autoinmunitaria (p. ej., enfermedad de Addison), hipoparatiroidismo autoinmunitario, diabetes autoinmunitaria (por ejemplo, diabetes tipo 1) o miastenia gravis, trastornos neurológicos paraneoplásicos como el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis y detección de hepatitis autoinmunitaria de muestras de pacientes para enfermedad renal o hepática que conducen a insuficiencia o fallo de cualquiera de los órganos, y detección de muestras de pacientes después del trasplante para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra el tejido enfermo (que se ha dejado *in situ* tras el trasplante) o contra los tejidos trasplantados.

Kits para realizar los métodos de la invención

La presente invención abarca usos de un kit adecuado para realizar cualquiera de los métodos de la invención, en el que el kit comprende uno o más antígenos y un reactivo capaz de detectar complejos de los antígenos unidos a anticuerpos presentes en una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero.

En ciertas realizaciones, el kit puede comprender dos o más variantes de antígeno, tales como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más variantes de antígeno.

En realizaciones adicionales, el kit puede comprender medios para poner en contacto dichos uno o más antígenos con una muestra de fluidos corporales.

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

Ejemplos

Ejemplo 1 – Desarrollo de medidas de parámetros de la curva secundarios

Conjunto de muestra

Para el desarrollo de medidas de parámetros de la curva secundarios, el conjunto de ensayo comprendió 337 muestras de suero o plasma de pacientes con cáncer de pulmón primario tomadas en el momento del diagnóstico y antes del tratamiento (cánceres). Estas fueron emparejadas (por edad, sexo e historial de tabaquismo) con 415 muestras de suero o plasma de individuos sin signos de malignidad (normales).

Valor de corte estándar para la unión anticuerpo/antígeno

La unión anticuerpo/antígeno se midió mediante ELISA como se describe en otros documentos (WO06/126008 y Murray et al. Ann Oncol. 2010 Aug 21(8):1687-93). Se obtuvieron datos para la unión a un rango de concentraciones de un panel de siete antígenos asociados a tumores (p53, SOX2, CAGE, NY-ESO-1, GBU4-5, MAGE A4 y HuD) más un control (VOL) de 1,6 a 160 nM para proporcionar curvas de titulación para la unión de autoanticuerpos (Figura 2). El corte para la unión anticuerpo/antígeno se determinó a partir de estudios de caso-control emparejados trazando una curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno usado en la serie de valoración para cada antígeno en el panel. La cantidad de unión para cada antígeno a 160 y 50 nM se calibró y convirtió en una unidad de referencia (RU) como se describe en el documento WO09/081165. Los valores de corte para la unión de anticuerpos en uno o más puntos de la curva de valoración se eligieron para maximizar la sensibilidad (la proporción de muestras de pacientes con cáncer que eran positivas) mientras se mantenía una alta especificidad (la proporción de muestras de individuos normales que eran negativas). Una medición se consideraba positiva si daba como resultado una curva sigmoide trazada a partir de la reacción del anticuerpo en la muestra con la serie de valoración del antígeno y si el valor determinado para uno o más puntos en la curva de titulación estaba por encima del valor de corte predeterminado.

Parámetros de la curva secundaria

Tras la detección de la cantidad de unión antígeno/anticuerpo para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación, y el trazado de una curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación, se calcula un parámetro de la curva secundaria. El parámetro de la curva secundaria se puede calcular a partir de una curva de regresión lineal o logarítmica. En la presente memoria, un parámetro de la curva secundaria es cualquier valor calculado que proporciona una indicación de la naturaleza de la curva. Por ejemplo, el parámetro de la curva secundaria puede ser Pendiente, Ordenada en el origen, Área bajo la curva (AUC), PendienteMax o la constante de disociación (Kd).

La pendiente se calcula usando la ecuación:

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

donde b es la Pendiente, x se refiere a la concentración de antígeno (nM), e y se refiere al valor de OD en unidades de absorbancia (AU).

La pendiente se puede calcular a partir de las curvas de regresión lineal o logarítmica, o de las curvas de regresión tanto lineal como logarítmica, para cada muestra.

La ordenada en el origen de la línea de regresión es el valor de la línea en el eje y cuando x = 0.

La ordenada en el origen puede calcularse a partir de las curvas de regresión lineal o logarítmica, o de las curvas de regresión tanto lineal como logarítmica, para cada muestra.

El área bajo la curva (AUC) puede calcularse usando la regla trapezoidal sumada, que se puede obtener estimando la integral definida entre cada conjunto de concentraciones de antígeno siguiendo la fórmula:

$$\int_a^b f(x) dx \approx (b - a) \left[\frac{f(a) + f(b)}{2} \right].$$

Este cálculo se repite para cada par de concentraciones consecutivas de antígeno y los valores resultantes se suman para dar un valor total para el Área bajo la curva (AUC).

El Área bajo la curva (AUC) se puede calcular a partir de las curvas de regresión lineal o logarítmica, o de las curvas de regresión tanto lineal como logarítmica, para cada muestra.

La PendienteMax puede calcularse usando la misma fórmula que la de la Pendiente, descrita anteriormente. Sin embargo, para determinar el mayor valor posible para la Pendiente para cada muestra, se obtiene un valor de Pendiente para cada par de concentraciones de antígeno consecutivas, donde el valor de la Pendiente de mayor magnitud representa la PendienteMax.

La PendienteMax puede calcularse a partir de las curvas de regresión lineal o logarítmica, o de las curvas de regresión tanto lineal como logarítmica, para cada muestra.

La constante de disociación (Kd) se puede calcular ajustando una curva logística de cuatro parámetros a cada conjunto de puntos de titulación y se usa un método de resolución iterativa para dar los valores de los parámetros de la asíntota mínima (A), factor de pendiente (B), punto de inflexión (C) y asíntota máxima (D) usando la fórmula $F(x)=\frac{(A-D)}{1+((x/C)^B)}+D$, por lo que la suma de los residuos al cuadrado se minimiza. El punto de inflexión para estos datos de resolución corresponde a la Kd de la unión antígeno-anticuerpo.

Una vez obtenido un parámetro de la curva secundario, se combinó con los datos de unión antígeno/anticuerpo para determinar la presencia o ausencia del anticuerpo.

El umbral o punto de corte para el parámetro de la curva secundario se determinó trazando una curva de la cantidad de unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la serie de titulación. Esto se realizó para muestras de cáncer y normales utilizando las mismas medidas que se derivaron para la cuantificación de la unión anticuerpo/antígeno. Los valores de corte para los parámetros de la curva secundarios se eligieron para maximizar la especificidad (la proporción de muestras de individuos normales que son negativas) cuando se usan en combinación con el valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno. Cuando se calcula el valor de corte para el parámetro de la curva secundario, también se determina la direccionalidad requerida para una lectura positiva, es decir, si un valor por encima o por debajo del corte se considera positivo. La direccionalidad requerida para una lectura positiva dependerá del antígeno y del parámetro de la curva secundario.

Se consideró que una medición era finalmente positiva si estaba por encima del nivel de corte de la unión anticuerpo/antígeno y si además mostraba un parámetro de la curva secundario alterado que tenía la direccionalidad requerida en comparación con el nivel de corte.

Resultados

La Figura 3A-D muestra la distribución de muestras en el conjunto de muestras de ensayo de acuerdo con su nivel de unión anticuerpo/antígeno frente a cada parámetro de la curva secundario individual. Las muestras individuales se codifican de acuerdo con el resultado que se obtuvo aplicando solo el valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar. Aunque estos datos se calcularon para los siete antígenos del panel, se muestra p53 como ejemplo para demostrar los efectos de los diferentes parámetros. Se puede observar que la distribución de las muestras difiere entre la reducción de datos de la regresión lineal y logarítmica, por lo tanto, ambas pueden ser útiles para identificar muestras falsas positivas y mejorar así el rendimiento de la prueba en conjunto.

Los valores de corte del parámetro de la curva secundario (Tabla 1) se optimizaron para la reclasificación de falsos positivos a negativos verdaderos y se aplicaron simultáneamente tanto a los niveles de la unión anticuerpo/antígeno como al parámetro de la curva secundario.

Tabla 1: Desarrollo de parámetros de la curva secundarios

Antígeno	Valor de corte de un parámetro de la unión anticuerpo/antígeno (OD)	Valor de corte de dos parámetros de la unión anticuerpo/antígeno (OD)	Parámetro de la curva secundaria	Regresión Log/lineal	Valor de corte del parámetro de la curva secundario
p53	8,35	6,00	Ordenada en el origen	Log	> 0,15
SOX2	8,26	8,26	AUC	Lineal	> 27,0
CAGE	2,86	2,86	UC	Log	> 2,80
NY-ESO-1	6,38	6,38	Ordenada en el origen	Log	> -0,12
MAGE A4	9,29	9,29	AUC	Lineal	> 25,0
HuD	9,53	9,53	PendienteMax	Lineal	> 0,13

La distribución de las muestras según su unión anticuerpo/antígeno frente al parámetro de la curva secundario óptimo se muestra en la Figura 4A-F. El corte horizontal representa el valor de corte estándar de la unión anticuerpo/antígeno y el corte vertical representa el valor de corte del parámetro de la curva secundario. El cuadrante que es positivo para ambos puntos de corte se conoce como la zona de positividad y está claro que hubo enriquecimiento de verdaderos positivos dentro de esta zona, mientras que las muestras que eran previamente falsas positivas se excluyeron y reclasificaron como verdaderos negativos mediante la aplicación del valor de corte del parámetro de la curva secundario.

El rendimiento del panel de autoanticuerpos con y sin la aplicación del valor corte del parámetro de la curva secundario se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de rendimiento de una prueba de autoanticuerpo con aplicación de corte simple y doble

Corte	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	VPP (%)	Falsos identificados por 1000 análisis de prueba	
				Normal	Cáncer
Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar	90,1	29,7	5,8	97,0	14,1
Método de doble corte	98,1	22,0	19,1	18,6	15,6

5 Aunque la sensibilidad se redujo por la reclasificación de unas pocas muestras verdaderas positivas a falsos negativos, la especificidad mejoró del 90 % al 98 %. Esto representó una mejora en el valor predictivo positivo (VPP) del 5,8 % (1 de cada 17,2 pacientes con una prueba positiva tiene cáncer) al 19,1 % (1 de cada 5,2 pacientes con una prueba positiva tiene cáncer). En una enfermedad como el cáncer de pulmón con una prevalencia en una población de alto riesgo de alrededor del 2 % (es decir, 1 de cada 50), un aumento del 8 % en la especificidad daría como resultado que 78 personas menos que no tienen cáncer tengan una prueba positiva de cada 1000 personas analizadas. A estos pacientes se les ahorrará la ansiedad y el riesgo de las pruebas de seguimiento como la tomografía computarizada y la biopsia. Sin embargo, en la misma población, una pérdida de sensibilidad del 7 % provocará que solo 1,5 pacientes más con cáncer sean mal diagnosticados (Tabla 2). La confirmación de estos resultados en un segundo gran conjunto de datos fue necesaria para validar este enfoque.

15 Ejemplo 2 - Confirmación de los resultados de desarrollo en un conjunto de muestra independiente

Conjunto de muestra

20 Para la confirmación del rendimiento del ensayo mejorado proporcionado por la aplicación del método de doble corte, el conjunto de muestra comprendió 235 muestras de suero o plasma de pacientes con cáncer de pulmón primario tomadas en el momento del diagnóstico y antes del tratamiento (cánceres). Se emparejaron (por edad, sexo e historial de tabaquismo) con 266 muestras de suero o plasma de individuos sin evidencia de tumores malignos (normales). No se cruzaron las muestras en los conjuntos de muestra de ensayo y confirmación.

25 Parámetros de la curva secundaria y determinación del nivel de corte

30 La unión de anticuerpo/antígeno se midió mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 1. Los parámetros de la curva secundarios y la direccionalidad requeridos para una lectura positiva también fueron como se describe en el Ejemplo 1. Tanto la unión de anticuerpo estándar/antígeno como los parámetros de la curva secundarios se determinaron como se describe en ejemplo 1 con un ligero ajuste para la optimización en ambos conjuntos de muestras.

Resultados

35 La comparación del conjunto de ensayo con el conjunto de confirmación se muestra en la Figura 5A-F que representa la distribución de las señales de la muestra de acuerdo con su unión anticuerpo/antígeno frente al parámetro de la curva secundario óptimo. El valor de corte horizontal representa el valor de corte estándar de la unión anticuerpo/antígeno y el corte vertical representa el valor de corte del parámetro de la curva secundario. Hubo enriquecimiento de verdaderos positivos dentro de la zona de positividad, mientras que las muestras que previamente eran falsos positivos se excluyeron principalmente y se reclasificaron como verdaderos negativos en ambos conjuntos de muestras. La Tabla 3 muestra el rendimiento del panel de autoanticuerpos en los conjuntos de muestra de desarrollo y de confirmación con y sin la aplicación del límite del parámetro de la curva secundario.

45 Tabla 3: Comparación de las características de rendimiento de una prueba de autoanticuerpos con aplicación de corte simple y doble en dos conjuntos de muestras independientes

Corte	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	VPP (%)	Falsos identificados por 1000 análisis de prueba	
				Normal	Cáncer
Conjunto de desarrollo: Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar	90,1	29,7	5,8	97,0	14,1
Método de doble corte	98,1	22,0	19,1	18,6	15,6
Conjunto de confirmación: Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar	90,6	41,5	8,3	92,1	11,7
Método de doble corte	97,0	27,9	16,0	29,4	14,4

Aunque el conjunto de muestra confirmatorio proporcionó mejores datos de rendimiento que el conjunto de ensayo utilizando el enfoque del valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar, se mantuvo la mejora en la especificidad y, por lo tanto, el VPP proporcionado por la aplicación del límite del parámetro de la curva secundaria. Esto demuestra que el enfoque es reproducible en dos conjuntos de muestras caso-control completamente independientes.

Ejemplo 3 - Mejora en el rendimiento del panel mediante la incorporación de antígenos adicionales

Conjunto de muestra

Con el fin de investigar la mejora en el rendimiento del panel que podría lograrse mediante la incorporación de antígenos adicionales, se utilizó un subconjunto del conjunto de ensayo descrito en el Ejemplo 1. Este conjunto comprendía 166 muestras de suero o plasma de pacientes con cáncer de pulmón primario tomados en el momento del diagnóstico y antes del tratamiento (cánceres). Estos fueron emparejados (por edad, sexo e historial de tabaquismo) con 147 muestras de suero o plasma de individuos sin evidencia de tumor maligno (normales).

Antígenos adicionales

Se investigaron cuatro antígenos adicionales: alfa-enolasa, citoqueratina 8 (CK8), citoqueratina 20 (CK20) y L-myc2 por su capacidad para mejorar el rendimiento del panel de autoanticuerpos cuando se aplicó el método del doble corte. La unión anticuerpo/antígeno se midió mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 1. Los parámetros de la curva secundarios también fueron como se describe en el Ejemplo 1. Tanto la unión anticuerpo/antígeno como los valores de corte de la curva secundaria se optimizaron para el rendimiento máximo del ensayo para los nuevos antígenos. (Tabla 4).

Tabla 4: Incorporación de antígenos adicionales. Los parámetros de la curva secundarios óptimos se dan con puntos de corte

Antígeno	Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno (RU)	Parámetro de la curva secundaria	Regresión Log/Lineal	Valor de corte del parámetro de la curva secundaria
Alfa enolasa	7,5	Pendiente	Log	< 0,24
Citoqueratina 8	8,0	Pendiente	Log	> 0,15
Citoqueratina 20	7,0	PendienteMax	Lineal	> 0,005
Lmyc2	7,0	PendienteMax	Log	> 0,40

Resultados

La distribución de muestras según su unión anticuerpo/antígeno frente al parámetro de la curva secundaria óptimo para los cuatro nuevos antígenos se muestra en la Figura 6A-D. Las muestras individuales se codifican de acuerdo con el resultado que se obtuvo para el panel de siete antígenos. Cuando estos cuatro antígenos se habían investigado previamente en un formato de ensayo que implicaba solo la aplicación del valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno, hubo un ligero aumento de la sensibilidad, pero la especificidad del panel aumentado era del 82,3 % y, por lo tanto, demasiado baja para ser clínicamente útil (Tabla 5).

Tabla 5: Efecto de antígenos adicionales sobre el rendimiento del panel de autoanticuerpos

Corte	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	VPP (%)	Falsos identificados por 1000 análisis de prueba	
				Normal	Cáncer
Panel de 7 antígenos: Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar	90,1	29,7	5,8	97,0	14,1
Valor de corte del parámetro del método	98,1	22,0	19,1	18,6	15,6
Panel de 11 antígenos: Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar	82,3	52,4	5,7	173,5	9,5
Método de doble corte	96,6	40,4	19,5	33,3	11,9

Sin embargo, cuando se aplicaron los valores de corte de los parámetros de la curva secundarios y se determinó que ambos puntos de corte para estos antígenos estuvieran maximizados para el rendimiento real del panel de siete antígenos, el VPP mejoró del 5,8 % (1 de cada 17 pruebas positivas es cáncer) al 19,1 % (1 de cada 5 pruebas positivas es un cáncer). Con la adición de los cuatro antígenos adicionales, la sensibilidad del panel también mejoró

del 29,7 % al 40,4 % (Tabla 4) con una pérdida mínima de especificidad. Esto proporcionó la confirmación preliminar de que la adición de nuevos antígenos a un panel donde se aplicó el método de doble corte puede mejorar la sensibilidad de la prueba con poco efecto perjudicial sobre la especificidad que no fue posible obtener con el uso de un único valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno.

5 Ejemplo 4 - Mejora en el rendimiento del panel mediante la incorporación de variantes antigénicas y mutantes

10 Cuando se miden autoanticuerpos específicos para varias formas variantes diferentes del mismo antígeno (por ejemplo, p53) en un grupo de pacientes con cáncer, se observan diferencias entre pacientes individuales en cuanto a la especificidad de los autoanticuerpos que producen (Tabla 6).

Número de muestra	p53 BirA	p53-EP C-BirA	p53 C-BirA	p53-EP BirA	p53-292 BirA	p53-95 BirA	p53-7 NLIC	p53-7 CLIC	p53 NLIC	Cualquier variante
3		Pos				n.d.				Pos
49							Pos	Pos	Pos	Pos
87	Pos	Pos	Pos	Pos		Pos			Pos	Pos
105			Pos							Pos
113	n.d.	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	n.d.	n.d.	n.d.	Pos
126	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
127	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
145	Pos									Pos
173						Pos				Pos
185				Pos						Pos
247	Pos									Pos
265						Pos				Pos
339	Pos	Pos	Pos			Pos			Pos	Pos
363			Pos				Pos	Pos		Pos
372						Pos				Pos
445				Pos				Pos		Pos
487		Pos	Pos							Pos
738	Pos	Pos	Pos		Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
766						Pos			Pos	Pos
835	n.d.		Pos				Pos	Pos	Pos	Pos
984		Pos		Pos						Pos
1437	Pos									Pos
1443	Pos									Pos
positividad	9/96	9/98	10/98	7/96	4/98	10/96	6/99	7/98	8/99	23/100
sensibilidad	9.4%	9.2%	10.2%	7.3%	4.1%	10.4%	6.1%	7.1%	8.1%	23.0%

Tabla 6: Positividad para autoanticuerpos de diferentes variantes de p53 en 100 pacientes con cáncer de pulmón. Pos= muestra positiva para la unión de autoanticuerpos. n.d. = sin datos. Solo se muestran las muestras positivas para uno o más autoanticuerpos.

