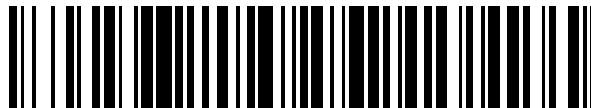


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 213**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2016** **E 16179607 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018** **EP 3270163**

54 Título: **Método para detectar proteínas en muestras humanas y usos de dichos métodos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2018

73 Titular/es:
PROTEOMEDIX AG (100.0%)
Wagistrasse 23
8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:
SCHIESS, RALPH;
ENDT, KATHRIN;
ATHANASIOU, ALCIBIADE;
MACAGNO, ANNALISA y
STEUBER, THOMAS

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 688 213 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

Método para detectar proteínas en muestras humanas y usos de dichos métodos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de los métodos para medir proteínas en muestras humanas, en particular, en suero humano, plasma o sangre, y también se refiere a los ensayos y los usos de dichos ensayos, en particular para la evaluación de riesgos.

10

Técnica anterior

La medición de proteínas en muestras humanas de una persona es una potente herramienta para la supervisión y la evaluación de riesgos del estado general de la persona, en particular, en lo que respecta a los riesgos del estado de nutrición y de la salud de la persona.

15

El cáncer de próstata (PCa) es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en hombres y la segunda causa principal de muerte relacionada con cáncer en varones estadounidenses.

20

El diagnóstico y el tratamiento del cáncer de próstata, a pesar de décadas de esfuerzos de investigación, sigue siendo un reto importante en el escenario clínico. Desafortunadamente, la evolución del PCa es silenciosa, y una detección temprana de las lesiones de evolución rápida y potencialmente peligrosas es fundamental para la salud del paciente, ya que la remisión completa y la cura de la enfermedad solamente es posible en etapas tempranas de la enfermedad.

25

El mejor ensayo diagnóstico no invasivo disponible para el PCa es la detección del antígeno específico de la próstata (PSA) en la sangre, junto con la exploración digital del recto (DRE). El PSA es una proteína producida por las células epiteliales de la glándula prostática. El PSA también se conoce como kaliceína III, seminina, semenogelasa, γ -seminoproteína y antígeno P-30, y se trata de una glicoproteína de 34 kD presente en pequeñas cantidades en el suero de los hombres sanos, y frecuentemente se encuentra elevada en presencia de PCa y de otros trastornos prostáticos. Un análisis de sangre para medir el PSA junto con la DRE es la prueba más eficaz actualmente disponible para la detección temprana del PCa. Niveles del PSA superiores a los normales están asociados con un PCa tanto localizado como metastásico.

30

35

La precisión diagnóstica del PSA en solitario solo es de aproximadamente un 60% y la metodología tiene inconvenientes principales en su especificidad (demasiados casos positivos falsos que se someten a una biopsia o cirugía de próstata innecesaria). Claramente, los niveles del PSA también tienden a estar aumentados en caso de infección de la próstata, irritación, hiperplasia prostática benigna (alargamiento) o hiperplasia (BPH), y eyaculación reciente, produciendo un resultado positivo falso.

40

De este modo, el diagnóstico del PCa está actualmente impedido por la elevada tasa de falsos positivos de las evaluaciones del PSA, que en consecuencia pueden producir un elevado número de biopsias de próstata que hallazgos diagnósticos negativos. Además, estas biopsias innecesarias pueden tener potenciales efectos secundarios. Las recomendaciones recientes contra un estudio generalizado de la población masculina del PCa mediante el PSA han dado como resultado que menos varones se han seleccionado para el PCa, detectándose menos casos en la etapa inicial.

45

Por tanto, se sigue careciendo de un procedimiento diagnóstico/pronóstico no invasivo que evite los resultados falsos positivos y negativos, incluso teniendo en cuenta las novedosas metodologías basadas en la medición simultánea de varios parámetros (por ejemplo, PSA libre y total) que han surgido como herramientas para aumentar la precisión global del diagnóstico. La mayoría del PSA de la sangre está unido a proteínas séricas. Una pequeña cantidad es proteína no unida y se denomina PSA libre. En varones con cáncer de próstata, la proporción entre PSA libre (no unido) y PSA total está disminuida. El riesgo de cáncer aumenta si la proporción entre PSA libre y total (%PSA_l) es menor del 25%. Cuanto menor sea la proporción, mayor es la probabilidad de PCa. Sin embargo, el PSA tanto total como libre aumentan inmediatamente después de la eyaculación, volviendo lentamente a los valores iniciales en un plazo de 24 horas, y también otros mecanismos no relacionados con el PCa pueden alterar la proporción entre PSA libre y total.

50

55

Se necesitan urgentemente nuevas herramientas diagnósticas, idealmente no invasivas para mejorar el diagnóstico del PCa y reducir las biopsias innecesarias y el sobretratamiento. Un diagnóstico más preciso a partir de muestras fácilmente accesibles tales como la sangre permitirá a los médicos y a los pacientes tomar decisiones más informadas acerca de los casos potenciales de PCa y de si se necesita una biopsia de próstata.

60

Análogamente al diagnóstico, el tratamiento y/o el pronóstico del PCa sigue siendo un reto importante debido a la heterogeneidad de la enfermedad. Aunque se han sugerido múltiples mecanismos para el PCa, la falta de firmas adecuadas capaz de clasificar a los pacientes y las proteínas diana clave para la intervención terapéutica con el fin

65

de curar siguen fuera de alcance.

Un enfoque para encontrar un sistema de diagnóstico adecuado para el cáncer de próstata se propuso en el documento WO 2009/138392, donde se propone medir al menos dos de una lista de 24 proteínas conocidas por estar presentes en la sangre humana, y que se espera que estén reguladas en exceso o en defecto dependiendo del estado de salud del paciente correspondiente.

El problema de los enfoques conocidos es que siguen careciendo de una falta de sensibilidad y, en particular, de especificidad en lo que respecta a qué cáncer está realmente presente, y una falta de fiabilidad diagnóstica en lo que respecta a evitar resultados falsos positivos y negativos. Un problema adicional es la actual disponibilidad de las correspondientes sondas de detección, tanto basadas en anticuerpos como otros tipos de detección, lo que convierte las correspondientes herramientas en adecuadas no solo con fines académicos, sino también para muchas aplicaciones. Un problema adicional es que los correspondientes sistemas de detección deben ser simples y no conllevar una gran cantidad de mediciones individuales.

El documento WO-A-9626441 se refiere a métodos para diagnosticar enfermedades prostáticas benignas (BPD), tales como la hiperplasia prostática benigna, prostatitis, o atrofia glandular, en un paciente humano varón sin necesidad de una biopsia. Se mide el nivel total de antígeno específico de la próstata (PSA) en la sangre o suero de los pacientes. Si el paciente tiene un nivel total de PSA entre aproximadamente 2,5 ng/ml y 10,0 ng/ml, entonces se mide el nivel de PSA libre en la sangre o suero del paciente. Se calcula la proporción entre el PSA libre y el PSA total. Si esta proporción es igual o superior a aproximadamente un 25 %, entonces se diagnóstica que el paciente tiene una BPD. Opcionalmente, si el paciente tiene un nivel total de PSA entre 10,1 ng/ml y 20,0 ng/ml, entonces se puede medir también el nivel de PSA libre en la sangre o suero del paciente. Se calcula la proporción entre el PSA libre y el PSA total. Si esta proporción es igual o superior a aproximadamente un 25 %, entonces se diagnóstica que el paciente tiene una BPD.

Schafer et al (The Prostate 67:255-267 (2007)) se refiere al descubrimiento de varias alteraciones de proteínas asociadas con la enfermedad y, entre otras, notifica que la trombospondina 1 se encuentra muy elevada en pacientes con enfermedad prostática benigna y reprimida en pacientes con cáncer de próstata, sin embargo, se informó expresamente que no se correlacionaban con los niveles de antígeno específico de la próstata (PSA).

Sumario de la invención

es por tanto un objeto de la presente invención proponer un nuevo método para recopilar información acerca del estado de salud de un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en particular para la detección de proteínas en muestras humanas, en particular, en suero humano, plasma o sangre, y también se refiere a los ensayos y los usos de dichos ensayos, en particular para la evaluación de riesgos, con respecto al PCa.

Se han desarrollado y validado técnicamente cuatro inmunoensayos individuales para la catepsina D humana (CTSD) humana, molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM1) humana, olfactomedina 4 (OLFM4) humana, y trombospondina 1 (THBS1) humana. Los homólogos de ratón de estas glicoproteínas fueron identificados previamente por espectrometría de masas usando un modelo de ratón inactivado génicamente condicional para Pten. Los homólogos humanos se midieron en muestras de suero clínicas para analizar la capacidad de discriminar las dolencias prostáticas benignas del PCa, tanto por sí mismos, como junto con otros valores del PSA, en particular los valores del %PSAI. Como resultado, se ha identificado que la combinación reivindicada es la óptima para superar los defectos anteriormente mencionados de los enfoques que la técnica anterior.