15 Esto parecería sugerir que no todos los pacientes producen las mismas formas alteradas de antígenos asociados a tumores durante la evolución de su enfermedad y que es posible usar diferentes formas variantes o mutaciones para mejorar el rendimiento de los ensayos de autoanticuerpos. Sin embargo, los individuos normales también muestran evidencia de la producción de autoanticuerpos contra diferentes formas variantes de antígenos asociados a tumores (Tabla 7) presumiblemente debido al hecho de que han desarrollado una respuesta inmunitaria exitosa contra un proceso de transformación maligno que ha erradicado el cáncer antes de que haya tenido oportunidad de establecerse por sí mismo.

20

Número de muestra	p53 BirA	p53-EP C-BirA	p53 C-BirA	p53-EP BirA	p53-292 BirA	p53-95 BirA	p53-7 NLIC	p53-7 CLIC	p53 NLIC	Cualquier variante
1711	n.d.	Pos	Pos	Pos	n.d.	n.d.	Pos	Pos	Pos	Pos
4951				Pos						Pos
4824		Pos								Pos
3988							Pos	Pos		Pos
2575				Pos						Pos
3028							Pos		Pos	Pos
4584			Pos		Pos	Pos				Pos
3064	Pos									Pos
2215						Pos				Pos
3227	Pos	Pos	Pos			Pos		Pos		Pos
2524									Pos	Pos
4440					Pos					Pos
3599	Pos				Pos					Pos
positividad	3/98	3/98	3/99	3/99	3/97	3/98	3/100	3/100	3/100	13/100
especificidad	96,9%	96,9%	97,0%	97,0%	96,9%	96,9%	97,0%	97,0%	97,0%	87,0%

Tabla 7: Positividad para autoanticuerpos de diferentes variantes de p53 en 100 individuos sin signos de tumor maligno.

Pos= muestra positiva para la unión de autoanticuerpos. n.d. = sin datos. Solo se muestran las muestras positivas para uno o más autoanticuerpos.

El nivel de fondo de la producción de autoanticuerpos en individuos aparentemente normales hace que el uso de estos biomarcadores para la detección temprana del cáncer sea complicado a menos que se pueda encontrar un método para distinguir aquellos cuyo principio de tumor maligno ha sido erradicado por la respuesta inmunitaria (falsos positivos) de aquellos que tienen tumores (verdaderos positivos). El siguiente ejemplo describe un estudio realizado con el fin de investigar la aplicación del método de doble corte a paneles de autoanticuerpos que incluyen formas variantes o mutantes de antígenos asociados a tumores.

10 Muestras

El conjunto de muestras utilizado para este estudio fue un subconjunto del conjunto de ensayo y comprendía 151 muestras de suero o plasma de pacientes con cáncer de pulmón primario tomadas en el momento del diagnóstico y antes del tratamiento (cánceres). Se emparejaron (por edad, sexo e historial de tabaquismo) con 104 muestras de suero o plasma de individuos sin evidencia de tumor maligno (normales).

Variantes antigénicas y mutaciones

En la Tabla 8 se presenta una lista de variantes antigénicas y mutaciones usadas.

Tabla 8: Variantes y mutaciones antigénicas

Nombre de la construcción	Tipo de variante	Aminoácidos
p53		
p53-BirA	Supresor tumoral de longitud completa	1-393
p53 C-BirA	Supresor tumoral de longitud completa	1-393
p53-Cterm BirA	Fragmento C terminal, regiones de unión a ADN y unión a proteínas	221-393
p53-EP C-BirA	Epítipo N terminal, región de activación de la transcripción	
p53-95 BirA	Fragmento N terminal, región de activación de la transcripción y unión de ligandos	1-95
p53-292 BirA	Fragmento N terminal, región de activación de la transcripción, región de unión del ligando y dominio de unión al ADN	1-292
EGFR		
EGFR1 KD C-BirA	Truncamiento del dominio de la quinasa isoforma 1	645-998

Nombre de la construcción	Tipo de variante	Aminoácidos
EGFR1 EP C-BirA	Truncamiento del fragmento del epítipo isoforma 1	286-462
EGFR VIII BirA	Dominio extracelular parcial con una variante de corte y empalme de la secuencia N-terminal	LEEKKG-274-605
EGFR L858R C-BirA	Mutación L858R asociada al cáncer de pulmón del dominio quinasa isoforma 1	645-998
EGFR2 C-BirA	Truncamiento similar a la isoforma 2	2-379
Kras		
Kras G12C/Q61H BirA	Isoforma de longitud completa 2b; doble mutante	1-188
Kras G13C/Q61H BirA	Isoforma de longitud completa 2b; doble mutante	1-188
Kras Q61H BirA	Isoforma de longitud completa 2b; mutación asociada al cáncer de pulmón	1-188

- 5 La unión de anticuerpo/antígeno se midió por ELISA como se describe en el Ejemplo 1. Los parámetros de la curva secundarios y la determinación de la direccionalidad requerida para una lectura positiva también fueron como se describe en el Ejemplo 1. El Índice de Reclasificación Neta (NRI) se usó para elegir los mejores antígenos para la adición al panel final de todos los antígenos probados incluyendo todos los descritos en los Ejemplos 1-3 y todas las variantes y mutaciones.

Resultados

- 10 La distribución de muestras según su unión anticuerpo/antígeno frente al parámetro de la curva secundario óptimo para las variantes y mutaciones seleccionadas para su inclusión en el panel final se muestran en la Figura 7A-G. Las muestras individuales se codifican de acuerdo con el resultado que se obtuvo para el panel de 7 antígenos. El NRI se utilizó para clasificar el rendimiento de los antígenos y elegir los mejores antígenos para el panel (Tabla 9).

- 15 **Tabla 9: Resultados del índice de Reclasificación Neta. La sensibilidad y la especificidad se expresan como %. Conc = concentración de antígeno para la cual se calculó la unión anticuerpo/antígeno estándar**

Rango del antígeno	Antígeno	Conc (nM)	NRI	Rendimiento del antígeno		Rendimiento del panel	
				Especificidad	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad
1	NY-ESO-1	160	0,113	100,0	11,3	100,0	11,3
2	Alfa enolasa	50	0,099	100,0	9,9	100,0	21,2
3	Citoqueratina 20	160	0,073	100,0	9,3	100,0	28,5
4	p53-C term	50	0,046	100,0	6,6	100,0	33,1
5	Kras G12C/Q61H	50	0,026	100,0	5,3	100,0	35,8
6	MAGE A4	160	0,020	100,0	4,6	100,0	37,7
7	SOX2	160	0,020	100,0	2,6	100,0	39,7
8	Citoqueratina 8	160	0,020	100,0	2,6	100,0	41,7
9	Lmyc2	160	0,013	100,0	2,6	100,0	43,0
10	p53	160	0,010	99,0	8,6	99,0	45,0
11	p53 C-BirA	160	0,007	100,0	4,6	99,0	45,7
12	Kras Q61H	50	0,007	100,0	4,0	99,0	46,4
13	EGFR1-EP	160	0,007	100,0	3,3	99,0	47,0
14	Kras G13C/Q61H	50	0,007	100,0	2,6	99,0	47,7
15	CAGE	160	0,007	100,0	2,6	99,0	48,3
16	GBU4-5	50	0,007	100,0	0,7	99,0	49,0
17	p53-95	160	0,007	99,0	6,6	99,0	49,7
18	Citoqueratina 20	50	0,007	100,0	5,3	99,0	50,3

El panel final consistió en 18 antígenos y el rendimiento de este panel se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Efecto de antígenos adicionales, variantes y mutaciones en el rendimiento del panel de autoanticuerpos

Corte	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	VPP (%)	Falsos identificados por 1000 análisis de prueba	
				Normal	Cáncer
Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar	90,4	31,8	6,3	94,1	13,6
Método de doble corte	99,0	50,3	50,7	9,8	9,9

No se pudo obtener ninguna mejora adicional en el rendimiento mediante la adición de cualquiera de los otros antígenos contra los que se midieron los autoanticuerpos en este Ejemplo.

5

Ejemplo 5 - Aplicación del método de doble corte en el carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular (CHC) es una enfermedad maligna del hígado. El 80-90 % de los casos ocurren en individuos con una enfermedad hepática predisponente, como infección por hepatitis B o C o cirrosis alcohólica. La detección temprana mientras las lesiones malignas aún son lo suficientemente pequeñas como para ser extirpadas mediante cirugía o cuando el trasplante de hígado aún puede ser curativo es la clave para mejorar la mortalidad. El CHC tiene una tasa de supervivencia de 40-70 % a los 5 años en pacientes diagnosticados con enfermedad en estadio temprano (estadio 0 y A) en comparación con el 5 % en pacientes diagnosticados con enfermedad en estadio avanzado. Los métodos de vigilancia actuales implican la ecografía abdominal y la medición de los niveles séricos de alfafetoproteína (AFP). La precisión de la ecografía abdominal es relativamente baja (especialmente para lesiones pequeñas) y depende de la habilidad del operador. El cumplimiento del paciente también es deficiente, por lo tanto, existe una necesidad urgente de una simple prueba de sangre que pueda aumentar el rendimiento de la AFP para la detección temprana de CHC en grupos de alto riesgo.

20 Conjunto de muestra

Con el fin de investigar la mejora en el rendimiento del ensayo mediante la aplicación del método de doble corte a un panel de AAb para la detección de CHC, el conjunto de muestras comprendió 193 muestras de suero o plasma de pacientes con CHC primario tomadas en el momento del diagnóstico y antes del tratamiento del cáncer. Estos se emparejaron lo más estrechamente posible (para la edad y el sexo) con 190 muestras de suero o plasma de individuos sin evidencia de tumor maligno (normales). Un segundo grupo de control consistió en 176 muestras de pacientes con enfermedad hepática benigna como hepatitis B, C o hígado cirrótico.

30 Parámetros de la curva secundaria y determinación del valor de corte

La unión de anticuerpo/antígeno se midió mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 1. Los parámetros de la curva secundarios y la direccionalidad requeridos para una lectura positiva también fueron como se describe en el Ejemplo 1. Tanto la unión anticuerpo/antígeno estándar como los parámetros de la curva secundarios se determinaron como se describe en Ejemplo 1. Los autoanticuerpos medidos y los parámetros de la curva secundarios aplicados en el ensayo para la detección temprana de CHC se muestran en la Tabla 11. Tanto la unión anticuerpo/antígeno como los valores de corte de los parámetros de la curva secundarios se optimizaron para el rendimiento máximo del ensayo.

Tabla 11: Desarrollo de parámetros de la curva secundarios para el ensayo para la detección temprana de CHC.

Antígeno	Concentración de antígeno (nM)	Valor de corte de un parámetro de la unión anticuerpo /antígeno (OD)	Valor de corte de dos parámetros de la unión anticuerpo /antígeno (OD)	Parámetro de la curva secundaria	Regresión log/lineal	Valor de corte del parámetro de la curva secundario
p53	50	1,29	1,29	PendienteMax	Lineal	0,03
p53	160	1,5	1,5	PendienteMax	Lineal	0,03
SOX2	50	0,5	0,5	PendienteMax	Lineal	0,02
SOX2	160	0,5	0,5	PendienteMax	Lineal	0,02
CAGE	50	0,35	0,35	PendienteMax	Lineal	0,012
CAGE	160	0,7	0,7	PendienteMax	Lineal	0,01
NY-ESO-1	50	0,3	0,3	PendienteMax	Lineal	0,05
NY-ESO-1	160	0,75	0,75	PendienteMax	Lineal	0,005
MAGE A4	50	0,7	0,7	PendienteMax	Lineal	0,025
MAGE-A4	160	0,7	0,7	PendienteMax	Lineal	0,025
Citoqueratina 8	50	0,5	0,45	Pendiente	Lineal	0,004

Citoqueratina 8	160	0,75	0,75	PendienteMax	Lineal	0,01
AFP	50	1,25	1,25	PendienteMax	Lineal	0,04
AFP	160	1,1	1,1	PendienteMax	Lineal	0,03
p62	50	1,0	0,9	Ordenada en el origen	Lineal	0,25
p62	160	1,1	0,85	Ordenada en el origen	Lineal	0,25
SSX1	50	0,9	0,9	PendienteMax	Lineal	0,025
SSX1	160	1	1	PendienteMax	Lineal	0,025
HDGF	50	0,56	0,5	Ordenada en el origen	Lineal	0,25
HDGF	160	0,5	0,35	Ordenada en el origen	Lineal	0,25
VTN10	50	0,68	0,25	Ordenada en el origen	Lineal	0,1
VTN10	160	0,5	0,25	Ordenada en el origen	Lineal	0,1
IMP1	50	1,6	1,2	Ordenada en el origen	Lineal	0,8
IMP1	160	1,6	0,8	Ordenada en el origen	Lineal	0,8

Resultados

5 La distribución de muestras según su unión anticuerpo/antígeno frente al parámetro de la curva secundario óptimo para los antígenos del panel de CHC inicial se muestra en la Figura 8A-F y la distribución para los seis antígenos adicionales se muestra en la Figura 9A-F. El corte horizontal representa el valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar y el corte vertical representa el valor de corte del parámetro de la curva secundario. Hubo enriquecimiento de verdaderos positivos dentro de la zona de positividad, mientras que las muestras que previamente eran positivas falsas se excluyeron principalmente y se reclasificaron como verdaderos negativos en 10 ambos conjuntos de muestras. La Tabla 12 muestra el rendimiento del autoanticuerpo con y sin la aplicación del valor de corte del parámetro de la curva secundario, así como la mejora que se obtuvo mediante la incorporación de seis antígenos adicionales para la medición de autoanticuerpos. Se puede observar que la aplicación del doble corte fue capaz de aumentar la especificidad en la cohorte benigna hasta el 100 %, con solo una pequeña reducción en la sensibilidad, y la adición de otros 6 antígenos fue capaz de proporcionar un panel expandido, donde se mejoró la especificidad y sensibilidad en comparación con el panel inicial de 6 antígenos. Esto dio como resultado un ensayo 15 que solo daría seis identificaciones falsas positivas por cada mil pacientes evaluados.

Tabla 12: Efecto de la aplicación de valores de corte secundarios y la inclusión de antígenos adicionales en el rendimiento del panel de autoanticuerpos para la detección de CHC.

Corte	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	VPP (%)	Falsos identificados por 1000 análisis de prueba	
				Normal	Cáncer
Panel de 6 antígenos: Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar	97,7 %	19,7 %	23,2 %	22	27
Método de doble corte	100,0 %	17,1 %	100,0 %	0	28
Panel de 12 antígenos: Valor de corte de la unión anticuerpo/antígeno estándar	96,6 %	21,2 %	18,0 %	33	27
Método de doble corte	99,4 %	20,2 %	54,2 %	6	27

* La especificidad se mide utilizando la cohorte de pacientes benignos porque este es el grupo de alto riesgo que se someterá a vigilancia con una prueba como esta.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un anticuerpo en una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (a) poner en contacto dicha muestra de prueba con una pluralidad de diferentes cantidades de un antígeno específico para dicho anticuerpo;
- (b) detectar la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno;
- 10 (c) trazar o calcular una curva de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (a);
- (d) calcular un parámetro de la curva secundario a partir de la curva trazada o calculada en la etapa (c); y
- (e) determinar la presencia o ausencia de dicho anticuerpo basándose en una combinación de:
 - 15 (i) la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno determinada en la etapa (b); y
 - (ii) dicho parámetro de la curva secundario determinado en la etapa (d).

2. Un método para detectar dos o más anticuerpos en una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, comprendiendo el método las etapas de:

- 20 (a) poner en contacto dicha muestra de prueba con un panel que comprende dos o más conjuntos de antígenos, en el que cada uno de dichos antígenos en dicho panel es específico para al menos uno de dichos dos o más anticuerpos;
- (b) detectar complejos de dichos antígenos unidos a anticuerpos presentes en dicha muestra de prueba;
- 25 (c) para cada antígeno trazar o calcular una curva separada de la cantidad de dicha unión específica frente a la cantidad de antígeno para cada cantidad de antígeno utilizada en la etapa (a);
- (d) calcular un parámetro de la curva secundario para cada curva trazada o calculada en la etapa (c); y
- (e) determinar la presencia o ausencia de dichos dos o más anticuerpos basándose en una combinación de:
 - 30 (i) la cantidad de unión específica entre dicho anticuerpo y dicho antígeno determinada en la etapa (b); y
 - (ii) dicho parámetro de la curva secundario determinado en la etapa (d),

para cada una de las curvas trazadas o calculadas en la etapa (c).

3. El método de la reivindicación 2, en el que:

- 35 (a) los dos o más antígenos del panel son antígenos distintos, y en el que el panel comprende opcionalmente dos o más variantes de antígeno de uno o más de los distintos antígenos; o
- (b) los dos o más antígenos del panel son variantes de antígenos.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el parámetro de la curva secundario se selecciona del grupo que consiste en Pendiente, Ordenada en el origen, Área bajo la curva (AUC), PendienteMax o Constante de disociación (Kd), y en el que el parámetro de la curva secundario se calcula opcionalmente a partir de una curva de regresión lineal o logarítmica.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el parámetro de la curva secundario es la Asíntota máxima, Asíntota mínima, Pendiente de Hill (o factor de pendiente) o Punto de inflexión de una curva logística ajustada o calculada en la etapa (c).

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el antígeno es una proteína o polipéptido de origen natural, una proteína o polinucleótido recombinante, una proteína o polipéptido sintético, péptido sintético, peptidomimético, polisacárido o ácido nucleico.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que el anticuerpo es un marcador biológico de un estado patológico o de una susceptibilidad a una enfermedad.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo es un autoanticuerpo.

9. El método de la reivindicación 8 en el que el autoanticuerpo es específico para una proteína marcadora tumoral, y en el que la proteína marcadora tumoral se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en EGFR, MUC1, las proteínas reguladoras de la transducción de señales/ ciclo celular Myc, c-myc, L-myc2, p53, ras (o Ras), BRCA1, BRCA2, APC, CA125, PSA, CEA, CA19.9, NY-ESO-1, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), PSCA (antígeno prostático de células madre), EpCam (molécula de adhesión celular epitelial), HER2 (también conocido como c-erbB2), CAGE, CAGE1, CAGE2, citoqueratinas, recoverina, calicreínas, anexinas, α -fetoproteína (AFP), GRP78, mamoglobina, raf, beta-gonadotropina coriónica humana b-HCG, antígeno 4-5, SOX2, GBU4-5, 60
MAGE, HuD, HE4, SALL4, alfa enolasa, p62, RalA, ciclina B1, calreticulina R, IMP1, vitronectinas (p.ej., VTN10), SSSX1, TMP21, NPC1L1C, TMOD1, CAMK1, RGS1, PACSIN1, RCV1, MAPKAPK3, CiclinaE2, citoqueratina 8 (CK8), 65

18 (CK18), 19 (CK19), 20 (CK20), SCC, proGRP, amiloide A sérico, alfa-1-anti-tripsina, apolipoproteína CIII, timosina 4, HDJ1 y HDGF.

10. El método de la reivindicación 8, en el que el autoanticuerpo es:

(a) característico de o está asociado con una enfermedad autoinmunitaria como la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), cirrosis biliar primaria (PBC), tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto), gastritis autoinmunitaria, anemia perniciosa, adrenalitis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, hipoparatiroidismo autoinmunitario, diabetes autoinmunitaria, miastenia grave, trastornos neurológicos paraneoplásicos, tales como el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis y hepatitis autoinmunitaria

(b) característico de o está asociado con enfermedad renal o hepática que conduce a insuficiencia o fallo de cualquiera de los órganos.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo se dirige hacia un epítipo presente en tejido trasplantado en el sujeto mamífero.

12. Uso de un kit para realizar el método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho kit comprende uno o más antígenos y un reactivo capaz de detectar complejos de dichos antígenos unidos a anticuerpos presentes en una muestra de prueba que comprende un fluido corporal de un sujeto mamífero, y en el que el kit comprende opcionalmente:

(a) dos o más variantes de antígenos; y/o

(b) medios para poner en contacto dichos uno o más antígenos con una muestra de fluido corporal.