Más concretamente, la presente invención se refiere a un método in vitro para recopilar información acerca del estado de salud indicativo del cáncer de próstata en un sujeto. El método implica la detección cuantitativa de proteínas específicas en el suero, sangre, o plasma del sujeto. El suero, sangre, o plasma del sujeto también pueden estar almacenados y/o pretratados, por ejemplo, diluidos, después de haberse extraído del sujeto y antes de llevar a cabo el método.

Específicamente, el método implica la medición de la concentración de THBS1, así como la medición/determinación de la proporción del PSA libre (%PSAI, dado como $[PSA \text{ libre}] / [PSA \text{ total}]$ y por tanto comprendido en el intervalo numérico 0 - 1). Preferentemente, implica además la medición de la concentración de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en CTSD, OLFM4, ICAM1. EN otras palabras, se mide/determina el contenido de al menos 2 o preferentemente al menos 3 proteínas de la muestra para recopilar información. Para el THBS1, CTSD, OLFM4 y/o ICAM1, la concentración se determina directa o indirectamente, expresada normalmente en ng/ml, mientras que para el PSA, la proporción del PSA libre se determina cuantificando la concentración de PSA total y libre (o, de forma alternativa, cuantificando la concentración de PSA total y complejo y calculando la proporción de PSA libre a partir del anterior), y se usó para el análisis. Para el análisis, preferentemente se utilizan los valores de concentración en la muestra original, tal como en el suero, sangre o plasma original, y si hay una etapa de dilución o modificación del suero, sangre o plasma original antes de la medición, se retrocalcula la concentración en la muestra original.

Inesperadamente, se ha descubierto que la concentración de THBS1, junto con la proporción de PSA libre (%PSAI) es muy indicativa de un resultado positivo en la biopsia de próstata y, por tanto, del PCa. Inesperadamente, se ha descubierto que THBS1 no en combinación con el PSA total sino específicamente en combinación con el valor de %PSAI permite la determinación de una información positiva acerca del estado de salud del sujeto correspondiente.

5 El análisis realizado con una amplia cohorte muestra que, con un modelo de regresión logística optimizado, se puede encontrar una parametrización con un área bajo la curva (ABC) muy grande en la representación de las características operativas del receptor (COR) y con una especificidad particularmente elevada para una sensibilidad del 90%. Además de esto, se ha descubierto que cualquiera de los sistemas adicionales CTSD, OLFM4, ICAM1, si se evalúa y se optimiza en solitario y de nuevo conjuntamente con la proporción de %PSAI de esta cohorte, ya no se obtiene una ABC grande. Sin embargo, en particular, si uno más del grupo CTSD, OLFM4, ICAM1 se mide, en particular si CTSD se mide junto con THBS1 y junto con el %PSAI, se puede obtener una especificidad significativa adicional para el 90% de sensibilidad.

15 Es también posible incluir además información acerca de la edad del paciente correspondiente en el análisis, dicha información adicional como la edad también se puede usar como parámetro adicional de la fórmula (1) dada a continuación.

De forma típica, el método se lleva a cabo en sujetos que tienen valores elevados de PSA (2,0 y 10 ng/ml), preferentemente que tienen además DRE negativa y/o próstatas alargadas (≥ 35 ml).

20 De acuerdo con una primera realización preferida de la presente invención, el método incluye:

25 una primera etapa que se realiza en poniendo en contacto el suero, plasma o sangre del sujeto, preferentemente el suero, preferentemente tras dilución del mismo, con al menos, preferentemente dos (usando preferentemente un abordaje de tipo sándwich) reactivo(s) de afinidad para cada una de las proteínas y detectar si se produce la unión entre la correspondiente proteína y al menos uno (o dos) reactivo(s) de afinidad y usar la lectura cuantitativa de la correspondiente concentración de la proteína o, en el caso del PSA libre, su proporción como valor %PSAI, permitiendo el cálculo de la correspondiente concentración en el suero, plasma o sangre original; una segunda etapa de cálculo, basada en todas las concentraciones de proteínas así como en la proporción de PSA libre determinada en la primera etapa, un valor de puntuación combinada.

35 Tanto las concentraciones de proteína como la proporción del PSA libre se miden individualmente de forma típica, por ejemplo, cada uno en un inmunoensayo, pero a continuación, las concentraciones/proporciones determinadas se utilizan de forma combinada para el cálculo del valor de puntuación combinada. Así, la información medida no se utiliza individualmente, sino que se utiliza de forma combinada para determinar el valor de puntuación combinada y para análisis adicional de la información.

40 Más preferentemente, después de la segunda etapa, en una tercera etapa, el riesgo de tener un resultado positivo en la biopsia de próstata y, por tanto, el PCa del sujeto, se puede determinar basándose en el valor de puntuación combinada que se determina en la segunda etapa, donde sobrepasar el correspondiente valor umbral del valor de puntuación combinada se toma como predicción de una biopsia positiva (lo que significa la extracción de un muestra de tejido para su examen y para determinar la presencia o la extensión de la enfermedad, donde el tejido se examina al microscopio, por ejemplo, por un patólogo, y positivo significa que la persona que realiza el examen extrae la conclusión de que hay un cáncer) y por tanto como información de un PCa positivo que necesita biopsia de confirmación.

El valor de puntuación combinada se calcula preferentemente usando la siguiente fórmula:

$$\frac{1}{1+e^{-(\beta_0+\beta_1 \cdot x_1+\dots+\beta_k \cdot x_k)}} \quad (1)$$

50 donde β_i son los coeficientes de regresión que se determinan de antemano con una optimización, de forma típica, una maximización de la ABC en un enfoque COR, usando datos experimentales, siendo β_0 la ordenada en el origen, y donde x_i es la concentración medida (ng/ml) de la correspondiente proteína en el suero, plasma o sangre original y, en el caso del %PSAI, es la proporción entre el PSA libre y el PSA total (expresado en el intervalo de 0-1) en el suero, plasma o sangre original. Por tanto, el índice i en la presente situación está comprendido de 0 hasta al menos 2, para la situación donde solamente se utilizan los valores de THBS1 y %PSAI, y hasta al menos 3, cuando se miden otros valores de concentración de proteínas del grupo anteriormente mencionado.

60 Si, por ejemplo, THBS1, CTSD y %PSAI se miden para realizar el cálculo del valor de puntuación combinada, i está comprendido hasta 3 y β_1 es β_{CTSD} , x_1 es la concentración de CTSD en el suero, sangre o plasma original, β_2 es β_{THBS1} , x_2 es la concentración de THBS1 en el suero, sangre o plasma original, y β_3 es $\beta_{\%PSAI}$, x_3 es la proporción de PSA libre en el suero, sangre o plasma original.

La correspondiente optimización de la regresión logística se lleva a cabo usando mediciones en suero, plasma o sangre de sujetos de los que se tiene información más detallada acerca de su estado de salud, y donde se sabe si hay un resultado positivo o negativo en la biopsia de la próstata y, por tanto, PCa. Esta cohorte se usa, por tanto, para encontrar un modelo óptimo de la representación COR y para obtener una ABC máxima, para obtener la mayor especificidad posible a una alta sensibilidad. Los correspondientes parámetros β_i , que son los coeficientes de regresión, se pueden utilizar posteriormente en cualquier individuo del que no se conozca su estado de salud, para realizar una declaración de probabilidad sobre el estado de salud del sujeto y predecir, de esta forma, un resultado de biopsia de la próstata.

Las concentraciones/proporciones de las proteínas se miden y se introducen en la fórmula anteriormente mencionada para determinar el valor de la puntuación combinada. El valor de la puntuación combinada correspondiente obtenido se compara a continuación con un valor de umbral. El valor umbral se puede seleccionar de acuerdo con la sensibilidad/especificidad deseada. Si se supera este valor umbral, un valor de biopsia de la próstata y por tanto un diagnóstico de PCa se proporcionan junto con la propuesta de someterse a una biopsia. Los correspondientes valores umbrales para una sensibilidad deseada se determina en que de forma que, en la representación COR, se selecciona el punto correspondiente de la curva donde hay la sensibilidad deseada, y se toma el valor de la puntuación combinada para dicho punto. Los valores umbral proporcionados a continuación para las parametrizaciones específicas siempre se proporcionan para el 90% de sensibilidad. Si los valores umbral dados se superan, esto es una indicación de una alta probabilidad de una biopsia de próstata y, por tanto, de PCa, que sugiere una biopsia para descubrir los detalles.