13. Uso del método de la reivindicación 9 en:

(a) el diagnóstico, pronóstico o control del cáncer;

(b) la detección de cambios tempranos neoplásicos o carcinogénicos tempranos en pacientes asintomáticos;

(c) la detección de enfermedad recurrente en un paciente previamente diagnosticado de presentar células tumorales, que ha sido sometido a tratamiento para reducir el número de dichas células tumorales;

(d) la identificación de aquellos individuos que tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer, tales como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de ovario o carcinoma hepatocelular, en una población de individuos asintomáticos;

(e) la determinación del perfil del marcador tumoral de un individuo que padece cáncer, en el que dicho perfil del marcador tumoral se determina opcionalmente secuencialmente en dicho individuo como una indicación de la evolución de la enfermedad;

(f) la predicción de la respuesta de un individuo con cáncer al tratamiento anticanceroso, tal como resección quirúrgica, terapia hormonal, quimioterapia, radioterapia, terapia anti-factores de crecimiento, inmunoterapia o vacunación;

(g) el diagnóstico, pronóstico o control del cáncer;

(h) la selección de una población de sujetos humanos asintomáticos para identificar a aquellos sujetos que tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer, en el que las muestras a analizar usando el método son muestras de fluidos corporales tomadas de los sujetos, y en los que los sujetos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos y un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con los individuos de control normales, se identifican como en riesgo de desarrollar cáncer;

(i) la detección de cambios neoplásicos tempranos o carcinogénicos tempranos en un sujeto humano asintomático, en el que la muestra a analizar usando el método es una muestra de fluido corporal tomada del sujeto, y en la que existe un elevado nivel de autoanticuerpos y un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con los individuos de control normales, se considera como una indicación de cambio neoplásico temprano o carcinogénico temprano en el sujeto;

(j) la selección de una población de sujetos humanos asintomáticos para identificar a aquellos sujetos que han desarrollado un cáncer, en el que las muestras a analizar usando el método son muestras de fluidos corporales tomados de los sujetos, y en los que los sujetos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos y un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con los individuos de control normales, se diagnostican de cáncer;

(k) el análisis de una población de sujetos humanos sintomáticos para identificar a aquellos sujetos que han desarrollado un cáncer, en el que las muestras a analizar usando el método son muestras de fluidos corporales tomadas de los sujetos, y en el que los sujetos que tienen un nivel elevado de autoanticuerpos y un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con individuos de control normales, se diagnostican de cáncer;

(l) el control del progreso del cáncer u otra enfermedad neoplásica en un paciente, en el que la muestra a analizar usando el método es una muestra de fluido corporal tomada de un paciente humano, y en el que la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos y un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con un control normal, se considera como una indicación de la presencia de cáncer en el paciente;

(m) la detección de enfermedad recurrente en un paciente humano diagnosticado previamente de cáncer, que ha sido sometido a un tratamiento anticanceroso para reducir la cantidad de cáncer presente, en el que la muestra

que se analizará usando el método es una muestra de líquido corporal tomada del paciente, y en el que la presencia de un nivel aumentado de autoanticuerpos en el paciente y un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con un control normal, se considera como una indicación de que la enfermedad ha reaparecido; o

5 (n) la evaluación del pronóstico de cáncer, en el que la muestra a analizar usando el método es una muestra de fluido corporal tomada de un paciente humano, y en el que la presencia de un nivel elevado de autoanticuerpos y un parámetro de la curva secundario alterado, en comparación con un control normal, se considera como una indicación del pronóstico del paciente de su cáncer.

10 14. Uso del método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8 en la detección de cáncer, preferiblemente cáncer de pulmón, mama, vejiga, colorrectal, próstata, ovario o carcinoma hepatocelular.

15 15. Uso del método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8 en el control de la respuesta de un paciente con cáncer humano a un tratamiento anticanceroso, en el que la muestra que se analizará usando el método es una muestra de fluido corporal tomada del paciente, y en el que un cambio en el nivel de autoanticuerpos y un cambio en el parámetro de la curva secundario después del tratamiento se considera como una indicación de si el paciente ha respondido o no al tratamiento, en el que el tratamiento es opcionalmente resección quirúrgica, vacunación, terapia anti-factores de crecimiento o de la transducción de señales, radioterapia, terapia endocrina, terapia con anticuerpos humanos o quimioterapia y un cambio en el nivel de autoanticuerpos y un cambio en el parámetro de la curva
20 secundario después del tratamiento se consideran como una indicación de que el paciente ha respondido positivamente al tratamiento.

Figura 1A

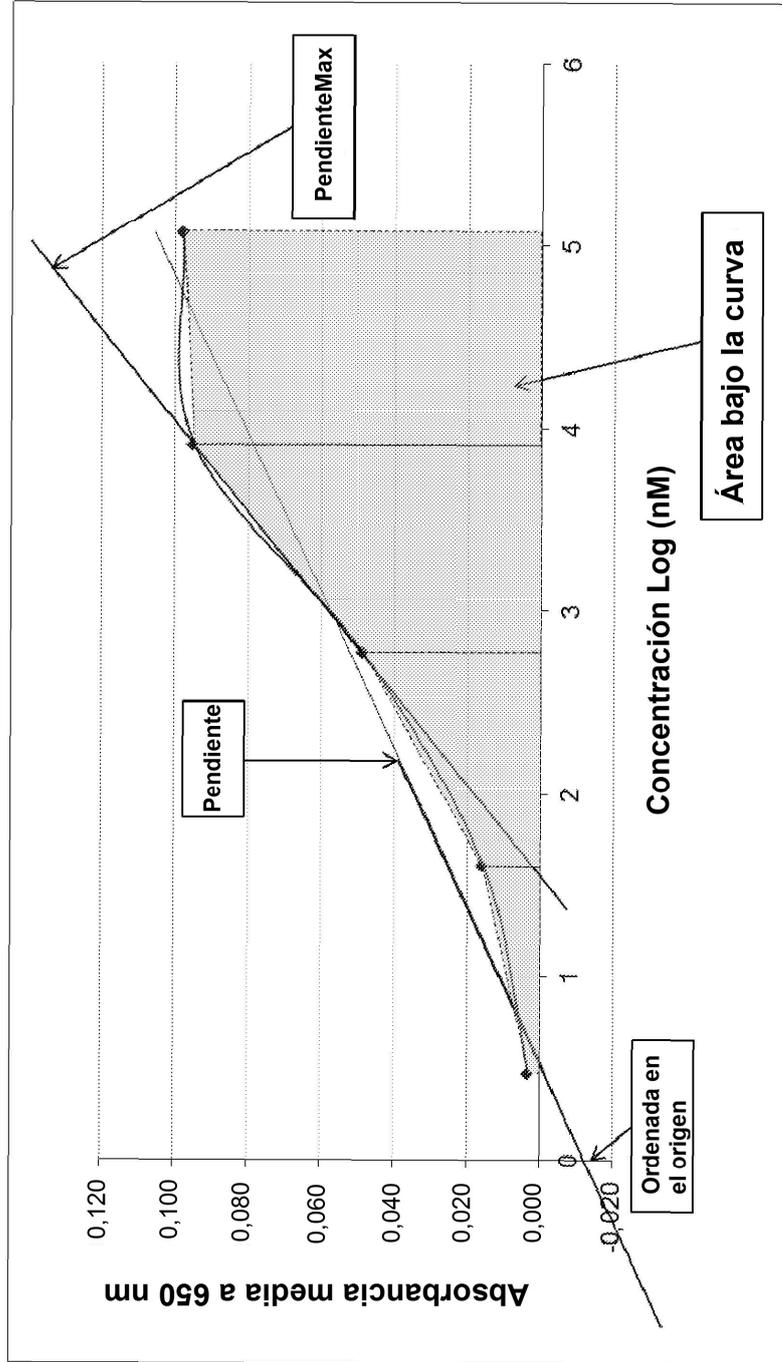


Figura 1B

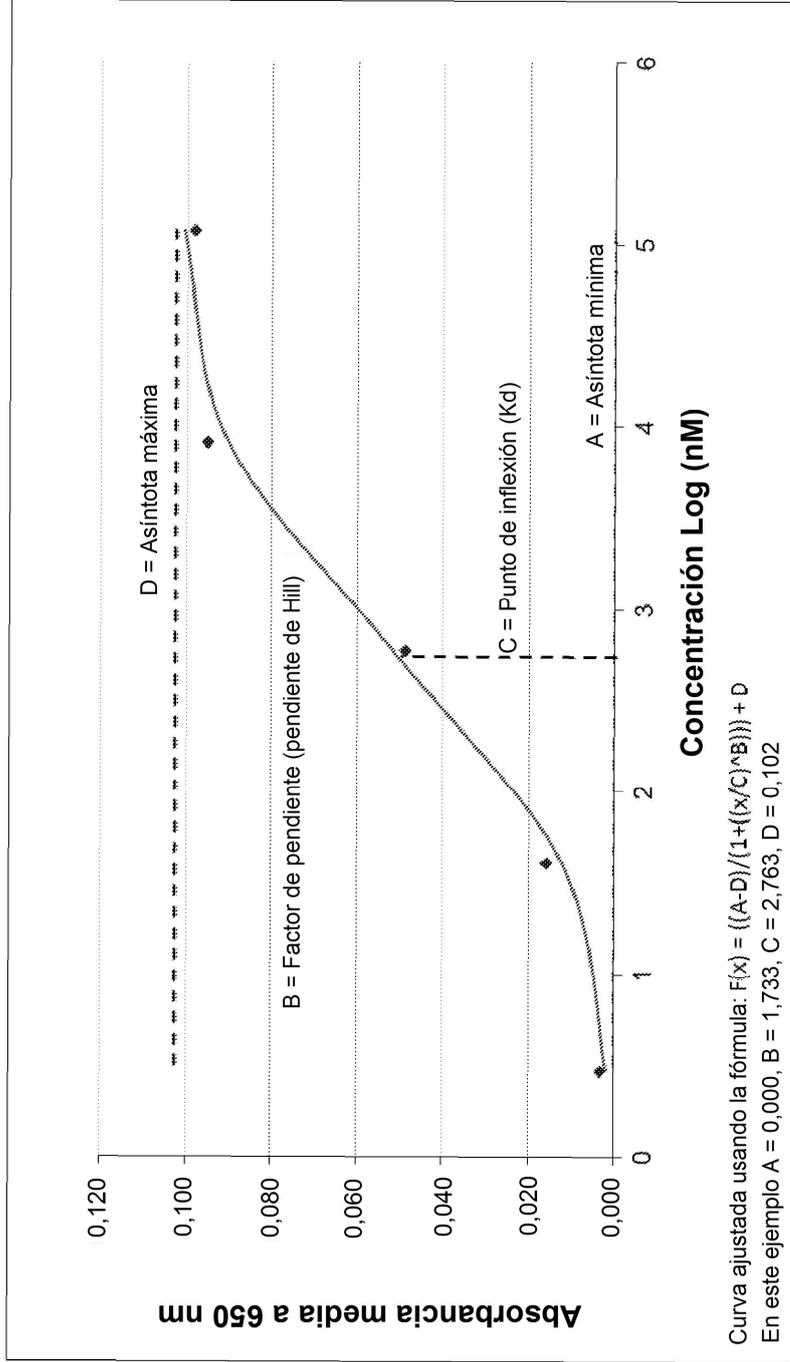
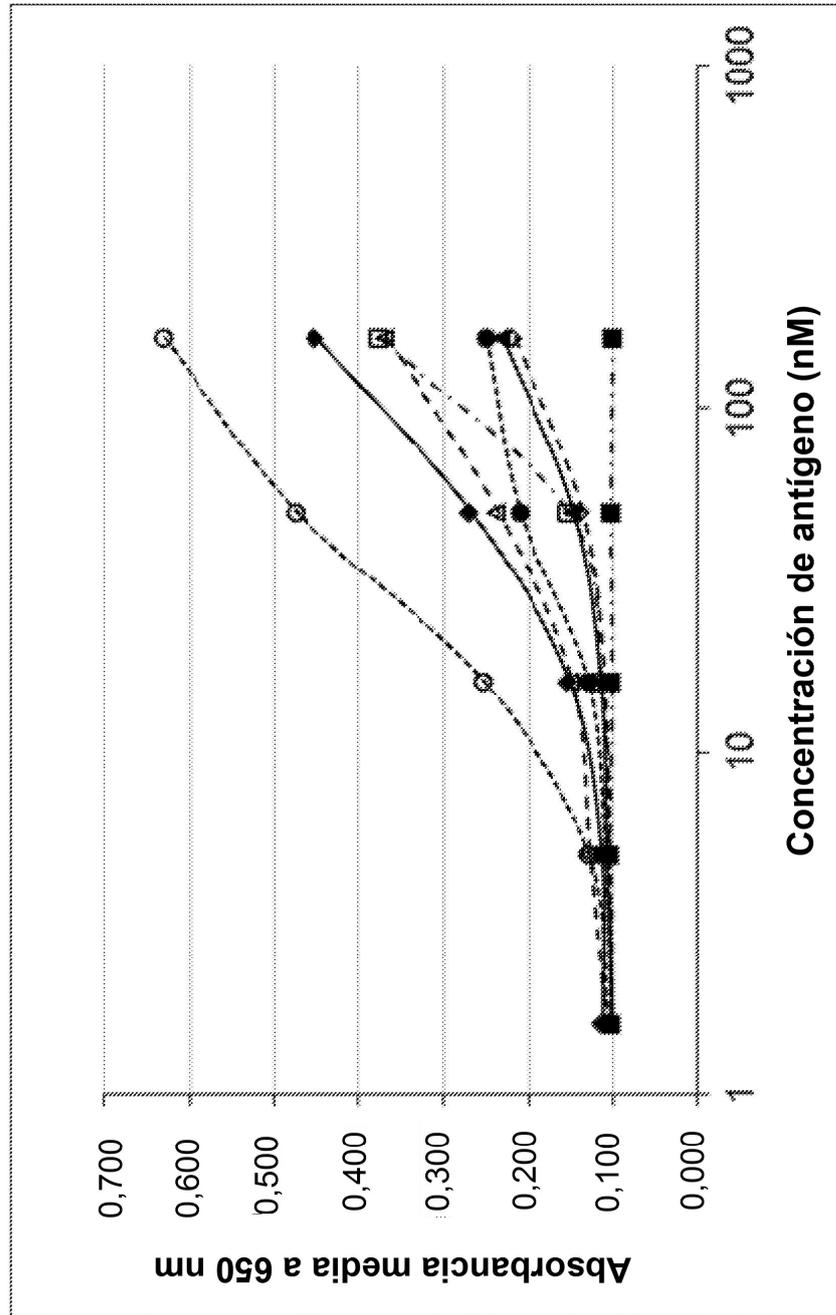
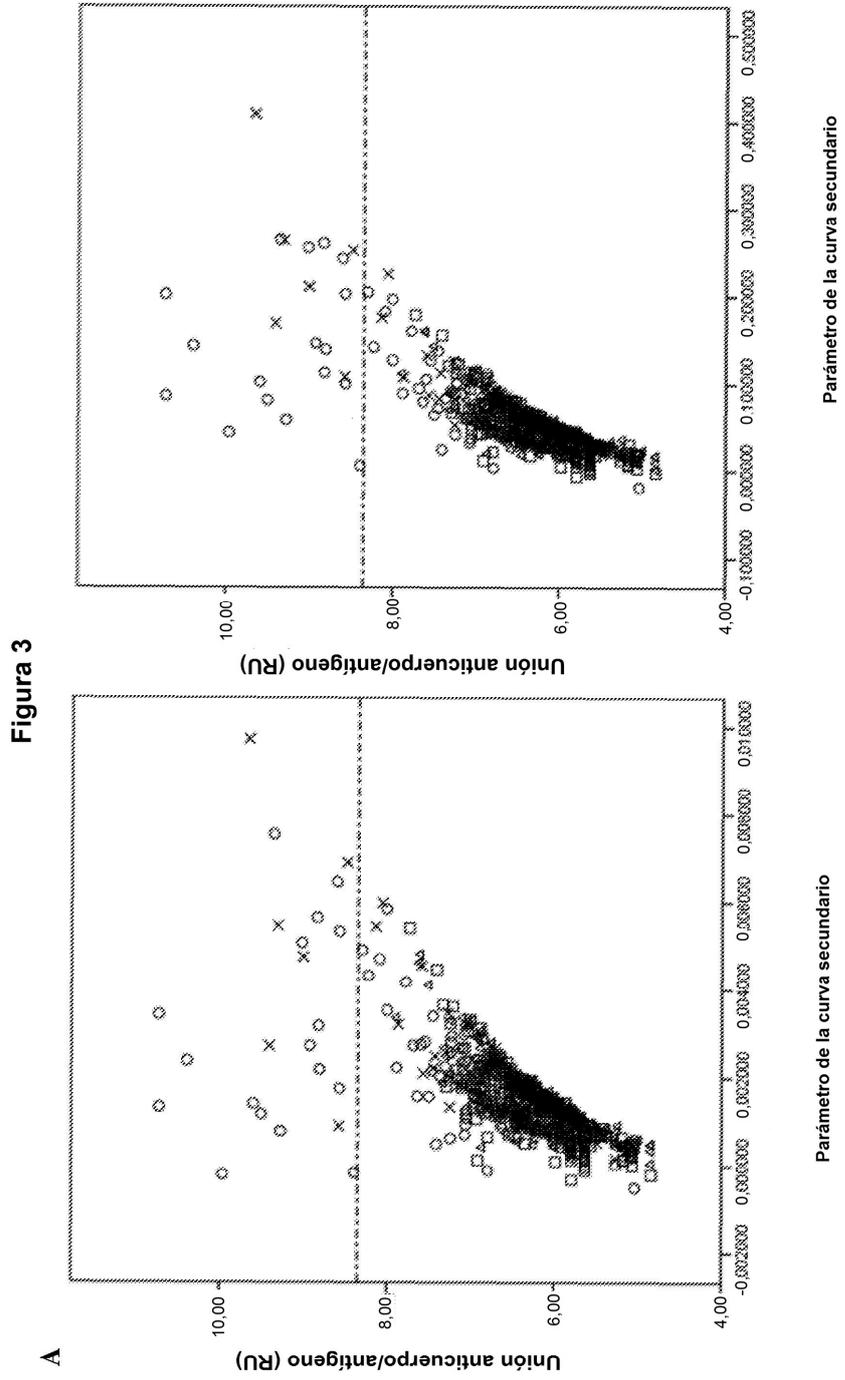
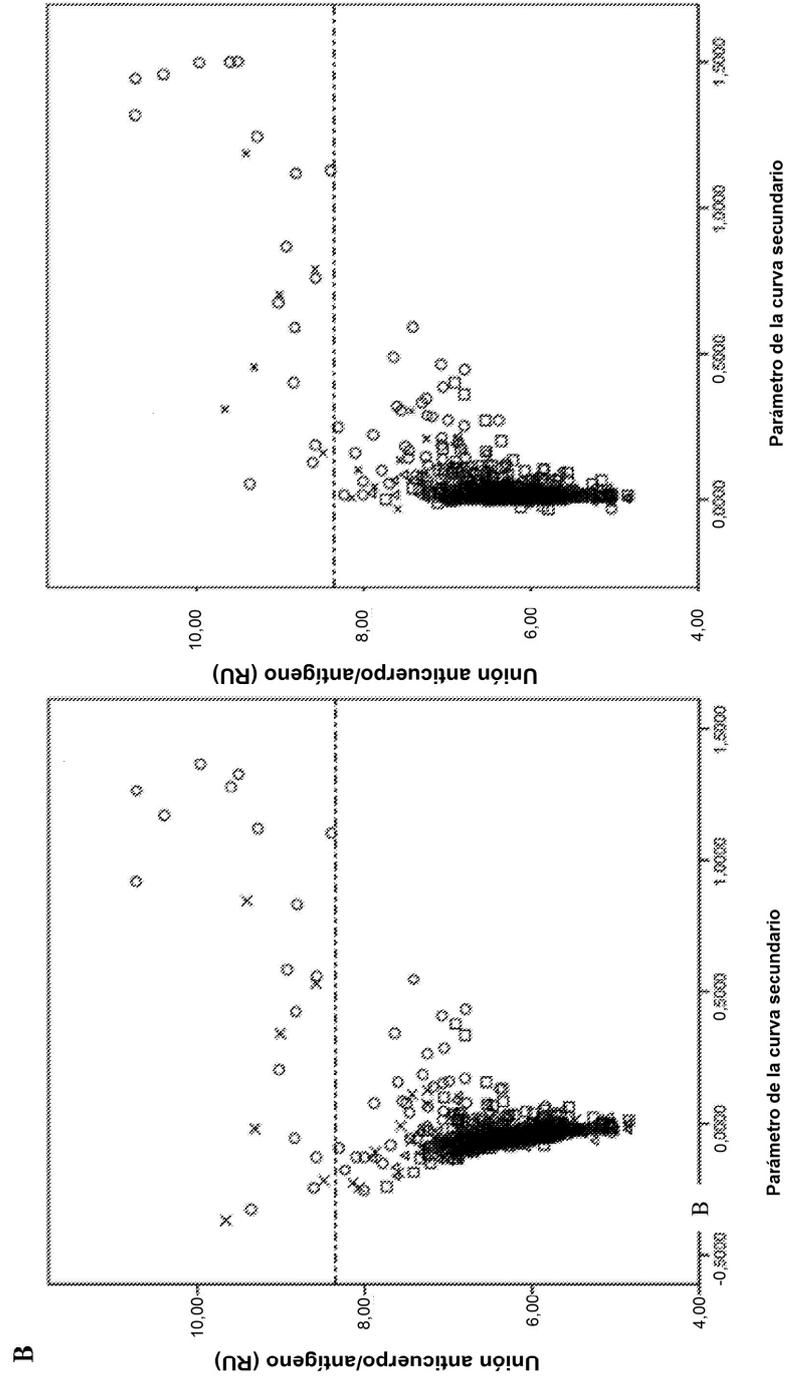
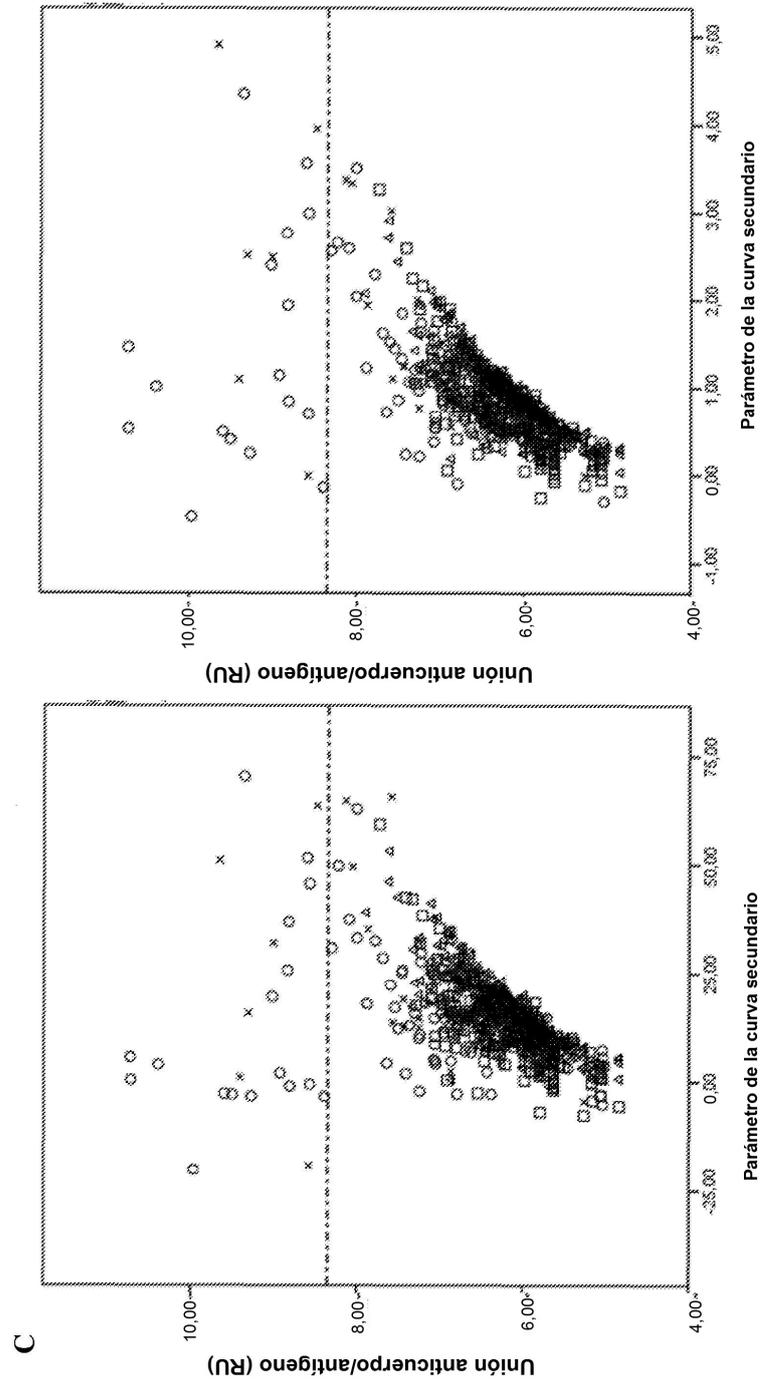