Con el uso de una cohorte grande de 474 muestras de suero de pacientes sometidos a biopsia de próstata, se determinaron las siguientes parametrizaciones preferidas para una sensibilidad y especificidad óptimas, donde la concentración de las proteínas, es decir, THBS1, CTSD, ICAM1 y OLFM4, respectivamente, se introduce en cada caso en la fórmula como ng/ml y como se determina/recalcula respecto a la sangre, suero, o plasma original, y donde la proporción entre PSA libre (%PSAI) se va a usar como un número comprendido en el intervalo de 0-1:

Para el caso, donde la concentración de THBS1, así como la proporción de PSA libre (%PSAI) se mide en la primera etapa, preferentemente para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

β_0 en el intervalo de 4,0-5,0, preferentemente en el intervalo de 4,5-4,8;
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,00009)-(-0,00003), preferentemente en el intervalo de (-0,00004)-(-0,00006);
 $\beta_{\% \text{PSAI}}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,5)-(-5,0).

Para un 90% de sensibilidad, en este caso, un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,28-0,35, preferentemente 0,30-0,33, es lo que se selecciona.

Para el caso, donde la concentración de THBS1, la proporción de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de CTSD se mide en la primera etapa, preferentemente para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

β_0 en el intervalo de 3-3,4, preferentemente en el intervalo de 3,1-3,3;
 β_{CTSD} en el intervalo de 0,005-0,05, preferentemente en el intervalo de 0,008-0,012;
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,00009)-(-0,00003), preferentemente en el intervalo de (-0,00007)-(-0,00006);
 $\beta_{\% \text{PSAI}}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,2)-(-4,5).

Para un 90% de sensibilidad, en este caso, un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,28-0,35, preferentemente 0,33-0,34, es lo que se selecciona.

Para el caso, donde la concentración de THBS1, la proporción de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de OLFM4 se mide en la primera etapa, preferentemente para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

β_0 en el intervalo de 4,0-5,2, preferentemente en el intervalo de 4,4-4,8;
 β_{OLFM4} en el intervalo de 0,001-0,01, preferentemente en el intervalo de 0,002-0,004;
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,00009)-(-0,00002), preferentemente en el intervalo de (-0,00006)-(-0,00004);
 $\beta_{\% \text{PSAI}}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,9)-(-4,8).

Para un 90% de sensibilidad, en este caso, un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,27-0,35, preferentemente 0,3-0,34 es lo que se selecciona,

Para el caso, donde la concentración de THBS1, la proporción de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de ICAM1 se mide en la primera etapa, preferentemente para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

ES 2 688 213 T3

β_0 en el intervalo de 4,0-5,2, preferentemente en el intervalo de 4,6- 4,9;
 β_{ICAM1} en el intervalo de (-0,002)-(-0,0001), preferentemente en el intervalo de (-0,0010)-(-0,0005);
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,0001)-(-0,00001), preferentemente en el intervalo de (-0,00008)-(-0,00004);
 $\beta_{\%PSAI}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,8)-(-4,9).

5 Para un 90% de sensibilidad, en este caso, un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,25-0,35, preferentemente 0,3-0,33, es lo que se selecciona.

10 Para el caso, la concentración de THBS1, la proporción de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de OLFM4, ICAM1 así como CTSD se miden en la primera etapa, para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

β_0 en el intervalo de 3-3,8, preferentemente en el intervalo de 3,5-3,6;
 β_{OLFM4} en el intervalo de 0,001-0,003, preferentemente en el intervalo de 0,0015-0,0025;
 β_{ICAM1} en el intervalo de (-0,004)-(-0,002), preferentemente en el intervalo de (-0,0035)-(-0,00025);
 β_{CTSD} en el intervalo de 0,005-0,05, preferentemente en el intervalo de 0,008-0,012;
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,00009)-(-0,00003), preferentemente en el intervalo de (-0,00007)-(-0,00006);
 $\beta_{\%PSAI}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,2)-(-4,8).

20 Para un 90% de sensibilidad, en este caso, un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,3-0,35, preferentemente 0,32-0,335, es lo que se selecciona.

25 El THBS1 y/o al menos una de CTSD, OLFM4, ICAM1 tal como se miden pueden comprender modificaciones posteriores a la traducción, incluidas glicosilación, fosforilación, lipidación, etc.

Para la medición de la concentración de al menos una de THBS1, CTSD, OLFM4, ICAM1 el suero, plasma o sangre del sujeto se puede diluir, y preferentemente se diluye, usando un tampón.

30 Este tampón tiene preferentemente un valor del pH en el intervalo de 7-7,4 y preferentemente además comprende un agente que controla el valor de pH. Este agente que controla el valor de pH se puede seleccionar entre al menos uno de los siguientes sistemas: Tris (tris(hidroximetil)aminometano), Pipes (Ácido piperazina-1,4-bis-2-etanosulfónico), Mes (Ácido 4-morfolinoetanosulfónico), Hepes (Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etanosulfónico), en suero salino tamponado con fosfato (PBS).

35 Además, el tampón puede comprender componentes adicionales. Por ejemplo, el tampón puede comprender al menos un detergente no iónico, preferentemente en una concentración del 0,01 al 0,1 % (v/v), preferentemente 0,025-0,05% (v/v). Este detergente no iónico se puede seleccionar de al menos uno del grupo que consiste en: Dodecilpoli(etilenglicoléter)m, donde m es un número entero de 5 a 40; 1-O-n-Octil- β -D-glucopiranosido (n-Octilglucósido); Alquifenolpili(etilenglicol-éter)m, donde m es un número entero de 5 a 40, preferentemente m= 11; 1-O-n-Dodecil- β -D-glucopiranosil (1-4)alfa-D-glucopiranosido; Dodecilpoli(etilenglicoléter)m, donde m es un número entero de 5 a 40, preferentemente m= 23; Monoéster de ácido graso de poli(oxietileno)(20)-sorbitán, preferentemente seleccionado entre monooleato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán, monolaurato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán, monopalmitato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán, monoestearato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán; Octilfenolpoli(etilenglicol-éter)m, donde m es un número entero de 5 a 40, preferentemente m= 10.

45 Además, el tampón puede comprender componentes tales como al menos uno de albúmina sérica bovina, trehalosa, sacarosa.

50 Preferentemente, el tampón está exento de ditiotreitól (DTT) o cualquier otro agente reductor, para el caso de algunas proteínas, sin embargo DTT también se puede añadir específicamente (véanse las observaciones, más adelante).

Preferentemente, el tampón tiene una fuerza iónica en el intervalo de 50-850 mM, preferentemente en el intervalo de 200-400 o en el intervalo de 250 - 370 mM.

55 Para la dilución para medir THBS1, se puede seleccionar un factor de dilución en el intervalo de 1:1.000-1:20.000, preferentemente en el intervalo de 1:2.000-1:3.000 para un ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA), y en el intervalo de 1:5.000-1:15.000 para un ensayo basado en perlas.

60 Para la dilución para medir la proteína CTSD, se puede seleccionar un factor de dilución en el intervalo de 1:5-1:30, preferentemente en el intervalo de 1:10-1:30 para un ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA), y en el intervalo de 1:10-1:20 para un ensayo basado en perlas. Preferentemente, el tampón utilizado y que se ha descrito anteriormente se suplementa además y adicionalmente y específicamente con un detergente no iónico, preferentemente seleccionado como monolaurato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán para producir una concentración adicional del mismo del 0,05% (v/v).

65

Para la dilución para medir ICAM1, se puede seleccionar un factor de dilución en el intervalo de 1:50 -1:200, preferentemente en el intervalo de 1:80-1:150. Preferentemente, el tampón usado se suplementa adicionalmente con cloruro de sodio para tener un contenido adicional en cloruro de sodio de 250 mM para aumentar la fuerza iónica.

5 Para la dilución para medir OLFM4, se puede seleccionar un factor de dilución en el intervalo de 1 5-1:30, preferentemente en el intervalo de 1:5-1:20. Preferentemente, el tampón usado se suplementa adicionalmente con cloruro de sodio hasta un contenido en cloruro de sodio adicional de 250 mM así como un agente de reducción, preferentemente seleccionado como ditioneitol (DTT) para producir una concentración de 5 mM del mismo.

10 De acuerdo con otra realización preferida, el método incluye una primera etapa que se realiza en poniendo en contacto el suero, plasma o sangre del sujeto, preferentemente tras dilución del mismo, con al menos, preferentemente dos reactivo(s) de afinidad en un sándwich para cada una de las proteínas y detectar si se produce la unión entre la correspondiente proteína y al menos uno (o dos) reactivo(s) de afinidad y usar la lectura cuantitativa de la correspondiente concentración de la proteína o, en el caso del PSA libre, su proporción, permitiendo el cálculo de la correspondiente concentración/proporción en el suero, plasma o sangre original, y en donde se usa en esta etapa bien un sándwich ELISA específico de la correspondiente proteína, preferentemente con lectura visible, y/o un ensayos de anticuerpos en sándwich basado en perlas para la correspondiente proteína, preferentemente con lectura fluorescente.

20 El ELISA en sándwich específico de la correspondiente proteína preferentemente con lectura visible y/o el ensayo de anticuerpos en sándwich basado en perlas para la correspondiente proteína, preferentemente con lectura fluorescente se puede obtener usando proteínas recombinantes de la THBS1, CTSD, ICAM1 y OLFM4 humana, respectivamente, y anticuerpos monoclonales de ratón generados mediante la inmunización de ratones con los mismos.

25 De acuerdo con otra realización preferida, la detección cuantitativa de la correspondiente concentración implica la determinación de la concentración de dichos biomarcadores con respecto a un patrón de proteínas externo, que implica la preparación de una curva patrón de referencia midiendo concentraciones definidas de varios, preferentemente 5-7, patrones de proteínas con concentraciones conocidas diluidos en el mismo patrón que el usado para diluir la proteína que se va a medir en el mismo conjunto de valoraciones de las muestras.

30 El método puede implicar además una etapa de o a utilizar con respecto a al menos uno de seguimiento, diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgos, selección de terapia, vigilancia de la terapia del cáncer, en particular del cáncer de próstata, incluido el cáncer de próstata localizado.

35 Otras realizaciones de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de los dibujos

40 Las realizaciones preferidas de la invención se describen a continuación con referencia a los dibujos, que tienen el objetivo de ilustrar las realizaciones presentes preferidas de la invención y no tienen el fin de limitar la misma. En los dibujos,

45 Fig. 1 muestra una presentación esquemática de un inmunoensayos de tipo "sándwich" en dos etapas, donde, para el sistema Luminex, la detección se realiza usando fluorescencia con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (Strep-PE) que une la Biotina (B) al anticuerpo de detección, mientras que para ELISA, esto se lleva a cabo usando un cambio de color en el intervalo visible obtenido mediante conjugación Estreptavidina-enzima y un sustrato cromogénico para dicha enzima, preferentemente el conjugado Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) en lugar de Strep-PE y el sustrato cromogénico HRP TMB;

50 Fig. 2 muestra las curvas de prueba de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa, para el caso en que THBS1 se mide solo, cuando el PSA total se mide solo, cuando PSA se mide solo, y cuando la concentración de THBS1 se usa junto con la proporción de %PSAI para la evaluación del valor de la puntuación combinada;

55 Fig. 3 muestra las curvas COR optimizadas cuando la CTSD se mide sola, cuando el %PSAI se mide solo, y cuando la concentración de CTSD se usa junto con la proporción de %PSAI para evaluación del valor de la puntuación combinada;

60 Fig. 4 muestra las curvas COR optimizadas cuando la ICAM1 se mide sola, cuando PSA se mide solo, y cuando la concentración de ICAM1 se usa junto con la proporción de %PSAI para la evaluación del valor de la puntuación combinada;

Fig. 5 muestra las curvas COR optimizadas cuando la OLFM4 se mide sola, cuando PSA se mide solo, y cuando la concentración de OLFM4 se usa junto con la proporción de %PSAI para la evaluación del valor de la puntuación combinada;

65 Fig. 6 muestra las curvas de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por

- tanto, del PCa; %PSAI en solitario, CTSD y THBS1, y la combinación de %PSAI, CTSD y THBS1; se muestran las curvas COR de los modelos optimizados;
- Fig. 7 muestra las curvas de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa; %PSAI en solitario, ICAM1 y THBS1, y la combinación de %PSAI, ICAM1 y THBS1; se muestran las curvas COR de los modelos optimizados;
- Fig. 8 muestra las curvas de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa; %PSAI en solitario, OLFM4 y THBS1, y la combinación de %PSAI, OLFM4 y THBS1; se muestran las curvas COR de los modelos optimizados;
- Fig. 9 muestra las curvas de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa; %PSAI en solitario, ICAM1 y CTSD, y la combinación de %PSAI, ICAM1 y CTSD; se muestran las curvas COR de los modelos optimizados;
- Fig. 10 muestra las curvas de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa; %PSAI en solitario, OLFM4 y CTSD, y la combinación de %PSAI, OLFM4 y CTSD; se muestran las curvas COR de los modelos optimizados;
- Fig. 11 muestra las curvas de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa; %PSAI en solitario, ICAM1 y OLFM4, y la combinación de %PSAI, ICAM1 y OLFM4; se muestran las curvas COR de los modelos optimizados;
- Fig. 12 muestra la reducción de biopsias negativas para un 90% de sensibilidad; porcentajes dados para %PSAI en solitario, CTSD y THBS1, y la combinación de %PSAI, CTSD y THBS1;
- Fig. 13 muestra las curvas de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa; %PSAI en solitario, CTSD, THBS1, OLFM4, ICAM1, y la combinación de %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1, se muestran las curvas COR de los modelos optimizados; y la Fig. 14 muestra la reducción de biopsias negativas para un 90% de sensibilidad; porcentajes dados para %PSAI en solitario, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1, y la combinación de %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1.

Descripción de las realizaciones preferidas

Los inventores habían identificado anteriormente numerosos biomarcadores par el diagnóstico del PCa utilizando un enfoque de investigación en dos etapas guiado por genética sobre la ruta del cáncer PI3K/PTEN. En la primera etapa, se identificaron glicoproteínas del suero y tejido de la próstata en modelos del cáncer Pten-null en ratón. Después de la clasificación de las proteínas por orden de importancia, se identificaron los perfiles proteómicos en el suero de paciente de PCa e individuos de control en una segunda etapa de validación. El objetivo era identificar y desarrollar y validar inmunoensayos muy sensibles y muy específicos para los biomarcadores individuales de las proteínas. La transición desde la espectrometría de masas a la tecnología de inmunoensayo representa un paso importante para permitir la validación clínica de alto rendimiento en grandes cohortes de muestras. Además, esto facilita la aplicación clínica del ensayo en la rutina de los laboratorios de diagnóstico. La plataforma Luminex basada en micropartículas se seleccionó inicialmente por su cinética mejorada resultado de una superficie específica más grande de las micropartículas, en comparación con las placas de microtitulación o los tubos. Asimismo, las matrices me micropartículas magnéticas son más adecuadas para la automatización que los ensayos realizados en placa de microtitulación o en tubos y por tanto están mejor representadas en los sistemas de inmunoensayo de acceso aleatorio. Finalmente, las capacidades de multiplexado del sistema Luminex facilita el proceso de selección con anticuerpos para el desarrollo del inmunoensayo, específicamente para el posterior desarrollo de los ELISA más habituales y sencillos y más fáciles de usar.

En esta sección, la identificación, el desarrollo y la validación técnicas descrito las directrices del Center for Drug Evaluation and Research (CDER) se describe para cuatro inmunoensayos individuales para la catepsina D (CTSD) humana, molécula 1 de adhesión intercelular ("ICAM1") humana, olfactomedina-4 (OLFM4) humana, y trombospondina 1 (THBS1) humana. Los homólogos de ratón de estas glicoproteínas humanas fueron identificados previamente por espectrometría de masas usando un modelo de ratón inactivado génicamente condicional para Pten. Los homólogos humanos se midieron en muestras de suero clínicas para analizar la capacidad de discriminar las dolencias prostáticas benignas del PCa. Como resultado se ha identificado que la combinación reivindicada es la óptima para superar los defectos anteriormente mencionados de los enfoques que la técnica anterior y que muestra la mayor sensibilidad y la mayor especificidad.

El desarrollo produjo varios inmunoensayos individuales con inter e intravariabilidad (CV) <15% y linealidad tras dilución de los analitos. En suero, se consiguió la estabilidad de la proteína in vivo (<15% pérdida de analito) para una duración de al menos 24 horas a temperatura ambiente y de 2 días a 4°C.

65

Materiales y métodos

Los nombres de los genes, nombres de entrada, nombre de la proteína (abreviados) y Números de registro, tal como se utiliza de forma general en la presente memoria descriptiva, se definen según el UniProt Consortium (www.uniprot.org), que está compuesto por el European Bioinformatics Institute (EBI), el Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), y el Protein Information Resource (PIR). La localización celular anotada o prevista se realiza de acuerdo con Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat Protoc. 2, 953-71.