Figura 2









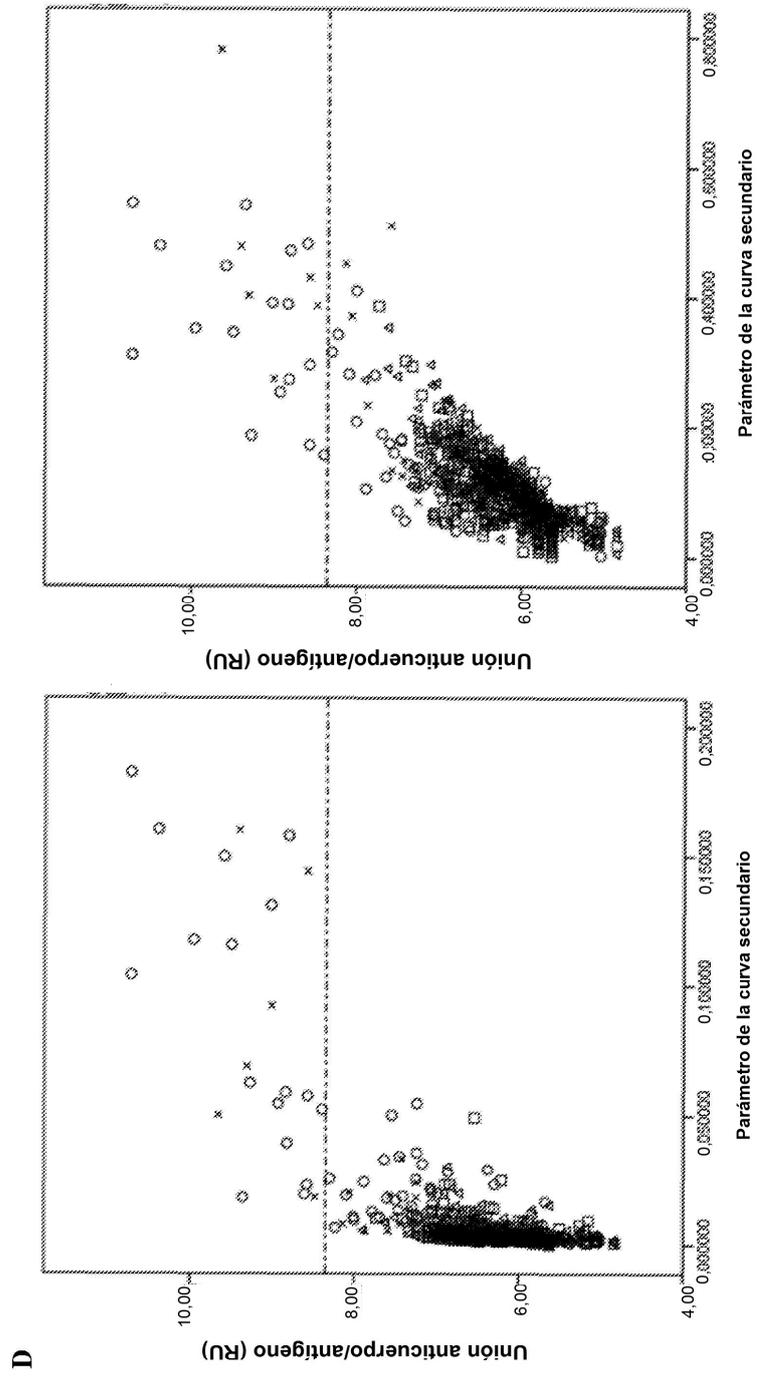
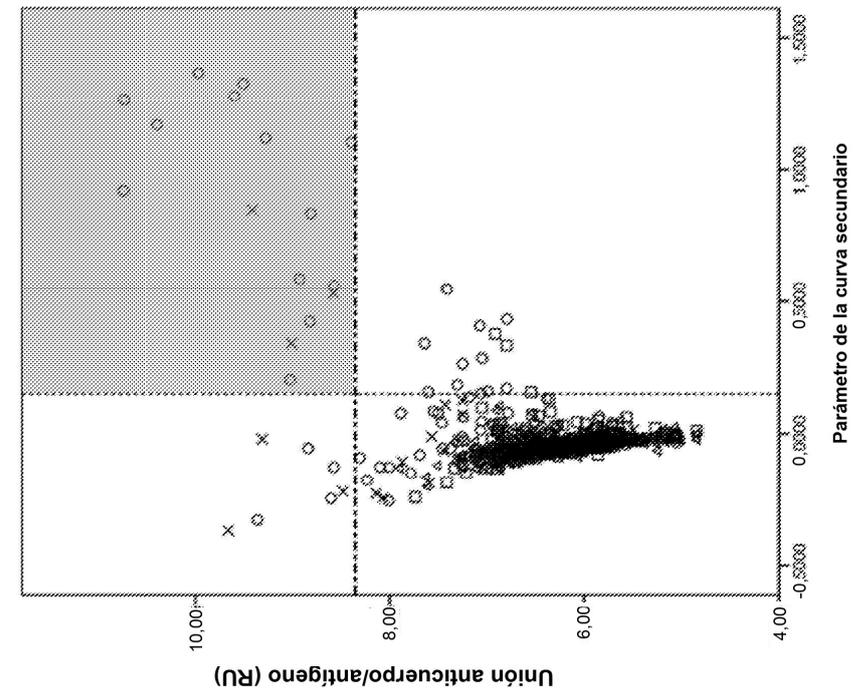
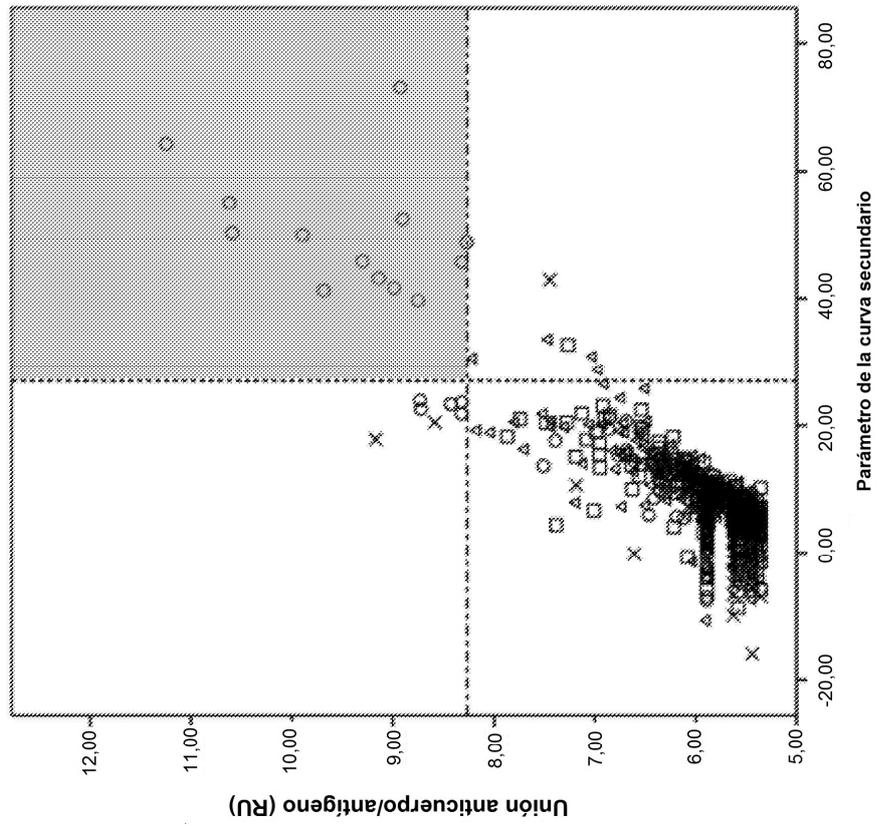