Nombre del gen	Nombre de entrada	Nombre de la proteína	Número de registro	Localización celular anotada o prevista
THBS1	TSP1_HUMAN	Trombospondina 1	P07996	secretada
OLFM4	OLFM4_HUMAN	Olfactomedina-4	Q6UX06	secretada
CTSD	CATD_HUMAN	Catepsina D	P07339	lisosómica
ICAM1	ICAM1_HUMAN	Molécula 1 de adhesión intercelular	P05362	membrana plasmática
KLK3	KLK3_HUMAN	Antígeno específico de la próstata (PSA)	P07288	secretada

PATRÓN/CALIBRADOR DE PROTEÍNA

Expresión

CTSD recombinante humana CTSD (restos 1-412, seguido por 6 etiquetas His), ICAM1 (restos 1-480, seguido por 8 etiquetas His) y OLFM4 (restos 1-510) se expresaron y se purificaron, cada uno de ellos, a partir de sobrenadante del cultivo celular de células HEK293 transfectadas. CTSD, ICAM1, THBS1 se purificó con una columna His Trap (GE Healthcare).

Purificación

Para ICAM1, se realizó en primer lugar la precipitación en sulfato amónico. Las proteínas que precipitaron al 35% se eliminaron mediante centrifugación. El sobrenadante se transfirió a tubos limpios, y se añadió gradualmente sulfato de amonio hasta conseguir una saturación del 75%. Tras la centrifugación, el sobrenadante se eliminó, y el aglomerado se disolvió en tampón para su purificación en la columna His Trap.

OLFM4 se purificó mediante precipitación en sulfato amónico al 30%.

El THBS1 natural purificado a partir de plaquetas se adquirió de Creative Biomart y se usó en la inmunización. La proteína THBS1 recombinante se adquirió inicialmente de R&D Systems y después se expresó y purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular de células HEK293 en las instalaciones de los inventores.

ANTICUERPOS

Los anticuerpos de captura y detección eran monoclonales de ratón generados mediante inmunización de ratones BALB/c con las proteínas recombinantes humanas CTSD, ICAM1, OLFM4 y la THBS1 natural, respectivamente. Se aisló un importante número de anticuerpos que reconocen diferentes epítomos de la correspondiente proteína, y se seleccionaron parejas de anticuerpos para el posterior desarrollo y optimización de los inmunoensayos de tipo sándwich basados en perlas y los inmunoensayos ELISA, respectivamente.

La tecnología Luminex basada en micropartículas utilizada proporcionó una plataforma versátil para seleccionar anticuerpos para los inmunoensayos de nuevo desarrollo. La tecnología de multiplexación facilitó la identificación de las parejas de anticuerpos en sándwich acoplando varios anticuerpos de captura candidatos con diferentes conjuntos de microesferas. Cuando se mezclaron entre sí, estos conjuntos permitieron el ensayo simultáneo de anticuerpos de detección independientes, ahorrando reactivos, muestra y tiempo (véase, por ejemplo, Baker HN, Murphy R, Lopez E, Garcia C. Conversion of a capture ELISA to a Luminex xMAP assay using a multiplex antibody screening method. J Vis Exp. 2012).

Una vez que se ha seleccionado una pareja de anticuerpo adecuada, se optimizaron las composiciones del tampón y las concentraciones de anticuerpo para proporcionar las condiciones más óptimas (relación señal a fondo, linealidad de la dilución, intervalo dinámico de la curva patrón, sensibilidad del ensayo) para los inmunoensayos individuales.

INMUNOENSAYOS BASADOS EN PERLAS

- Los inmunoensayos de tipo "sándwich" basados en perlas se establecieron en el sistema Luminex de la siguiente forma. Los anticuerpos de captura se conjugaron covalentemente con micropartículas de Luminex carboxiladas y los anticuerpos de detección se marcaron con biotina (B) de acuerdo con procedimientos convencionales. Placas de microtitulación de 96 pocillos de media área (Corning Inc.) se bloquearon durante un mínimo de 15 min con 1x Reactivo de bloqueo para ELISA (Roche Diagnostics). Se preparó una mezcla de la micropartícula revestida con el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección biotinilado en concentraciones adecuadas y se añadió a la proteína (muestra o patrón) diluida en tampón de ensayo dentro de la placa de 96 pocillos. Después de 60 o 120 min de incubación a 21°C o 37°C dependiendo del ensayo y agitación a 650 rpm en un Eppendorf ThermoMixer C, las placas se lavaron con PBS + 0,05% Tween20 usando un separador de placa magnética (Luminex Corporation). El conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (Strep-PE, Moss Inc.) diluido en tampón ensayo se añadió durante 30 min, se incubó con 650 rpm a 21°C en un Eppendorf ThermoMixer C. Tras el lavado, los conjugados de perlas se resuspendieron en Reactivo de bloqueo. La lectura se realizó con un instrumento Luminex FlexMap3D o Luminex MAGPIX que funcionaba con el programa informático xPONENT 4.1 o 4.2, que también se usó para calcular las concentraciones utilizando la curva de ajuste de 4 parámetros. Todas las muestras se midieron en duplicados independientes sobre la misma placa. Las muestras de control de calidad, que tenían concentraciones definidas de proteínas, se incluyeron en cada placa.
- Para los diferentes epítomos de los anticuerpos, se generaron y ensayaron las correspondientes perlas de captura y anticuerpos de detección biotinilados, y se determinó empíricamente el par de anticuerpos de captura y detección óptimos, según la intensidad de lectura óptima (véase también la Figura 1).

ENZIMOINMUNOANÁLISIS DE ADSORCIÓN

- Los ensayos ELISA de tipo "sándwich" se establecieron de la siguiente forma. Los anticuerpos de captura, tal como se determina y se selecciona usando los inmunoensayos basados en perlas descritos en el capítulo anterior se diluyeron en tampón fosfato de sodio 50, pH 8,0 y se revistieron en placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) durante la noche a 4°C. Tras eliminar la solución y lavar una vez con PBS/0,05% Tween20, las placas se bloquearon con BSA-block (Candor Bioscience) durante 1,5 horas. A continuación, las placas se lavaron 3 veces. El patrón o la muestra de suero se diluyó con tampón Low Cross (LCB; Candor Bioscience) y se mezcló en los pocillos con un volumen igual de anticuerpo de detección biotinilado tal como se determina y selecciona usando los inmunoensayos basados en perlas descritos en el capítulo anterior diluidos en tampón LCB. Después de 60 min de incubación a 37°C y agitación a 650 rpm en un Eppendorf ThermoMixer C, las placas se lavaron 3 veces con PBS/ 0,05% de Tween20. El conjugado de Estreptavidina-HRP (Jackson ImmuneResearch) se diluyó en LCB y se añadió durante 30 min, con incubación a 37°C y agitación a 650 rpm en un Eppendorf ThermoMixer C. Después de lavar tres veces con PBS/0.05% Tween20, una solución de sustrato TMB (Sigma) (diluida en ácido cítrico 30 mM, pH 4,1 con H₂O₂) se añadió durante 30 min, con incubación a 37°C y agitación a 650 rpm en un Eppendorf ThermoMixer C. La reacción se bloqueó por adición de un volumen igual de H₂SO₄ 0,25 M. La absorbancia se midió en un lector FLUOStart Optima ELISA (BMG LabTech) leyendo a 450 nm y restando la lectura a 620 nm. Las concentraciones se calcularon utilizando un ajuste de curva de 5 parámetros con el programa informático FLUOstar OPTIMA.

MEDICIONES DEL PSA

- El PSA total sérico (PSAt) y el PSA libre (PSAI) se analizaron usando el sistema de inmunoensayo ADVIA Centaur (Siemens Healthcare). El porcentaje de PSA libre (%PSAI) se calculó usando los valores medidos de PSAt y PSAI con la siguiente fórmula $\%PSAI = PSAI/PSAt$. De manera alternativa, el PSA total (PSAt) y PSA complejo (PSAc) se pueden medir, y la proporción de PSA libre se puede calcular de la siguiente forma: $\%PSAI = (PSAt - PSAc)/PSAt$. La proporción PSAI/PSAt se usó en las evaluaciones.

ENSAYOS ESPECÍFICOS BASADOS EN PERLAS

- Para el ensayo THBS1, la muestra de suero (a una dilución final de 1:10.000) o el patrón recombinante se incubaron con la micropartícula revestida con el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección biotinilado en tampón Low Cross (Candor Bioscience) (LCB, pH 7,2) durante 60 min a 37°C. Todas las muestras se cuantificaron en el intervalo de detección lineal del ensayo y se determinó la concentración (CV<20% para cada muestra, el CV promedio para las muestras de una placa del 5,1%) estaba comprendido entre 14,2 y 209 µg/ml.

Para la dilución del ensayo de THBS1, se usó el siguiente sistema: LCB, pH 7,2.