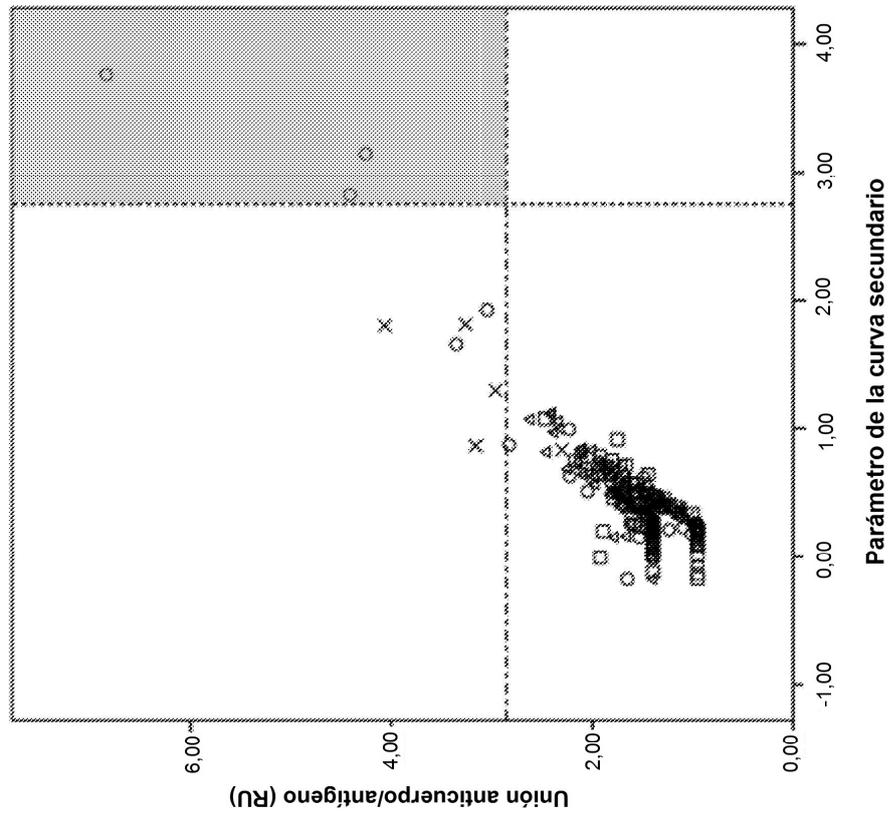
Figura 4



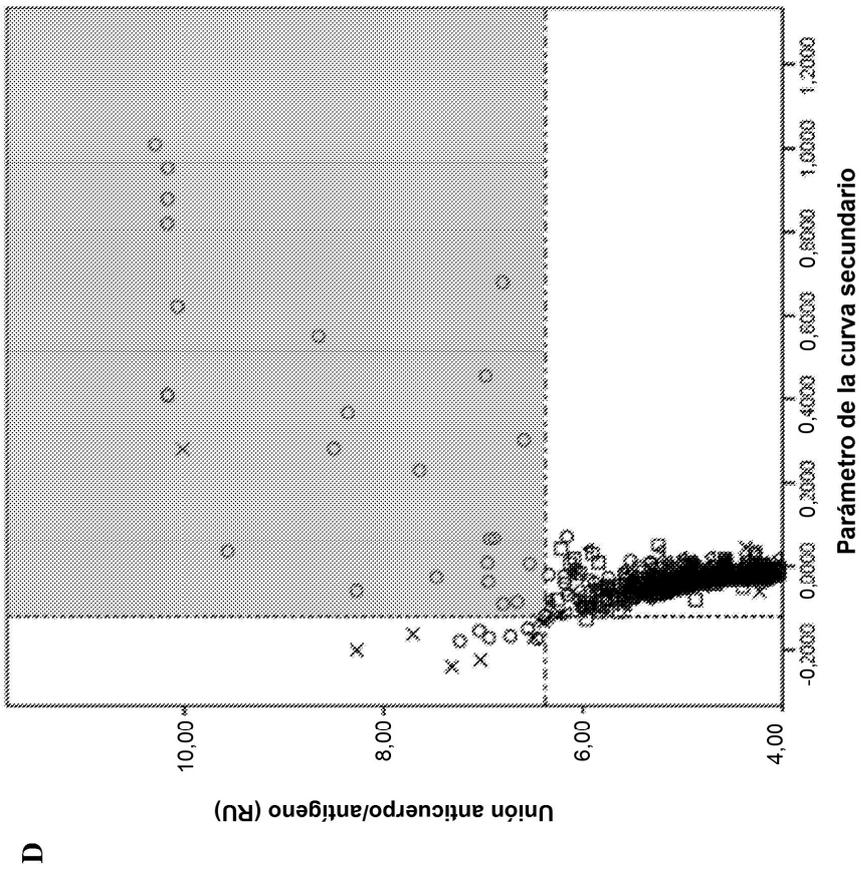
A

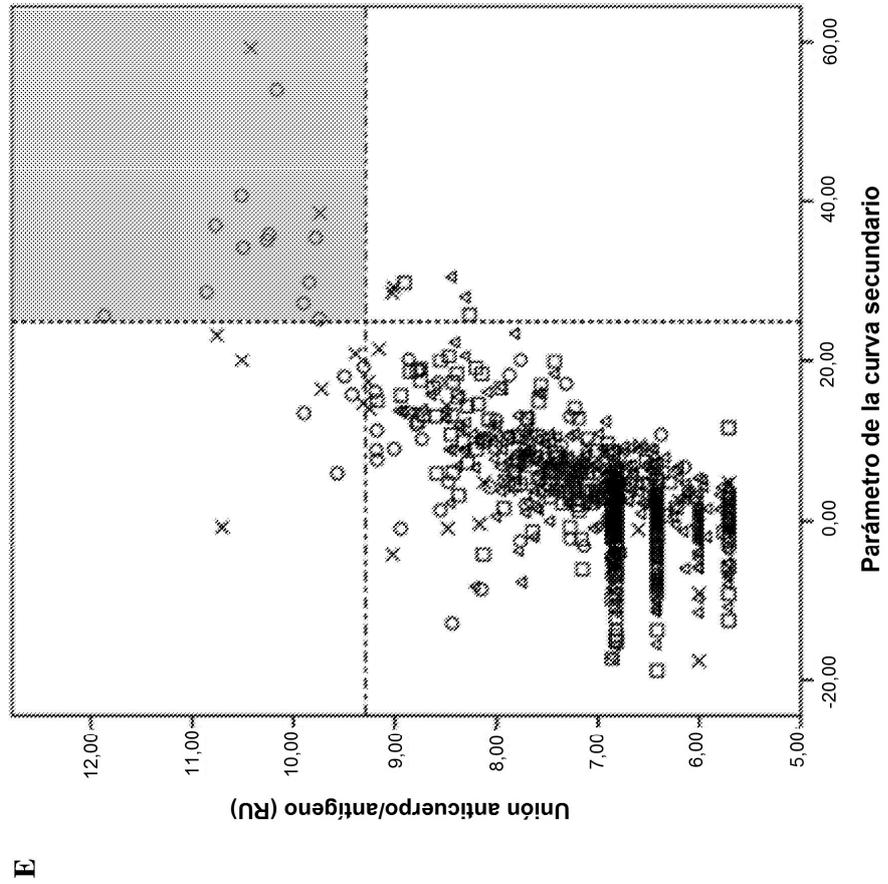


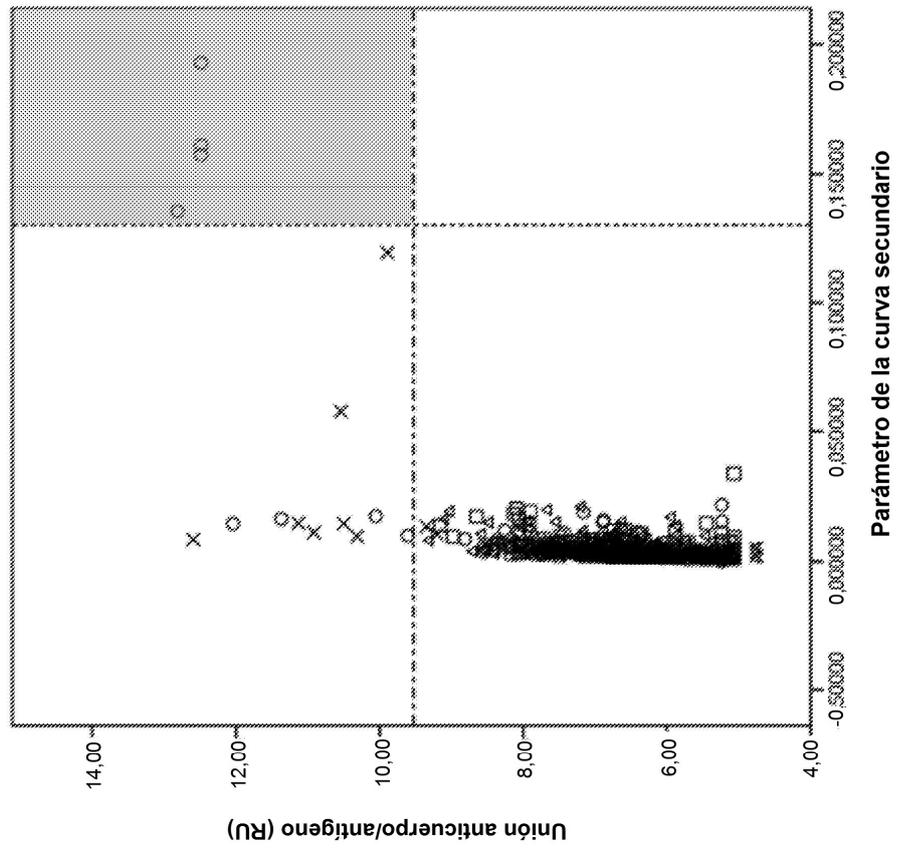
B



C

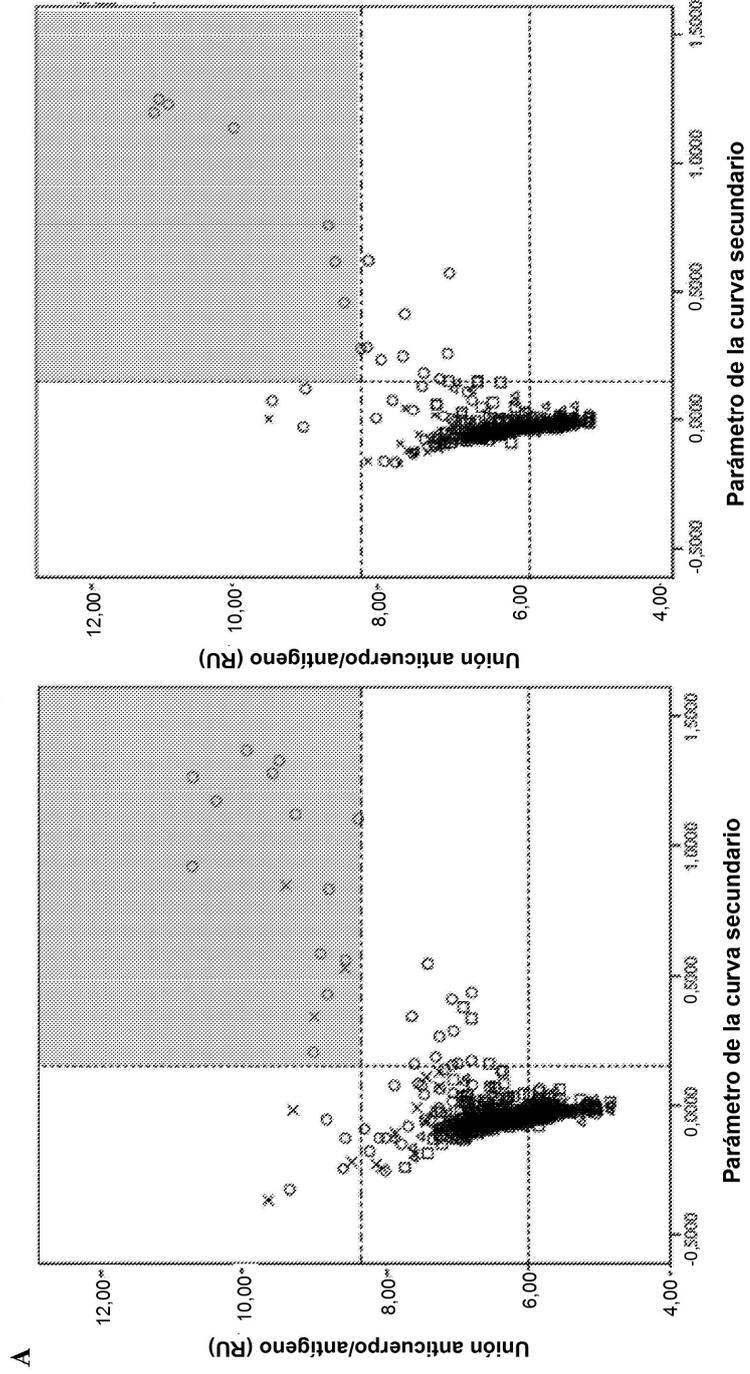


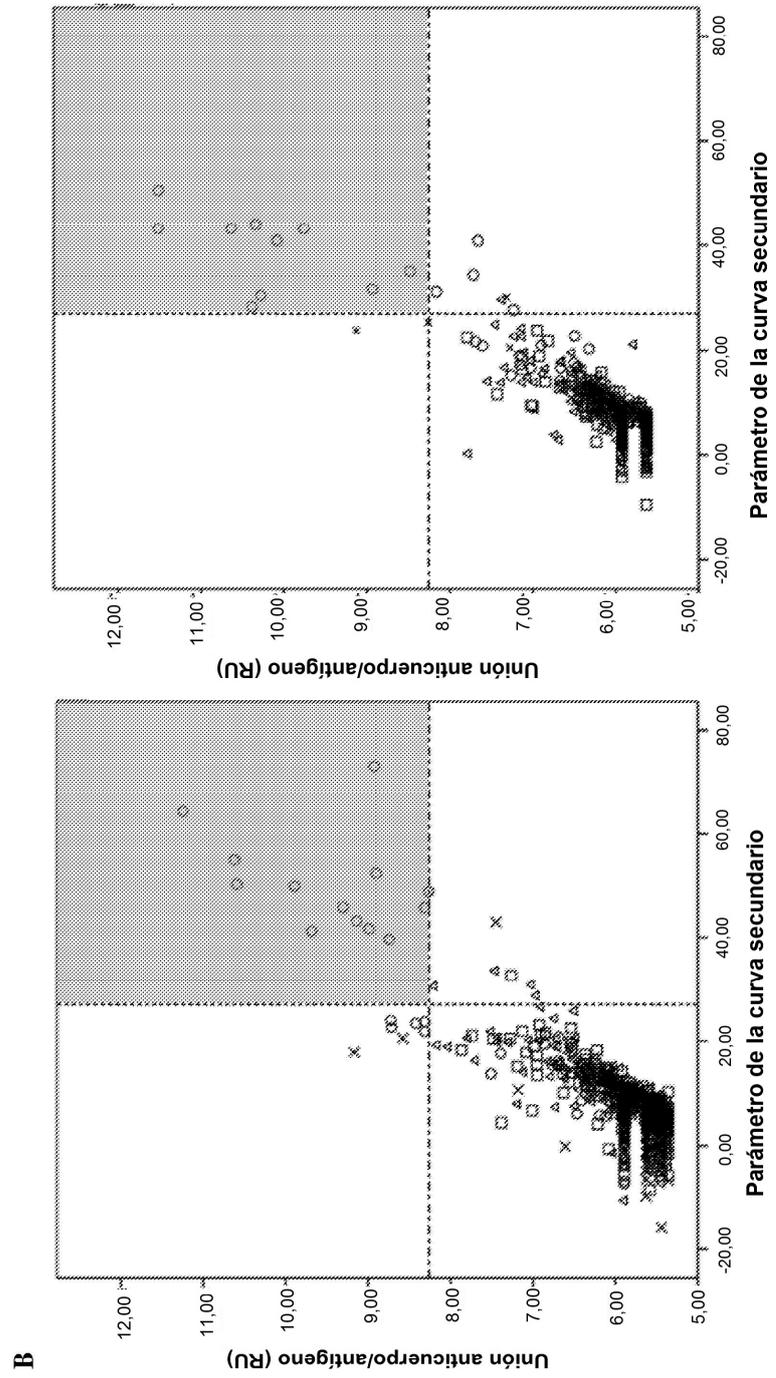


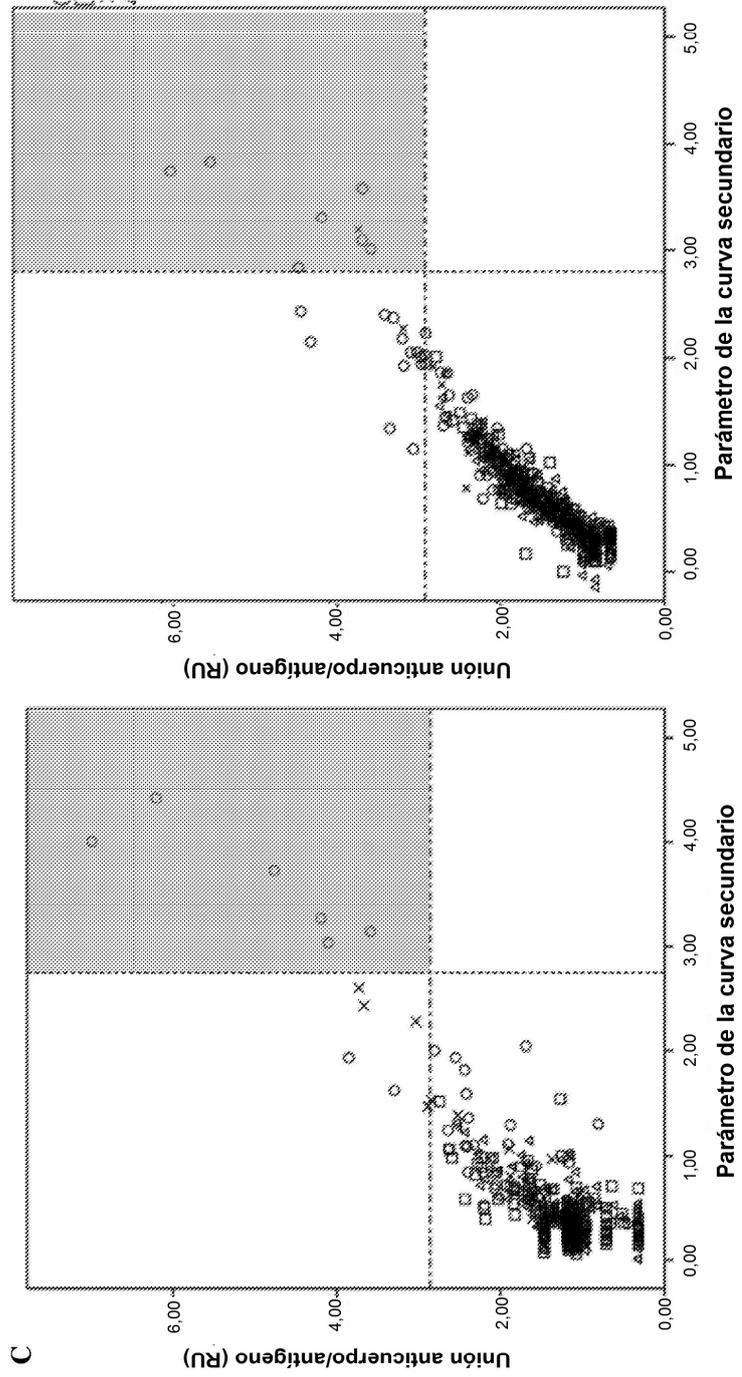


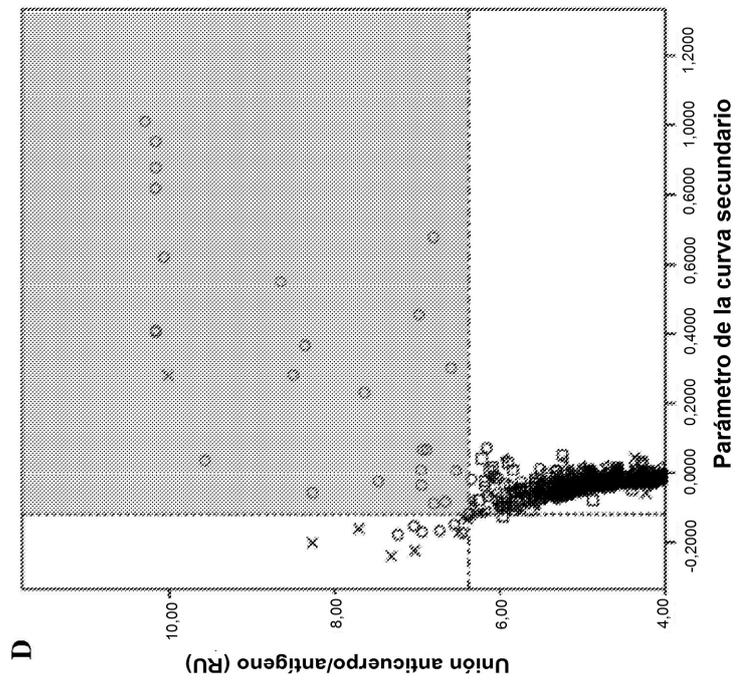
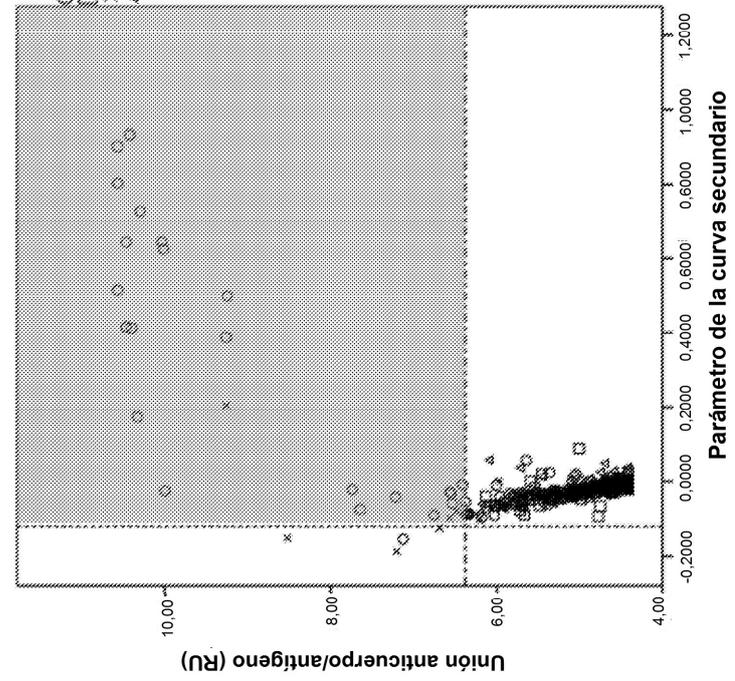
F