- Para el ensayo de CTSD, la muestra de suero (a una dilución final de 1:15) o patrón recombinante se incubó con la micropartícula revestida con el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección biotinilado en LCB (pH 7,2) + 0,05% Tween durante 120 min a 37°C. Todas las muestras se cuantificaron en el intervalo de detección lineal del ensayo y se determinó la concentración (CV<20% para cada muestra, el CV promedio para las muestras de una placa del 2,8%) estaba comprendido entre 40 y 453 ng/ml.

Para la dilución del ensayo de CTSD, se usó el siguiente sistema: LCB (pH 7,2) + 0,05% Tween.

Para el ensayo ICAM1, la muestra de suero (a una dilución final de 1:100) o patrón recombinante se incubó con la micropartícula revestida con el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección biotinilado en LCB (pH 7,2) + NaCl 250 mM durante 60 min a 37°C. Todas las muestras se cuantificaron en el intervalo de detección lineal del ensayo y se determinó la concentración (CV<15% para cada muestra, el CV promedio para las muestras de una placa del 2,2%) estaba comprendido entre 44 y 287 ng/ml.

Para la dilución del ensayo de ICAM1, se usó el siguiente sistema: LCB (pH 7,2) + NaCl 250 mM.

Para el ensayo OLFM4, la muestra de suero (a una dilución final de 1:10) o patrón recombinante se incubó con la micropartícula revestida con el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección biotinilado en LCB (pH 7,2) + NaCl 250 mM + DTT 5 mM durante 60 min a 37°C. Todas las muestras salvo tres se cuantificaron en el intervalo de detección lineal del ensayo y se determinó la concentración (CV<15% para cada muestra, el CV promedio para las muestras de una placa del 5,5%) estaba comprendido entre 1 y 291 ng/ml.

Para la dilución del ensayo de OLFM4, se usó el siguiente sistema: LCB (pH 7,2) + NaCl 250 mM + DTT 5 mM.

Para la calibración de las concentraciones para permitir la lectura cuantitativa, se usaron soluciones patrón de las respectivas proteínas según el siguiente procedimiento:

La medición de los biomarcadores de proteínas significa la cuantificación de la concentración de dichos biomarcadores con respecto a un patrón externo de proteína. Concretamente, se preparó una curva patrón de referencia midiendo concentraciones definidas de 5-7 patrones de proteínas en tampón de ensayo en el mismo conjunto de mediciones de las muestras.

Se usaron las siguientes concentraciones de los patrones individuales para los ensayos basados en perlas:

- THBS1 (ng/ml): 50,00, 20,00, 8,00, 3,20, 1,28, 0,51, 0,20
- CTSD (ng/ml): 75,0, 2,0, 8,33, 2,78, 0,93, 0,31, 0,10
- ICAM1 (ng/ml): 12,6, 5,04, 2,02, 0,81, 0,32, 0,13, 0,05
- OLFM4 (ng/ml): 120, 34,29, 9,79, 2,79, 0,80, 0,23, 0,07

Se usaron las siguientes concentraciones de los patrones individuales para los ensayos ELISA:

- THBS1 (ng/ml): 200, 100, 50, 25, 12,50, 6,25, 3,125
- CTSD (ng/ml): 10,00, 6,25, 3,91, 2,44, 1,53, 0,95

La curva patrón se calculó usando un programa informático que permite un ajuste de alto grado de una curva polinómica. Las muestras de suero se diluyeron en tampón de ensayo de forma que sus mediciones quedaron comprendidas en el intervalo cubierto por los patrones. Su concentración se calculó basándose en la curva de los patrones, multiplicando por el factor de dilución para determinar la concentración en las muestras de suero.

ENZIMOINMUNOANÁLISIS DE ADSORCIÓN ESPECÍFICOS

La muestra de suero se midió a una dilución final de 1:2.500 para el ensayo de THBS1 y de 1:20 para el ensayo de CTSD.

Resultados

El ensayo propuesto mide múltiples proteínas específicas de cáncer incluidas cathepsina D (CTSD), trombospondina 1 (THBS1) y olfactomedina 4 (OLFM4) y la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM1) individualmente y en combinaciones para determinar la estrategia de medición óptima que permita la mayor sensibilidad y especificidad con el menor coste de medición. Los resultados del ensayo incluyen adicionalmente la proporción de %PSAI (proporción entre PSAI y PSAt). Se calculó una puntuación combinada usando la fórmula (1) anteriormente mencionada resultado de una combinación matemática de %PSAI, con cada uno de los sistemas CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1, así como todas las combinaciones posibles de %PSAI, con una pareja de los sistemas CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1.

También, %PSAI se investigó con CTSD y THBS1 y opcionalmente con OLFM4 y ICAM1. Los ensayos se evaluaron en un estudio de validación para mostrar su valor añadido para establecer parámetros clínicos tales como %PSAI para mejorar el diagnóstico de PCa.

Objetivo: El objetivo de este estudio era analizar qué combinación de los biomarcadores de proteínas propuestos es capaz de reducir el número de biopsias negativas en varones con un valor elevado de PSAt (2-10 ng/ml) de la forma más eficaz y más fiable. Asimismo, los varones incluidos en el estudio tenían un resultado negativo (falta de sospecha de la presencia de cáncer) en una exploración rectal digital (DRE) y próstatas alargadas. Este subgrupo de

pacientes se considera como el más difícil de decidir si se debe realizar una biopsia de próstata, puesto que muchos hombres pueden tener dolencias benignas, dando como resultado valores de PSA aumentados en dicho intervalo, dando como resultado cantidades elevadas de casos positivos falsos. El objetivo del estudio era reducir el número de biopsias negativas en al menos un 50% manteniendo al menos un 90% de sensibilidad para el PCa y un elevado (90-95%) valor predictivo negativo (NPV) para el PCa de grado alto (puntuación Gleason ≥ 7). El NPV es una medida importante para los urólogos que indica la probabilidad de que un resultado negativo sea realmente negativo.

Diseño, configuración y participantes: Se llevó a cabo un estudio retrospectivo en varones con un valor de PSA de 2-10 ng/ml, DRE negativo para cáncer y próstata alargada (volumen ≥ 35 ml) que se sometieron a una biopsia de próstata. Se recogieron muestras de sangre completa de varones con valor positivo y negativo para el cáncer de próstata antes de someterse a la biopsia de próstata en un centro puntero para el tratamiento del cáncer del norte de Europa. Todas las muestras se tomaron entre 2011-2016 después del consentimiento del paciente por escrito.

Mediciones: PSA y PSAI séricos se analizaron para todas las muestras con el sistema de inmunoensayo ADVIA Centaur (Siemens Healthcare). Niveles de concentración de CTSD, THBS1, OLFM4 y ICAM1 se midieron usando el inmunoensayo basado en perlas como se ha detallado anteriormente.

Resultados: De los 474 varones incluidos en este estudio, 236 varones habían tenido un resultado negativo en la biopsia y 238 se diagnosticaron con PCA basado en la biopsia. De estos, 130 tenían PCA de bajo grado (puntuación Gleason ≤ 6) y 106 tuvieron PCA de alto grado (puntuación Gleason ≥ 7) de acuerdo con la biopsia de próstata. La correlación óptima de los valores medidos de concentración/proporción de las muestras con los resultados de las biopsias reales de los varones incluidos en este estudio usando la fórmula anteriormente mencionada para el valor de la puntuación combinada optimizando la fórmula de regresión logística para un área máxima bajo la curva se usó para determinar la sensibilidad y especificidad óptimas.

Las curvas COR ilustradas en la figura 2-11 son curvas de entrenamiento, es decir, las curvas obtenidas después de la optimización del modelo que correlaciona de una manera optimizada la proporción medida de %PSAI y las concentraciones respectivas de las proteínas con el diagnóstico verdadero basado en las biopsias de la próstata.

Modelos de CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1 individualmente

En una primera etapa, las cuatro proteínas a analizar se investigaron individualmente, y el valor de la puntuación combinada optimizado se determinó para la correspondiente proteína tanto en solitario como junto con %PSAI.

Las Figuras 2-5 muestran las curvas de prueba de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa, para el caso donde cada una de las proteínas del grupo THBS1, CTSD, ICAM1 y OLFM4 se midieron solas, cuando el %PSAI se mide solo, y cuando la concentración de las correspondientes proteínas se usa junto con la proporción de %PSAI para evaluación del valor de la puntuación combinada.

Como se puede observar de las curvas COR, de lejos, la mejor sensibilidad y especificidad se consigue con THBS1, de la que ya se sabía que tenía cierto valor indicativo, pero que hasta la fecha no se había identificado que era un correlato tan fuerte y fiable. Lo que también se reconoce es que CTSD, ICAM1 y OLFM4 investigados individualmente escasamente proporcionan algún beneficio en comparación con %PSAI en solitario. En particular, se observa que CTSD esencialmente no está correlacionada y parece no tener valor diagnóstico cuando se investiga individualmente o de forma combinada con %PSAI.

Los valores de concentración de PSA total se utilizan normalmente para la predicción negativa del PCa debido a la elevada sensibilidad del PSA total. Uno de estos se puede ver en la figura 2, los valores de concentración total de PSA no ayudan en absoluto a una predicción positiva debido a la baja especificidad del PSA total. De hecho, solamente si se utiliza el valor del %PSAI, se pueden obtener valores razonables de la ABC, y además, solamente si los valores de %PSAI se usan junto con THBS1 se puede obtener una elevada sensibilidad. También, si los valores totales del PSA se evalúan junto con THBS1, solamente se obtiene una especificidad para el 90% de sensibilidad que está significativamente por debajo del 50%, y un valor de la ABC significativamente por debajo de 0,83.

Modelos para parejas seleccionadas de CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1 en combinación con %PSAI

En una segunda etapa, las cuatro proteínas a analizar se investigaron por parejas, y el valor de la puntuación combinada optimizado se determinó para la correspondiente proteína tanto en solitario como junto con %PSAI.

Las Figuras 6-11 muestran las curvas de prueba de las características operativas del receptor (COR) optimizadas que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa, para el caso donde cada uno de todos los emparejamientos posibles de las proteínas del grupo THBS1, CTSD, ICAM1 y OLFM4 se midieron en solitario, cuando el %PSAI se mide solo, y cuando la concentración de los respectivos emparejamientos de proteínas se usa junto con la proporción de %PSAI para evaluación del valor de la puntuación combinada.

Como se puede observar de las curvas COR, de lejos, la mejor sensibilidad y especificidad se consigue con THBS1 en combinación con CTSD, lo que es muy sorprendente, ya que CTSD por sí sola no proporciona ninguna discriminación (véase la figura 3). También THBS1 con ICAM1 y OLFM4 conducen a algún beneficio adicional, pero no en la misma extensión que THBS1 combinada con CTSD, lo que es completamente inesperado considerando el superior comportamiento de ICAM1 y OLFM4 tomadas por sí solas (véanse las figuras 4 y 5) en comparación con CTSD por sí sola (véase la figura 3). Parece haber un alto grado de correlación entre los niveles de THBS1 y CTSD en sangre, suero y plasma hasta la fecha desconocido.

Por el contrario, los emparejamientos que no implican que THBS1 no proporcionan ningún beneficio adicional, como puede observarse en las figuras 9-11. Esto es también inesperado, ya que también en estos casos podría haberse observado una alta correlación que conduce a un beneficio adicional en el análisis de COR. Sin embargo, no se pudo identificar dicho beneficio en la cohorte ensayada.

Modelo específico: %PSAI, CTSD, THBS1

La figura 6 muestra las curvas características de funcionamiento del receptor (COR) para esta estrategia. %PSAI dio como resultado una ABC = 0,6498 (P <0,001; IC 95% = 0,6004-0,6992). CTSD y THBS1 juntas discriminaron entre varones con biopsias de próstata negativas y positivas con una ABC = 0,8343 (P <0,001; IC 95% = 0,7974-0,8712). La combinación de %PSAI, CTSD THBS1 dio como resultado una ABC = 0,8448 (P <0,001; IC 95% = 0,8097-0,8798).

Para una sensibilidad ≥90% para la biopsia de próstata positiva y por tanto PCa, la especificidad de la combinación de %PSAI, CTSD y THBS1 fue del 60%. En comparación, el ensayo %PSAI comúnmente utilizado en la práctica clínica tuvo una especificidad del 21% a la misma sensibilidad. Esto muestra que CTSD y THBS1 combinadas con %PSAI habrían evitado 141 (60%) de 236 biopsias negativas y retrasaron el diagnóstico del 10% de PCa (Figura 12). Asimismo, se consiguió un valor alto de NPV del 94% para PCa de calidad alta (puntuación Gleason ≥7). Estos resultados indican que la combinación de %PSAI, CTSD y THBS1 da como resultado una mejora significativa.

La Figura 12 ilustra la reducción de biopsias negativas a una sensibilidad del 90% para la biopsia de próstata positiva y por tanto PCa. Se proporcionan los porcentajes para %PSAI en solitario, CTSD y THBS1, y la combinación de %PSAI, CTSD y THBS1.

En este modelo, como en los otros casos, basándose en las concentraciones medidas de %PSAI en solitario, CTSD y THBS1, y la combinación de %PSAI, CTSD y THBS1, respectivamente, en cada caso, se calculó un valor de puntuación combinada utilizando la fórmula anteriormente mencionada (1) con las constantes obtenidas tras la optimización:

Fórmula de regresión logística:

El modelo de regresión logística utilizado en todos estos resultados proporciona una estimación de los coeficientes a utilizar en la ecuación (1):

$$\frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \dots + \beta_k \cdot x_k)}} \quad (1)$$

Donde las β son los coeficientes de regresión, siendo β₀ la ordenada en el origen, y los x_i son los valores de las variables independientes correspondientes. El resultado (p_i) es la probabilidad de una observación con el modelo dado de valores de las variables independientes que tienen el evento.

Estos p_i son las puntuaciones que se usan para construir la curva COR.

Variables en esta ecuación para la situación del modelo específico: %PSAI, THBS1 es del siguiente modo:

Parámetro	DF	B	Error estándar	Chi-Cuadrado de Wald	Pr > ChiCu	Exp(B)
Ordenada	1	4,663205	0,486095	92,029501	8,54E-22	105,975153
THBS1	1	-0,000053	0,000005	95,644963	1,37E-22	0,999947
%PSAI	1	-5,381332	1,372877	15,364416	0,000089	0,004602

Para la situación donde la concentración de THBS1 así como la proporción de %PSAI se miden en la primera etapa, para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión son de la siguiente forma: β₀ = 4,663; β_{THBS1} = -0,000053; β_{%PSAI} = -5,381.

Para un 90% de sensibilidad se proporciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de más de 0,316.

VARIABLES EN ESTA ECUACIÓN PARA LA SITUACIÓN DEL MODELO ESPECÍFICO: %PSAI, CTSD, THBS1 ES DEL SIGUIENTE MODO:

Parámetro	DF	B	Error estándar	Chi-Cuadrado de Wald	Pr > ChiCu	Exp(B)
Ordenada	1	3,233	0,561	33,248	8,113E-9	25,367
CTSD	1	0,010	0,002	19,340	0,000011	1,010
THBS1	1	-0,000063	0,000006	102,843	3,6272E-24	1,000
%PSAI	1	-4,946	1,393	12,612	0,00383	0,007

- 5 Para un 90% de sensibilidad se proporciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de más de 0,330. De este modo, por ejemplo, cuando las siguientes concentraciones/proporciones se miden/determinan en una muestra específica:

UPN	CTSD (ng/ml)	THBS1 (ng/ml)	%PSAI (0-1)
HH0106	227	78501	0,27

- 10 Se va a evaluar lo siguiente:

$$p_i = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 \cdot x_{1,i} + \dots + \beta_k \cdot x_{k,i})}}$$

- 15

$$p_{HH0106} = \frac{1}{1 + e^{-(ordenada\ origen + CTSD + THBS1 + \%PSAI)}} =$$

$$p_{HH0106} = \frac{1}{1 + e^{-(3,233 + 0,010 \cdot 227 - 0,000063 \cdot 78501 - 4,946 \cdot 0,27)}} =$$

$$p_{HH0106} = 0,31644$$

- 20 Para un 90% de sensibilidad para la biopsia de próstata positiva y por tanto PCa, el umbral del valor de la puntuación combinada p_i es 0,330, entonces, para la muestra HH0106 no se recomendaría una biopsia de próstata ya que los correspondientes valores de concentración no indicarían un resultado positivo en la biopsia de próstata y, por tanto, la presencia de PCa.
- 25 Para la situación donde la concentración de THBS1, la proporción de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de OLFM4 se mide en la primera etapa, para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión son de la siguiente forma:
 $\beta_0 = 4,606$; $\beta_{OLFM4} = 0,00271$; $\beta_{THBS1} = -0,000054$; ($\beta_{\%PSAI} = -5,423$).

- 30 Para un 90% de sensibilidad se proporciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de más de 0,323.

Para la situación donde la concentración de THBS1, la proporción de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de ICAM1 se mide en la primera etapa, para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión son de la siguiente forma:

- 35 $\beta_0 = 4,769$; $\beta_{ICAM1} = -0,00084$; $\beta_{THBS1} = -0,000053$; $\beta_{\%PSAI} = -5,395$.

Para un 90% de sensibilidad se proporciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de más de 0,318.