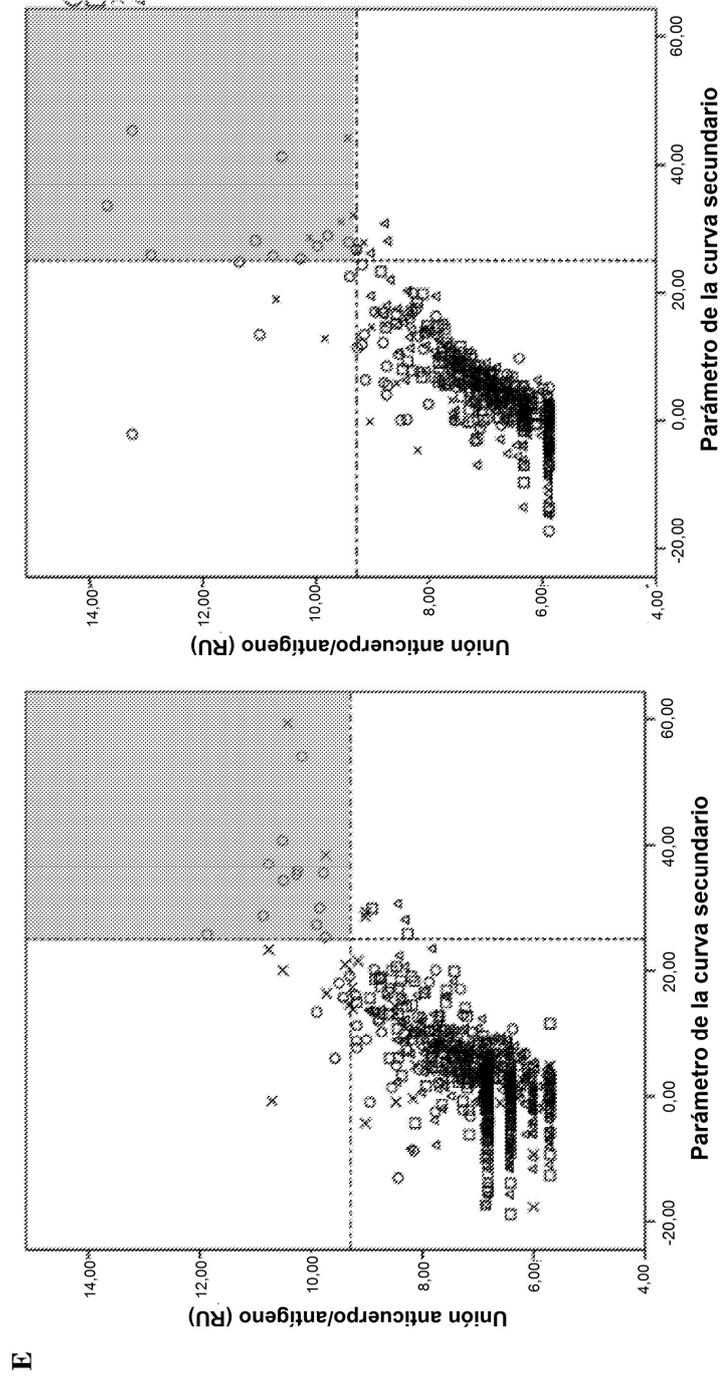
Figura 5

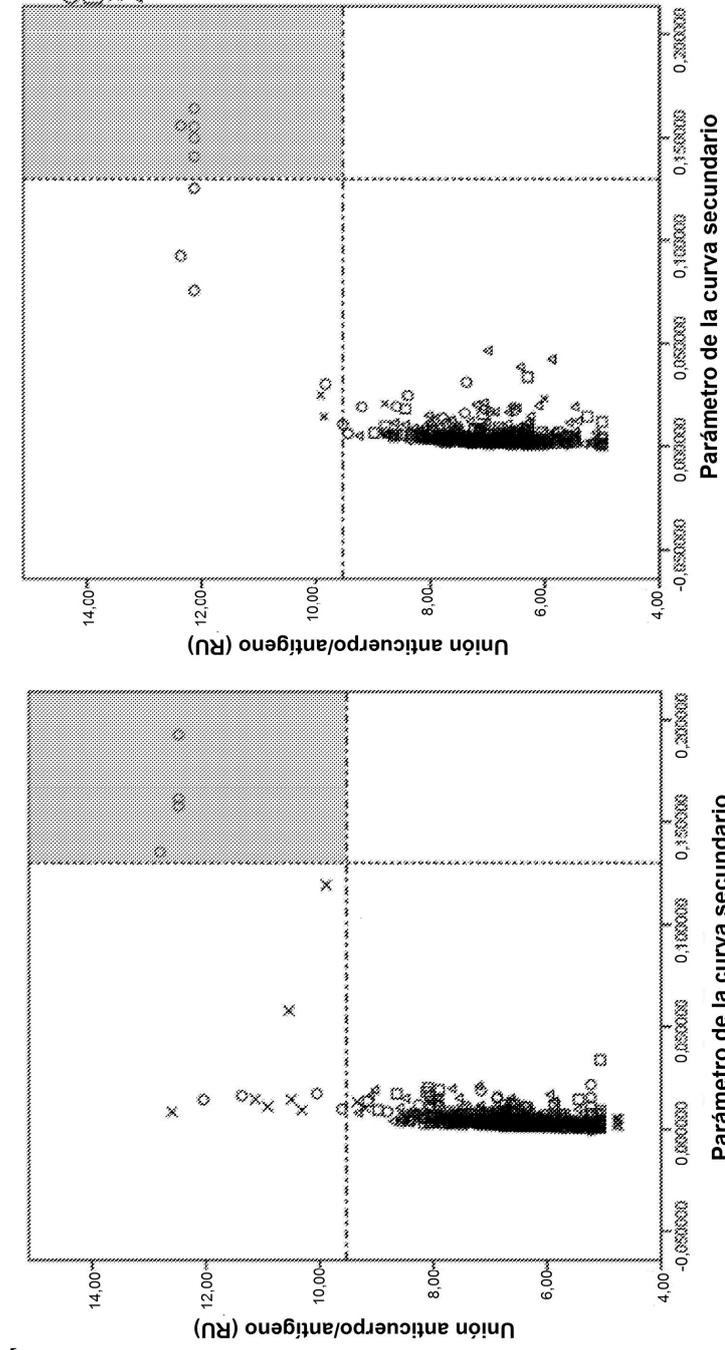






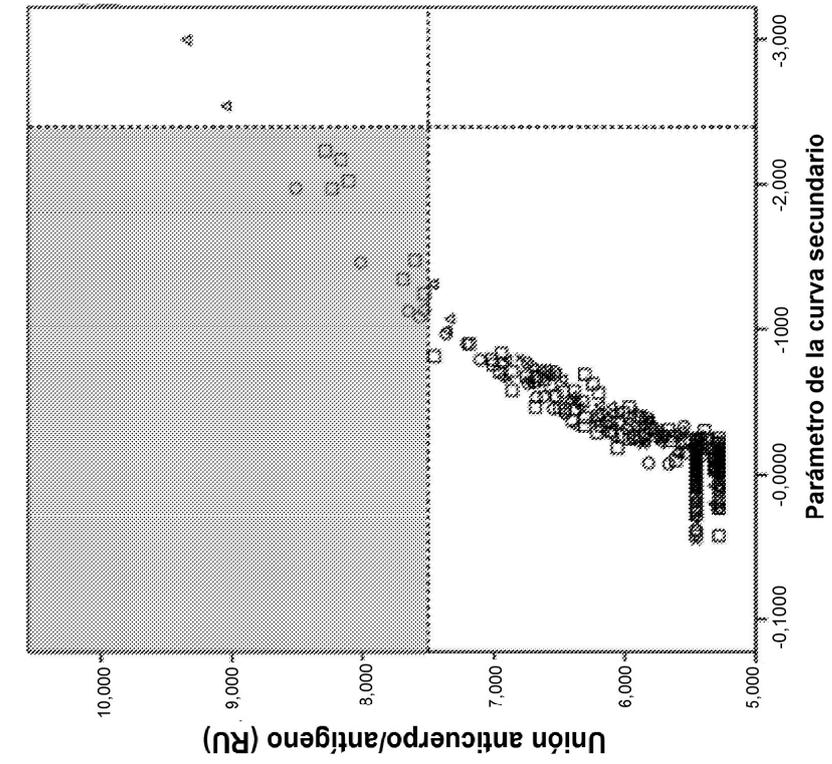




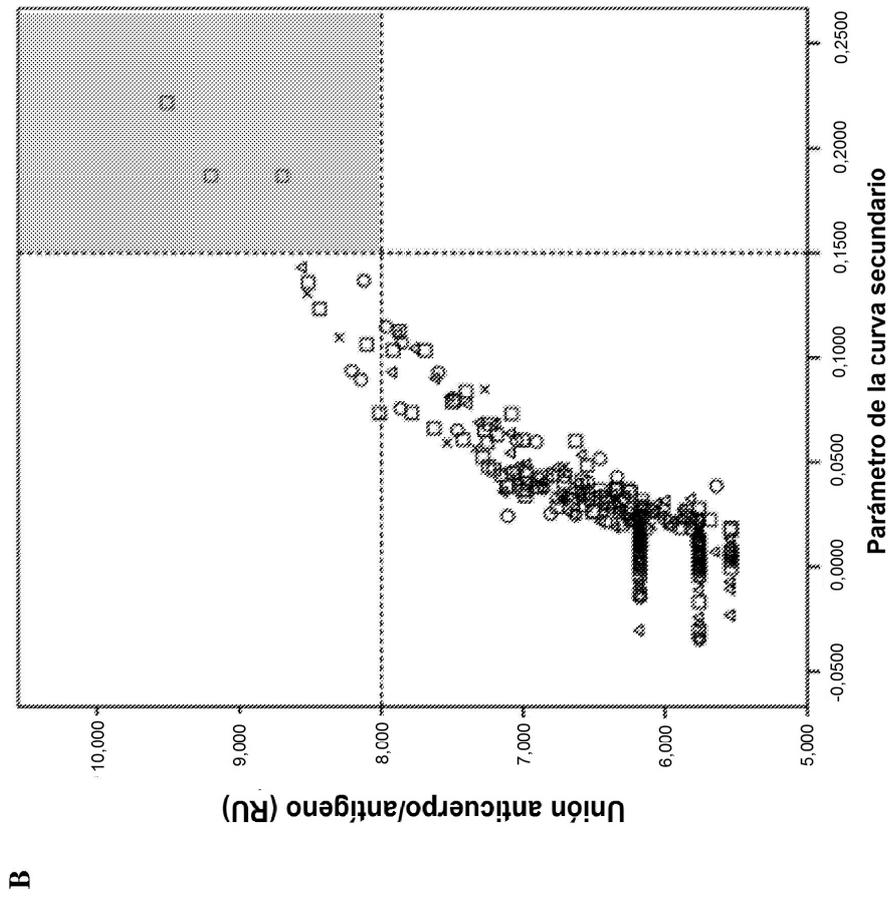


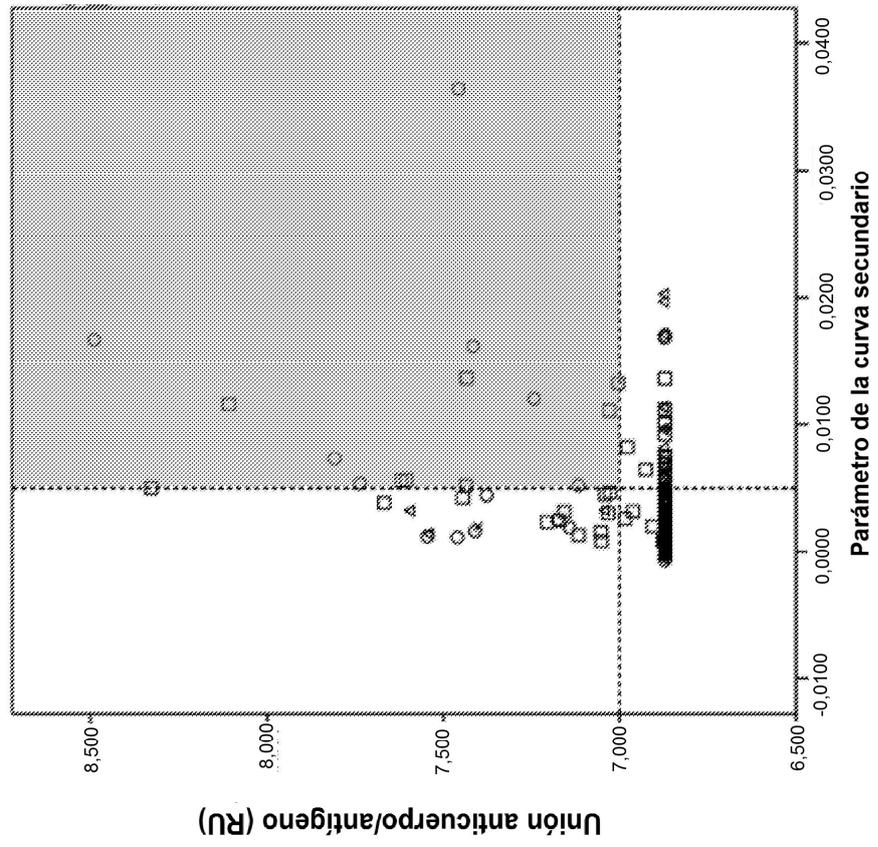
F

Figura 6

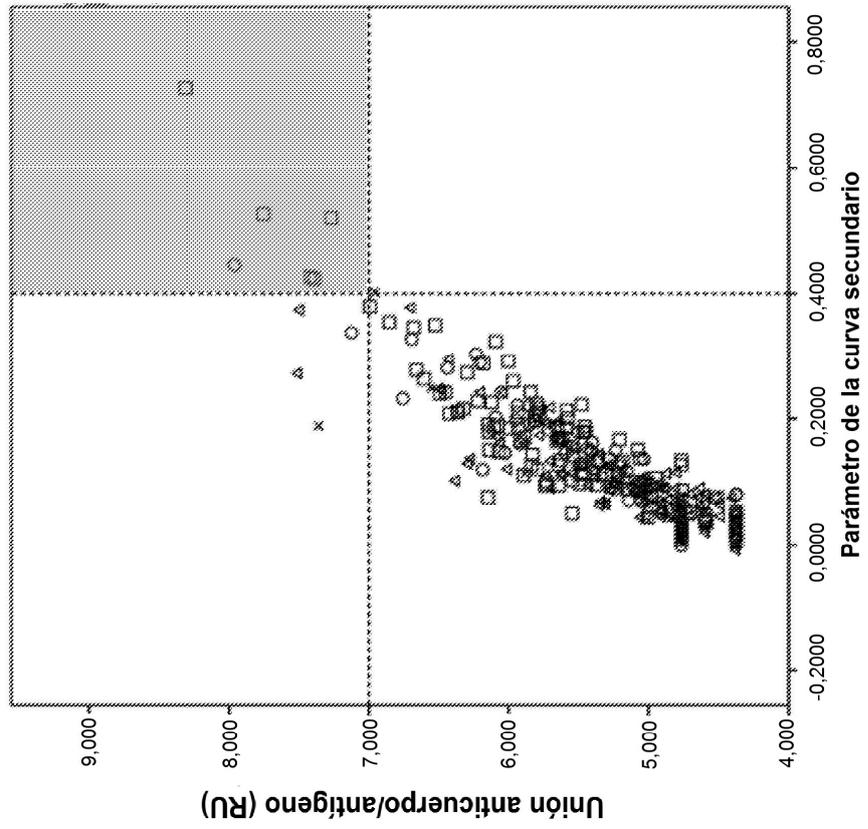


A



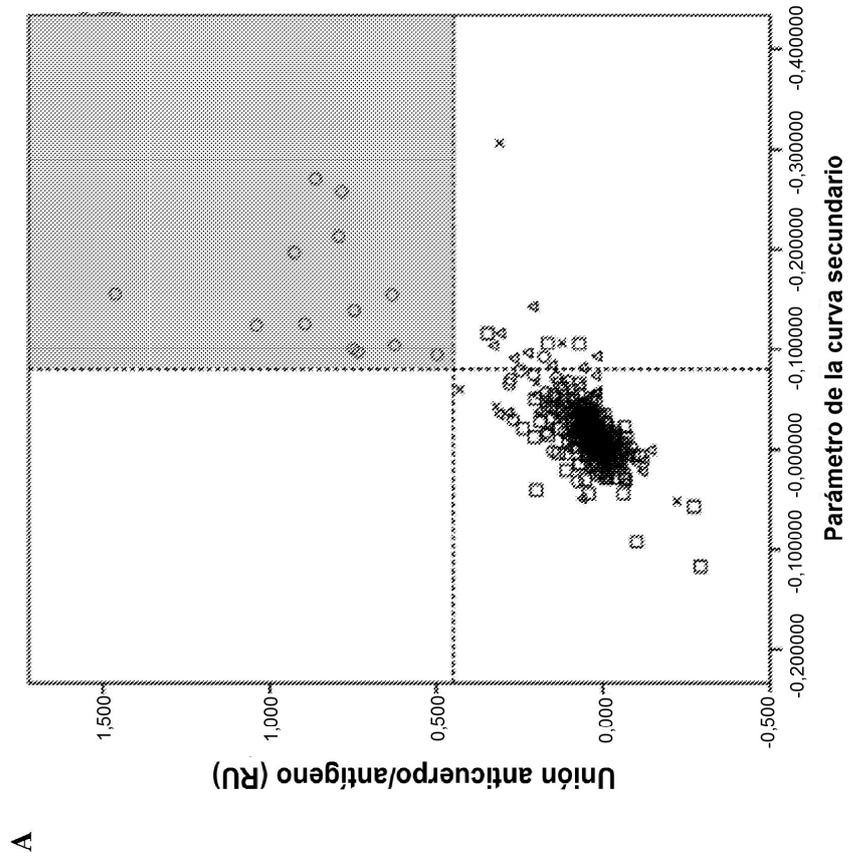


C

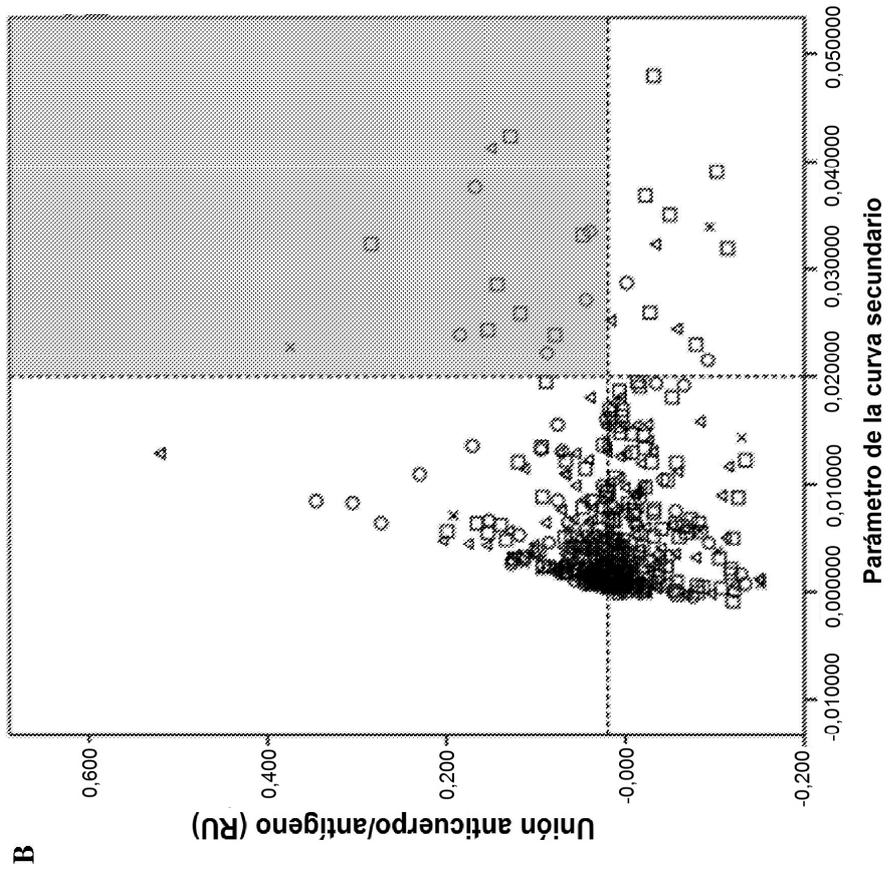


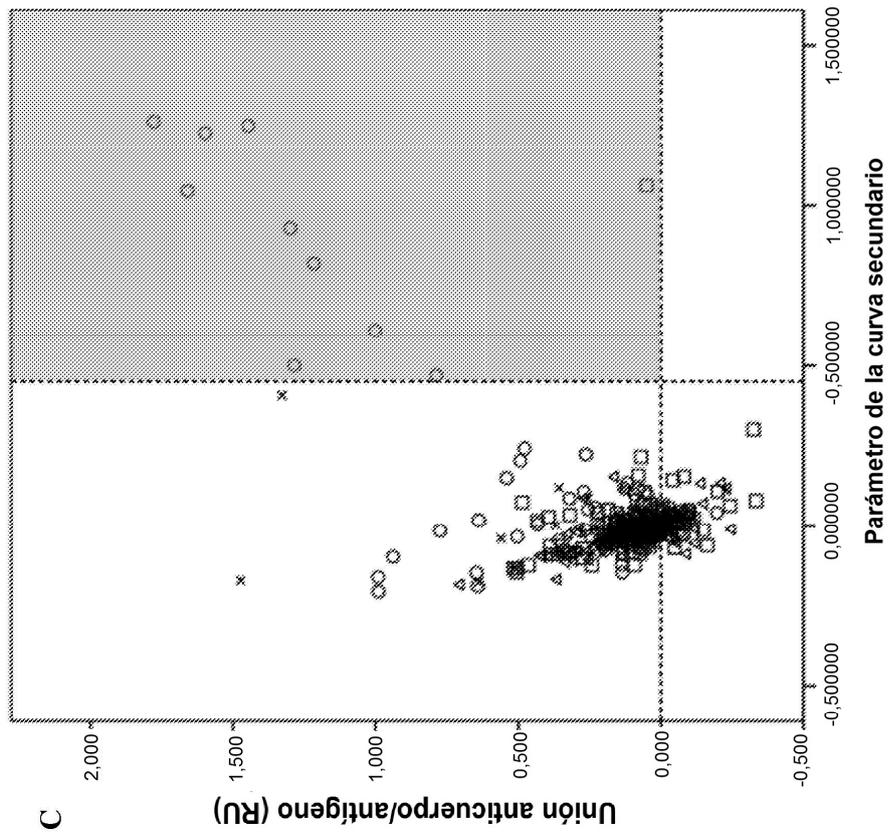
D

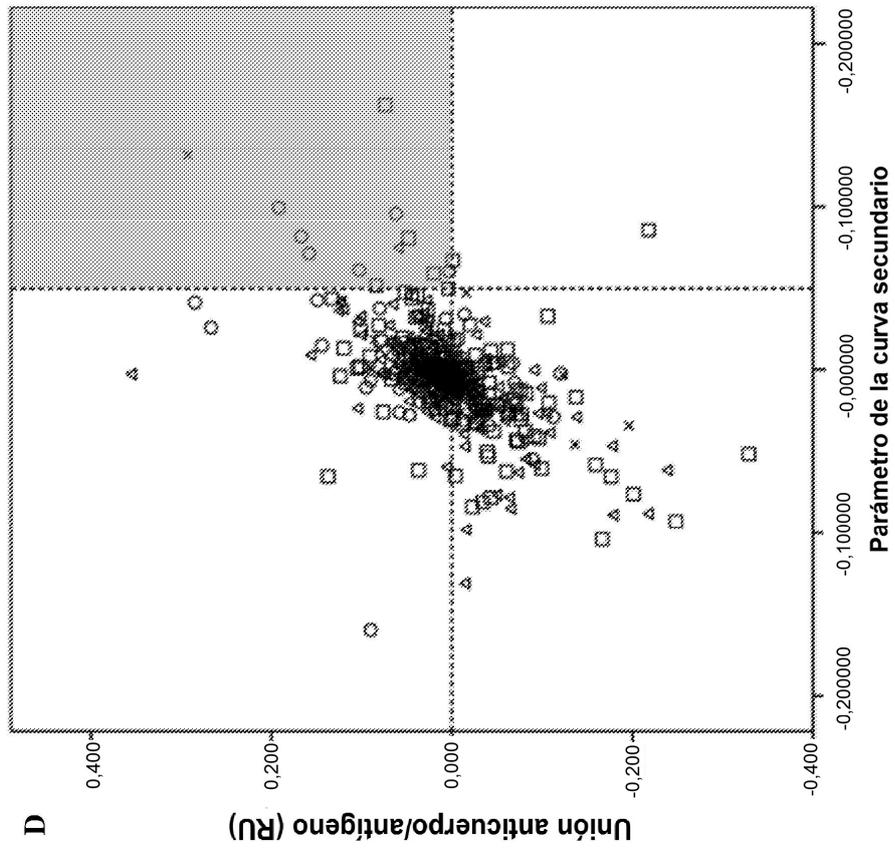
Figura 7

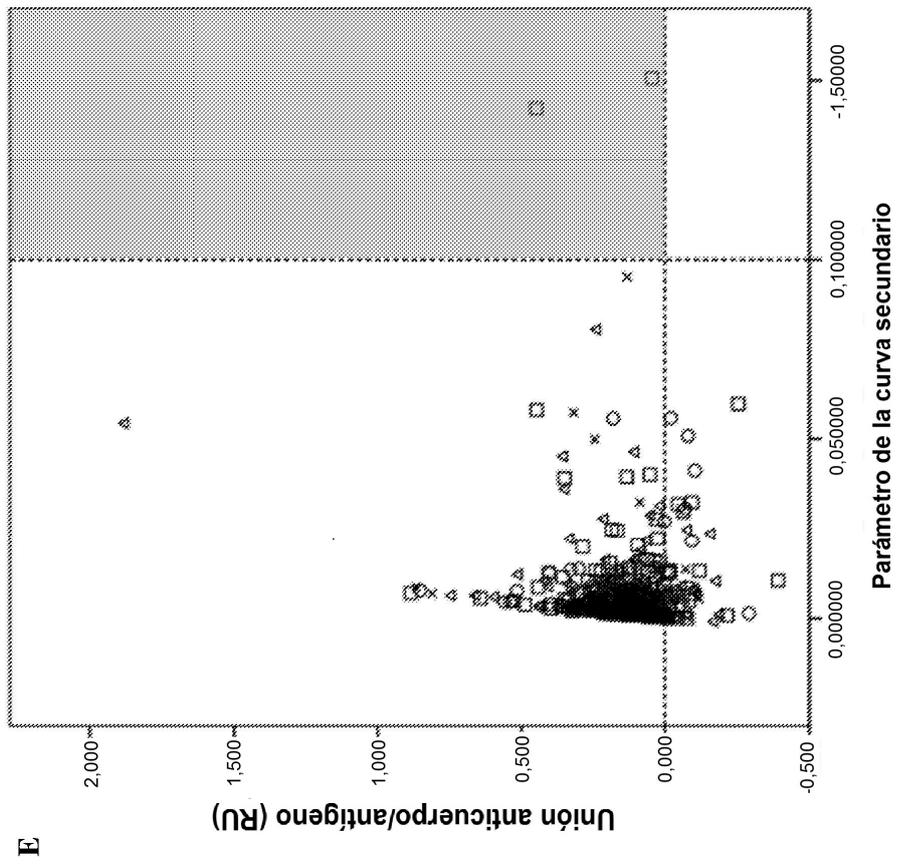


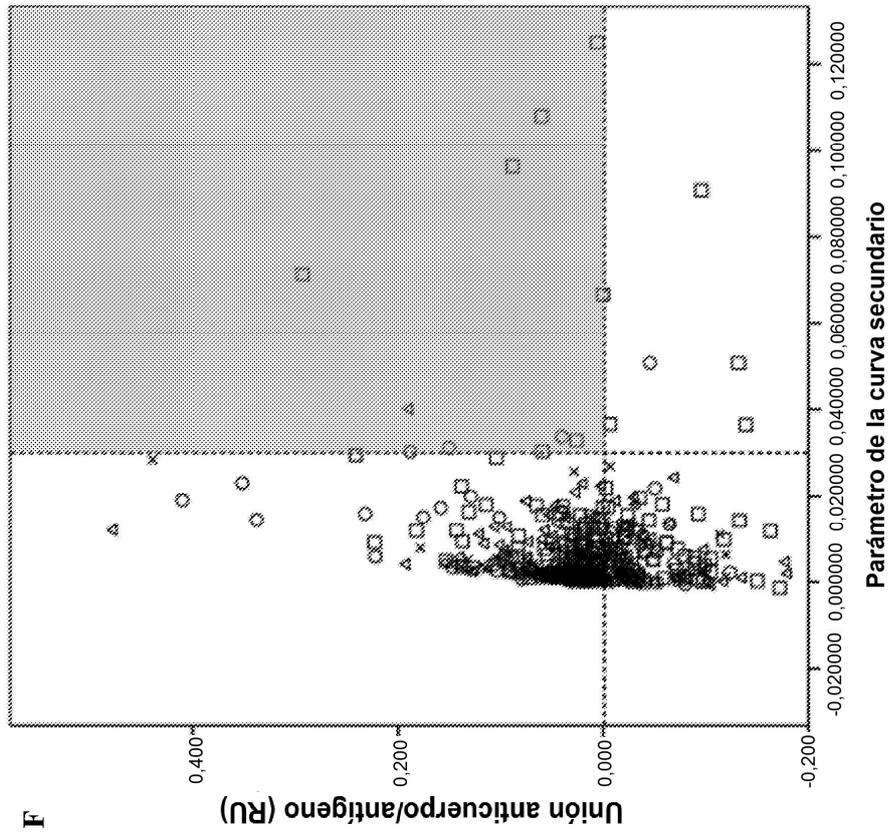
A











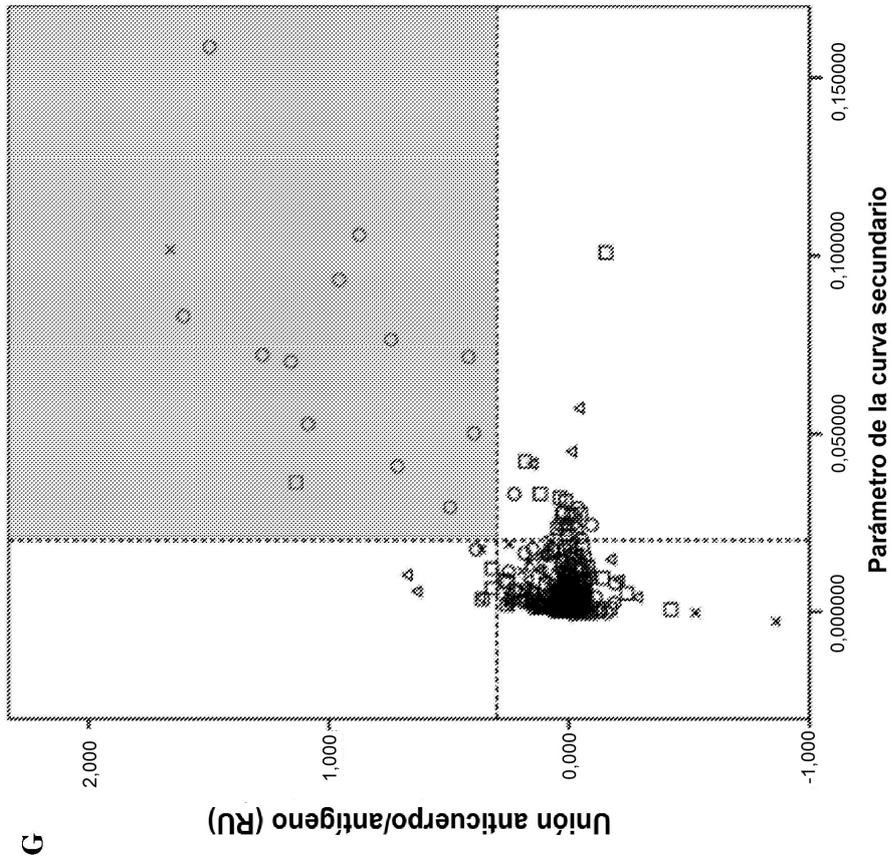
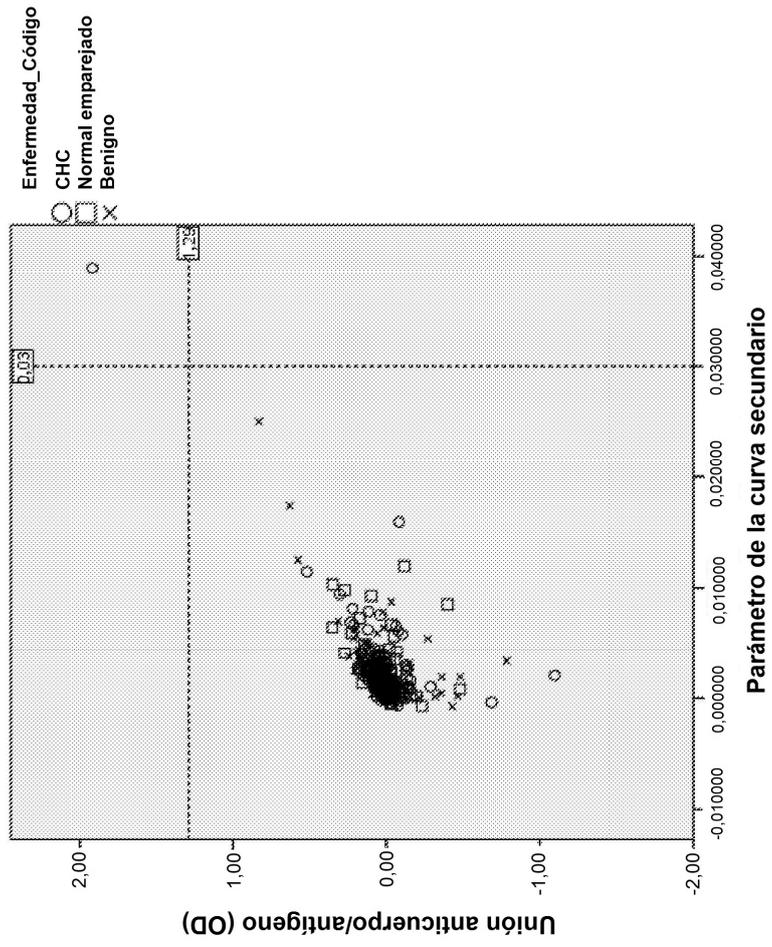
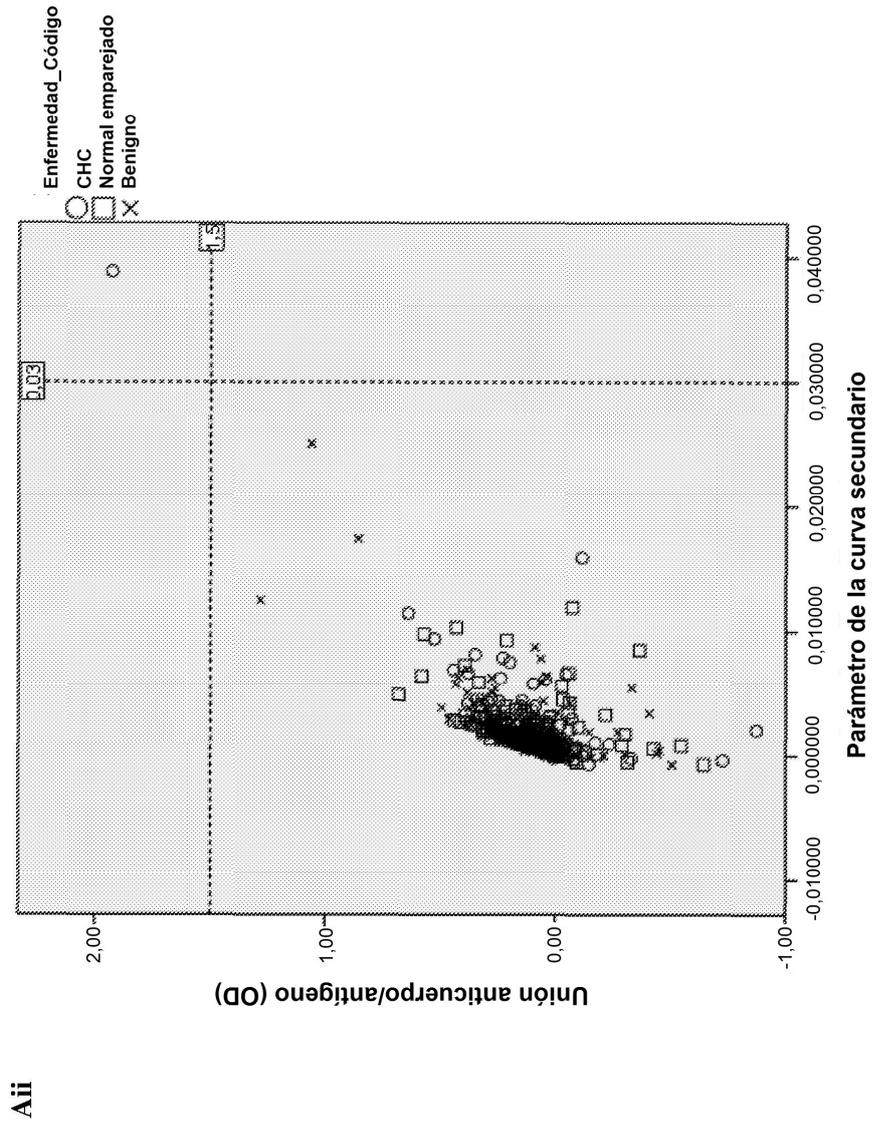
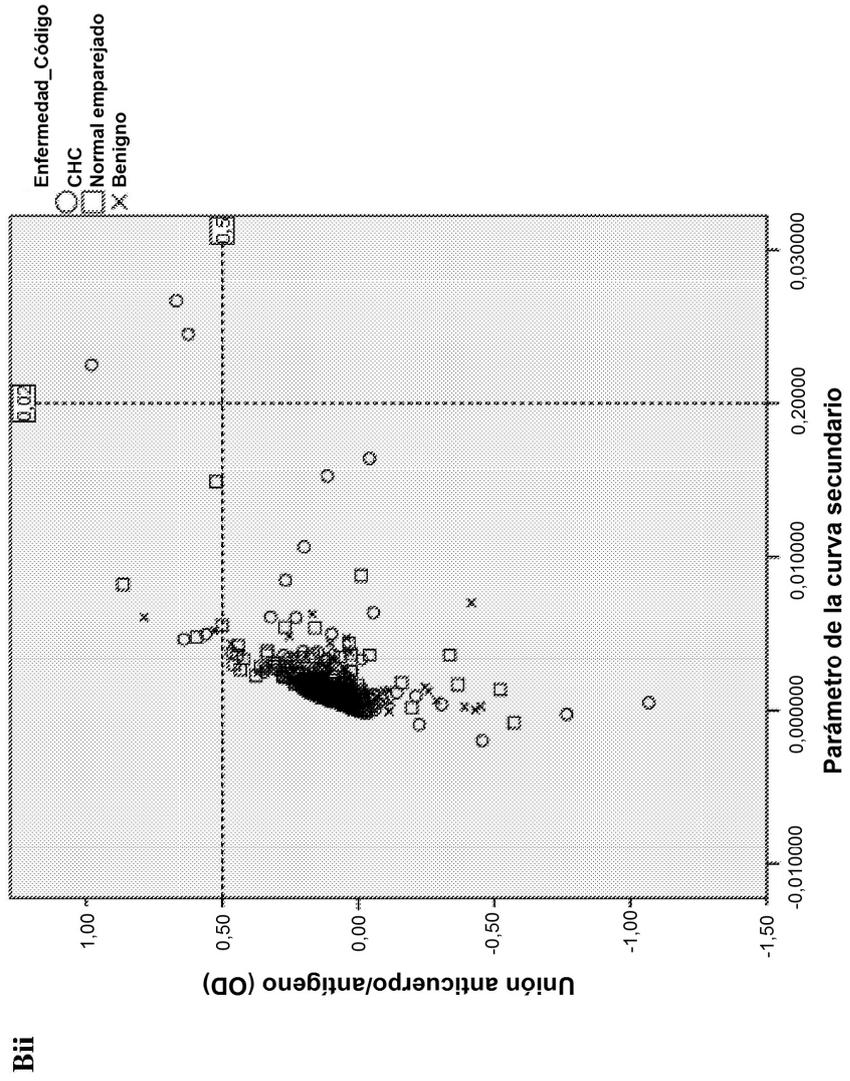


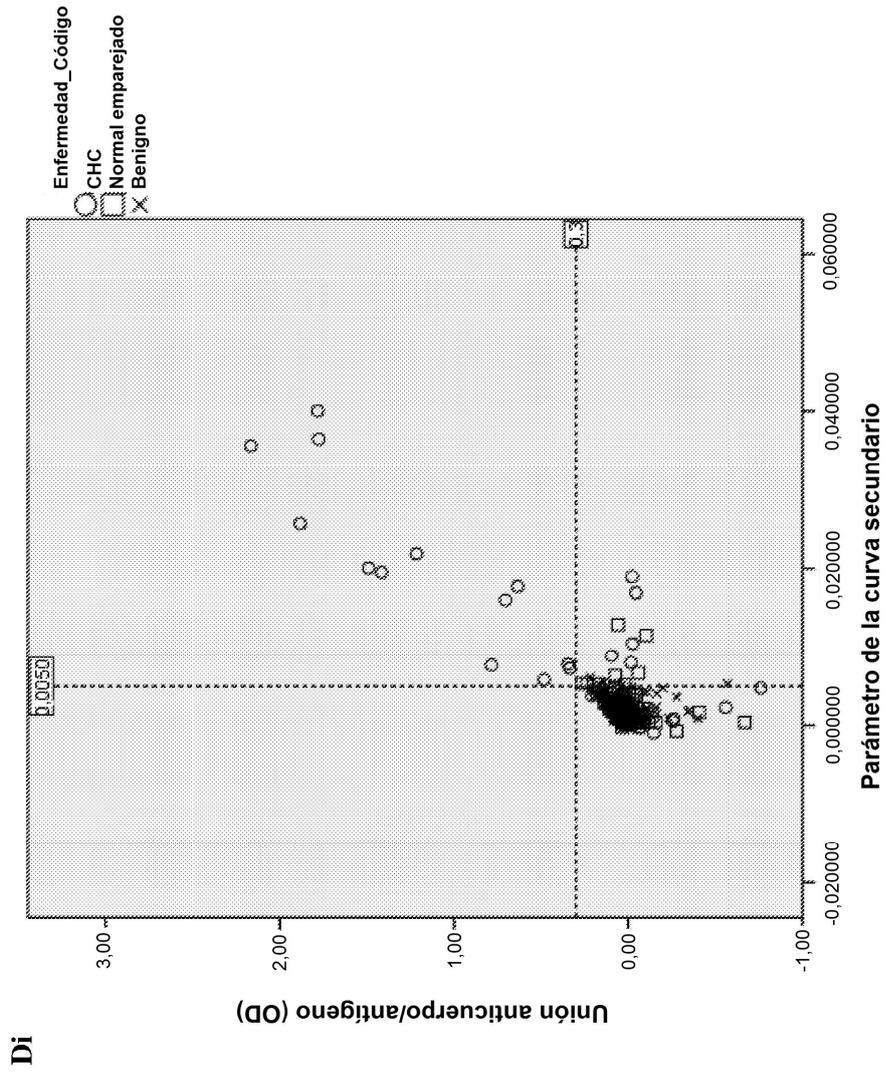
Figura 8

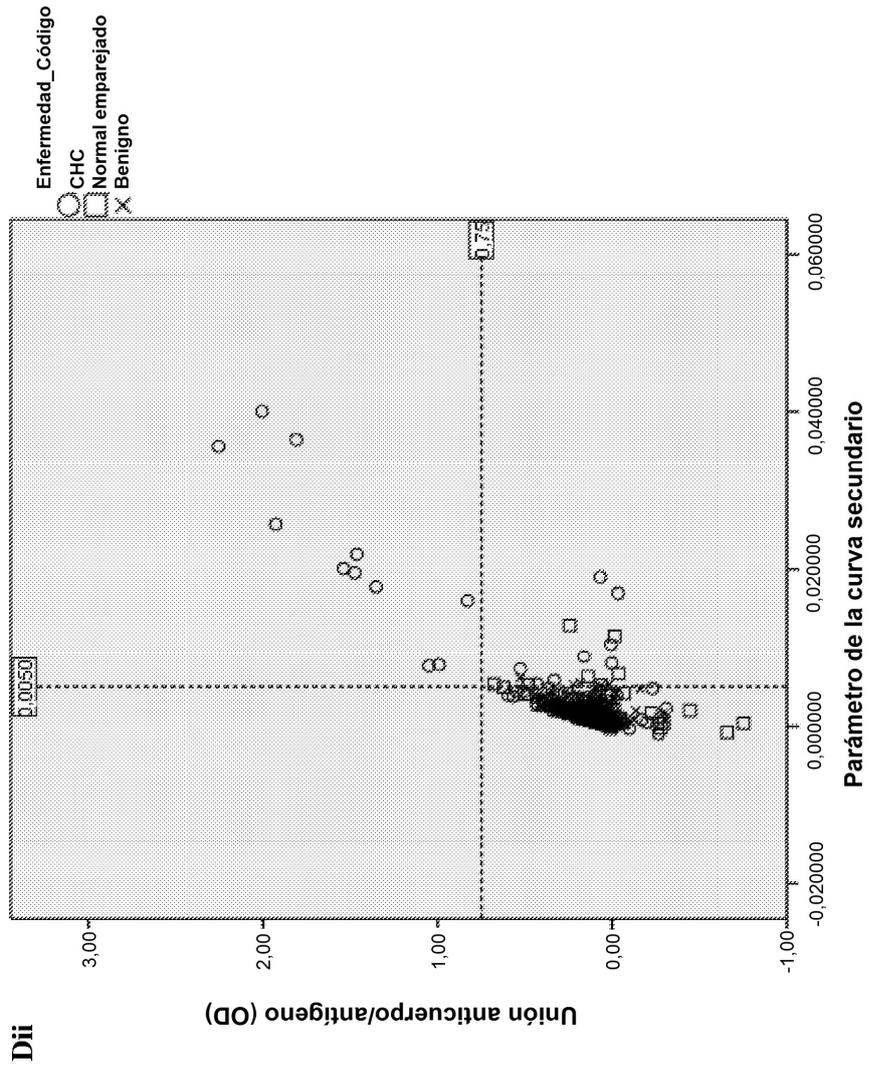
Ai

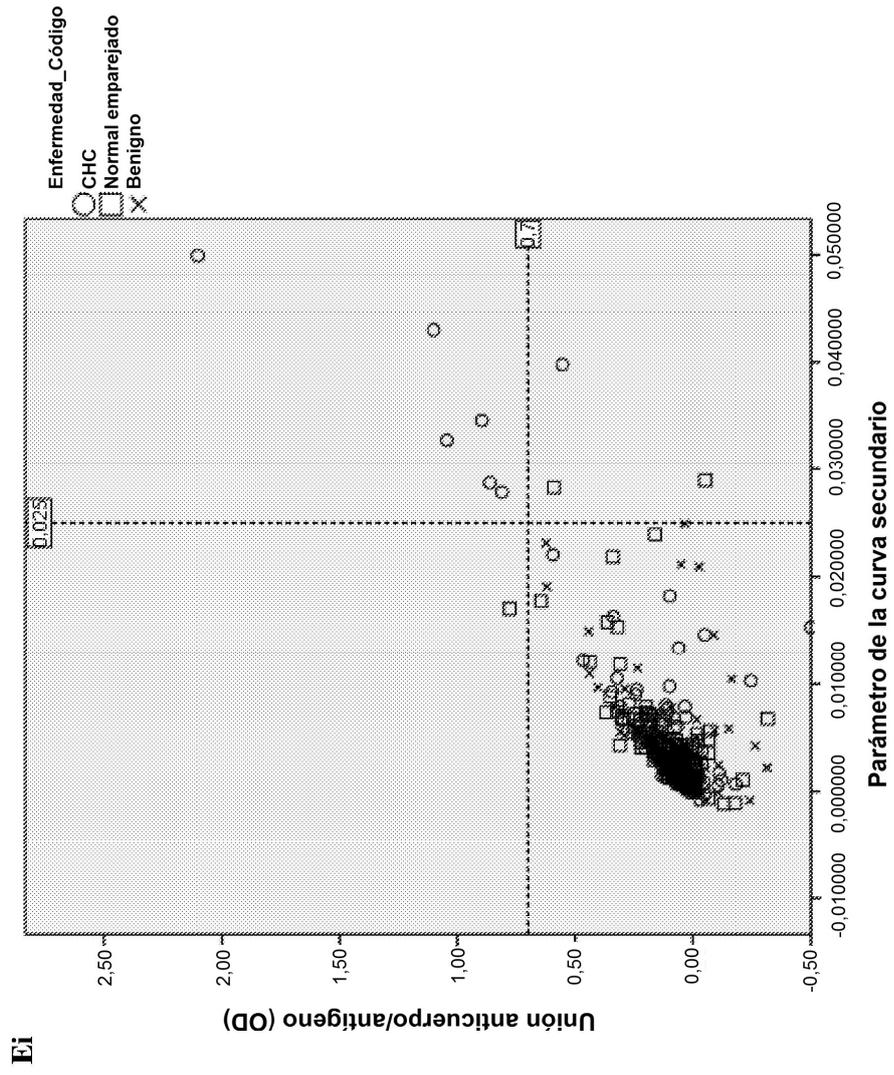


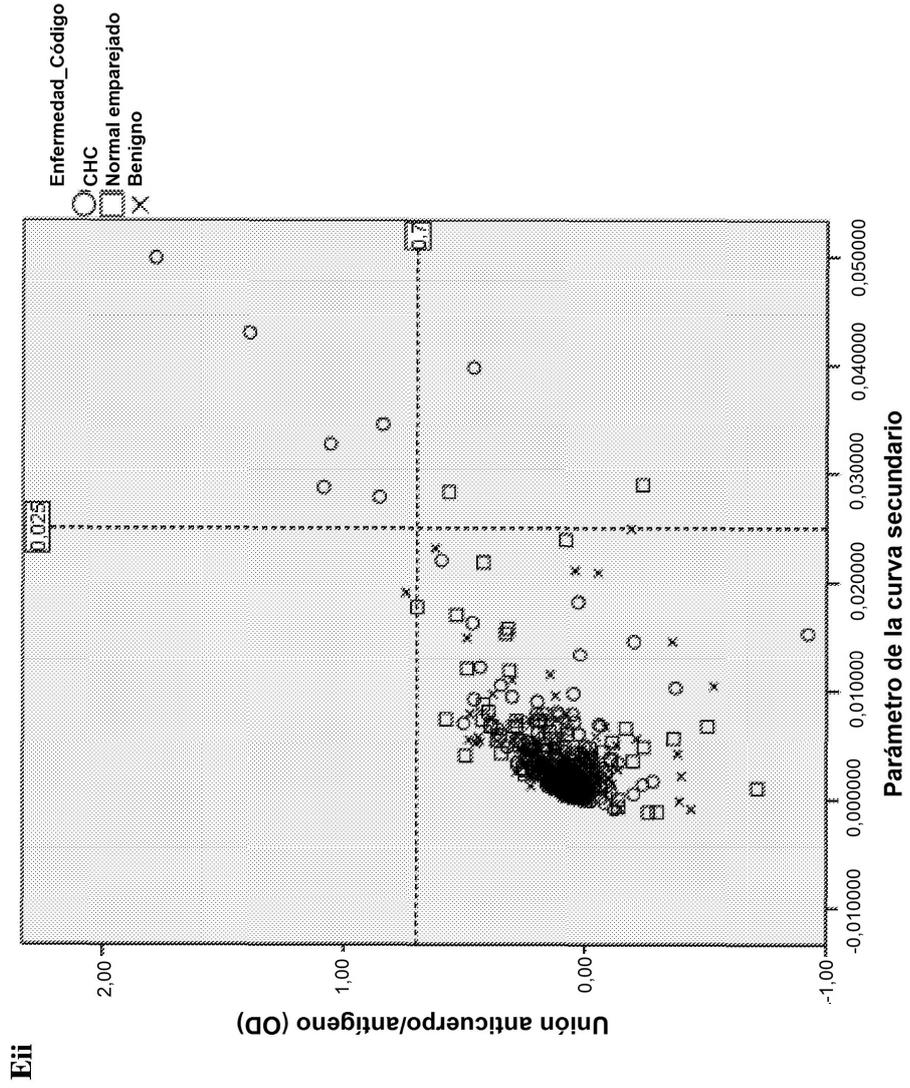


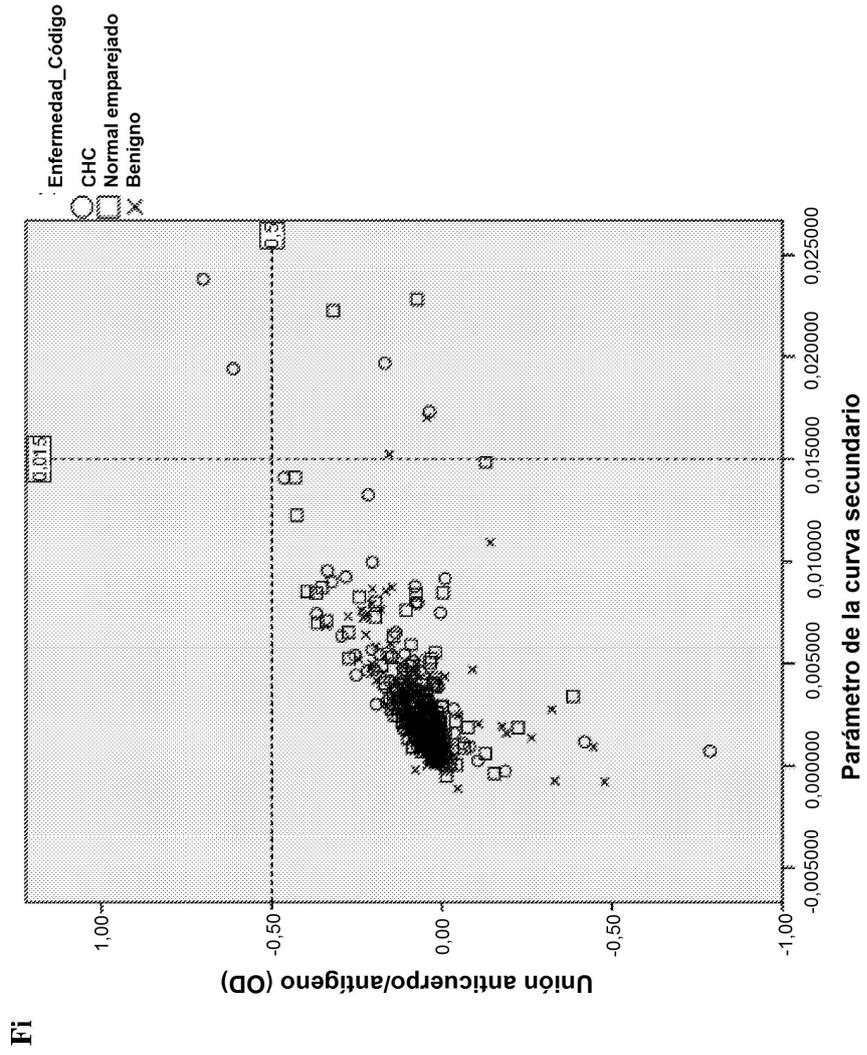












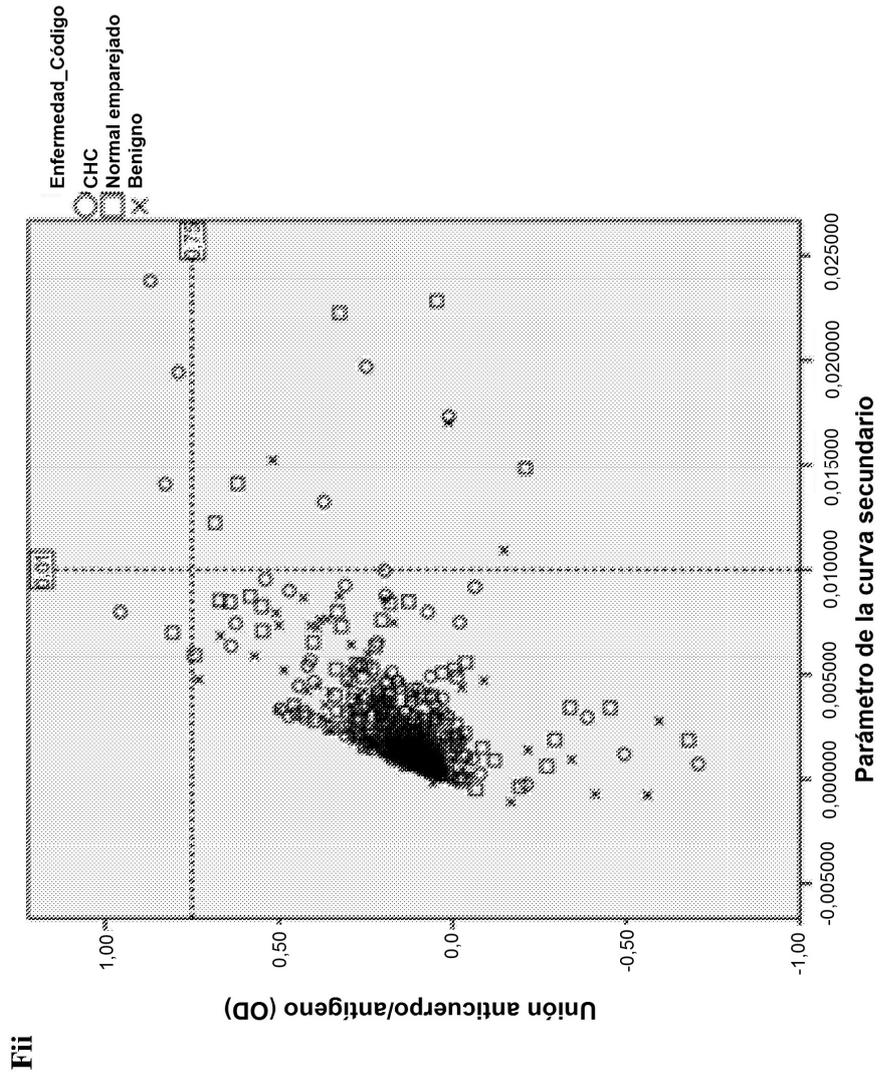
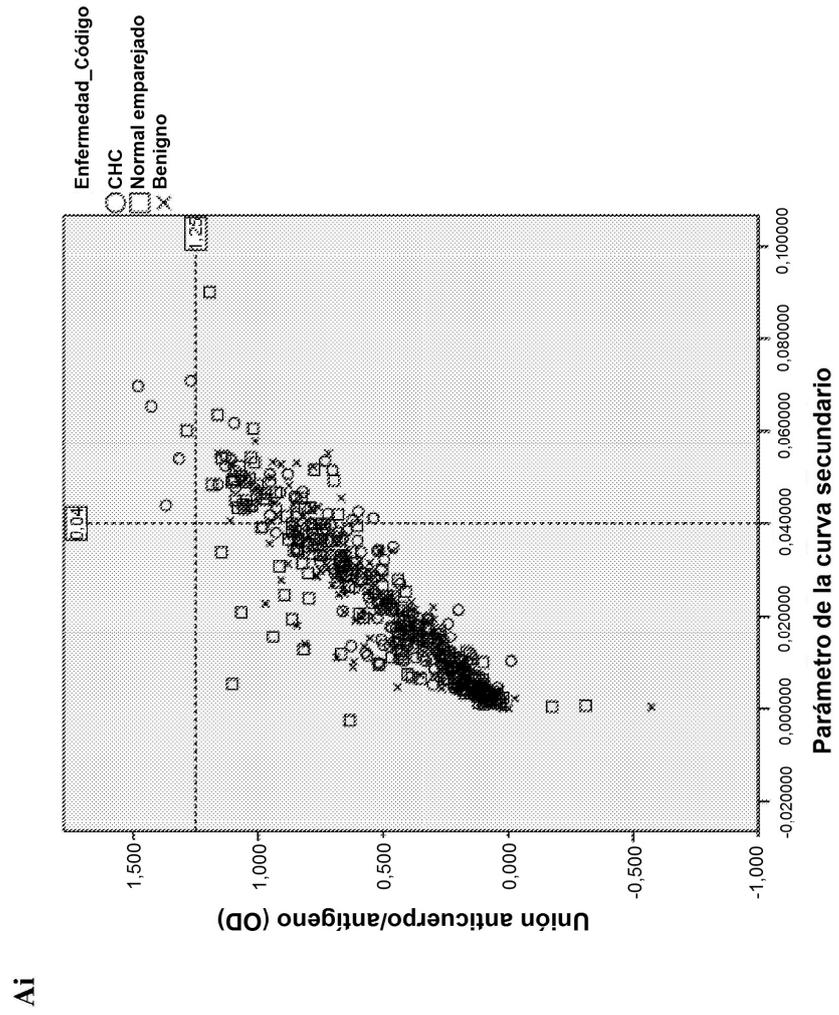


Figura 9



Ai