Modelo: %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4, ICAM1

- 40 La figura 13 muestra las curvas características de funcionamiento del receptor (COR) para esta estrategia. %PSAI dio como resultado una ABC = 0,6498 (P < 0,001; IC 95% = 0,6004-0,6992). CTSD, THBS1, OLFM4 y ICAM1 juntas discriminaron entre varones con biopsias de próstata negativas y positivas con una ABC = 0,8345 (P < 0,001; IC 95% = 0,7978-0,8713). La combinación de %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 ICAM1 dio como resultado una ABC = 0,8463 (P < 0,001; IC 95% = 0,8122-0,8817).

La Figura 13 muestra las curvas de las características operativas del receptor (COR) que representan gráficamente la precisión de los predictores individuales de la biopsia del cáncer de próstata positivo y, por tanto, del PCa. %PSAI en solitario, CTSD, THBS1, OLFM4, ICAM1, y la combinación de %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 y ICAM1, se muestran las curvas COR.

5 Para una sensibilidad $\geq 90\%$ para la biopsia de próstata positiva y por tanto PCa, la especificidad de la combinación de %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1 era del 58%. En comparación, el ensayo %PSAI comúnmente utilizado en la práctica clínica tuvo una especificidad del 21% a la misma sensibilidad. Esto muestra que el conjunto propuesto de marcadores combinados con %PSAI evitarían 136 (58%) de 236 biopsias negativas y retrasaron el diagnóstico del 10% de PCa (Figura 13). Asimismo, se consiguió un valor alto de NPV del 93% para PCa de calidad alta (puntuación Gleason ≥ 7). Estos resultados indican que la combinación de %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1 da como resultado una mejora significativa sobre %PSAI en solitario, pero no una mejora adicional significativa sobre %PSAI, CTSD, THBS1.

15 La Figura 14 muestra la reducción de biopsias negativas para un 90% de sensibilidad. Porcentajes dados para %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1, y la combinación de %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1.

También aquí, las curvas COR ilustradas en la figura 13 son curvas de entrenamiento, es decir, las curvas obtenidas después de la optimización del modelo que correlaciona de una manera optimizada las concentraciones medidas con el diagnóstico verdadero basado en las biopsias.

También es este modelo, basándose en las concentraciones medidas de %PSAI en solitario, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1, y la combinación de %PSAI, CTSD, THBS1, OLFM4 e ICAM1, respectivamente, se calculó en cada caso un discriminador usando la siguiente fórmula con las constantes obtenidas tras la optimización:

25 $\beta_0 = 3,567$; $\beta_{OLF4} = 0,002$; $\beta_{THBS1} = -0,000063$; $\beta_{CTSD} = 0,01$; $\beta_{ICAM1} = -0,003$; $\beta_{\%PSAI} = -5,033$.

Para un 90% de sensibilidad se proporciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de más de 0,329.

30 en términos de las fórmulas para p esto significa lo siguiente:

$$p_i = \frac{1}{1 + e^{-(3,567 + 0,01[CTSD] - 0,000063[THBS1] + 0,002[OLF4] - 0,003[ICAM1] - 5,033 * (\frac{\%PSAI}{PSAt}))}}$$

corte $p_{i=90\%sensibilidad} = 0,329$ ($>0,329 =$ positivo).

35 Conclusiones:

Inesperadamente, la combinación de THBS1 y %PSAI, y aún más la combinación de CTSD, THBS1 y %PSAI es significativamente más precisa que PSAt o %PSAI sólo en la determinación de la ausencia de PCa en varones con PSAt elevada (2-10 ng/ml), próstata alargada (≥ 35 ml) y DRE negativo. La implementación de un ensayo que comprende estos tres parámetros en la práctica clínica tiene el potencial de disminuir significativamente el índice de biopsias innecesarias en hasta un 60%.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para recopilar información acerca del estado de salud indicativo del cáncer de próstata en un sujeto que implica la detección cuantitativa, en suero, plasma o sangre del sujeto, de la concentración de THBS1 (trombospondina 1 humana), así como la proporción de PSA libre (%PSAI, PSA = Antígeno específico de próstata).
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que implica la detección cuantitativa, en suero, plasma o sangre del sujeto, de la concentración de THBS1, la proporción de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de al menos una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en CTSD (catepsina D humana), OLFM4 (olfactomedina 4 humana), ICAM1 (molécula 1 de adhesión intercelular humana).
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el método incluye una primera etapa a realizar poniendo en contacto el suero del sujeto, plasma o sangre, preferentemente tras dilución del mismo, con al menos, preferentemente dos, reactivo(s) de afinidad para cada proteína y detectar si se produce la unión entre la respectiva proteína y al menos un reactivo de afinidad y usar la lectura cuantitativa de la concentración respectiva de la proteína, permitiendo el cálculo de la concentración respectiva en el suero, plasma o sangre original, o en el caso de PSA libre su proporción; una segunda etapa de cálculo, basada en todas las concentraciones de proteínas así como en la proporción de PSA libre determinada en la primera etapa, un valor de puntuación combinada, calculado basándose en las concentraciones/proporciones de la proteína determinada de una manera combinada.
4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, donde después de la segunda etapa en una tercer etapa, el riesgo de tener un resultado positivo en la biopsia de y/o cáncer de próstata del sujeto, se determina basándose en el valor de puntuación combinada que se determina en la segunda etapa, donde sobrepasar un valor umbral correspondiente del valor de la puntuación combinada se toma como una información positiva de cáncer de próstata y/o como una necesidad de biopsia.
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde el valor de puntuación combinada se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \dots + \beta_k \cdot x_k)}}$$

donde β_i son los coeficientes de regresión que se determinan de antemano utilizando datos experimentales, siendo β_0 la ordenada en el origen, y donde x_i es la concentración medida de la proteína respectiva en el suero, plasma o sangre original y en el caso de PSA libre (%PSAI) la proporción en el suero, plasma o sangre original.

6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la concentración de THBS1 (expresada en ng/ml), así como la proporción (expresada en el intervalo numérico de 0-1) de PSA libre (%PSAI) y preferentemente además la concentración de CTSD (expresada en ng/ml) se mide en la primera etapa, y donde para el cálculo del valor de la puntuación combinada en el caso de medir THBS1 y la proporción de PSA libre (%PSAI) los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

β_0 en el intervalo de 4,0-5,0, preferentemente en el intervalo de 4,5-4,8;
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,00009)-(-0,00003), preferentemente en el intervalo de (-0,00004)-(-0,00006);
 $\beta_{\% \text{PSAI}}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,5)-(-5,0),
 y donde preferentemente, además, para un 90% de sensibilidad se selecciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,28-0,35, preferentemente 0,30-0,33;
 o donde para el cálculo del valor de la puntuación combinada, en el caso de medir THBS1, la proporción de PSA libre (%PSAI), así como CTSD, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

β_0 en el intervalo de 3-3,4, preferentemente en el intervalo de 3,1-3,3;
 β_{CTSD} en el intervalo de 0,005-0,05, preferentemente en el intervalo de 0,008-0,012;
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,00009)-(-0,00003), preferentemente en el intervalo de (-0,00007)-(-0,00006);
 $\beta_{\% \text{PSAI}}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,2)-(-2,5),
 y donde preferentemente, además, para un 90% de sensibilidad se selecciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,28-0,35, preferentemente 0,33-0,34, es lo que se selecciona.

7. Método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la concentración de THBS1 (expresada en ng/ml), la proporción (expresada en el intervalo numérico de 0-1) de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de OLFM4 (expresada en ng/ml) se mide en la primera etapa, y donde preferentemente para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

β_0 en el intervalo de 4,0-5,2, preferentemente en el intervalo de 4,4-4,8;
 β_{OLFM4} en el intervalo de 0,001-0,01, preferentemente en el intervalo de 0,002-0,004;
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,00009)-(-0,00002), preferentemente en el intervalo de (-0,00006)-(-0,00004);
 $\beta_{\% \text{PSAI}}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,9)-(-4,8),
 5 y donde preferentemente, además, para un 90% de sensibilidad se selecciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,27-0,35, preferentemente 0,3-0,34,
 y/o
 donde la concentración de THBS1 (expresada en ng/ml), la proporción (expresada en el intervalo numérico de 0-1) de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de ICAM1 (expresada en ng/ml) se mide en la primera etapa,
 10 y donde preferentemente para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

β_0 en el intervalo de 4,0-5,2, preferentemente en el intervalo de 4,6- 4,9;
 β_{ICAM1} en el intervalo de (-0,002)-(-0,0001), preferentemente en el intervalo de (-0,0010)-(-0,0005);
 15 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,0001)-(-0,00001), preferentemente en el intervalo de (-0,00008)-(-0,00004);
 $\beta_{\% \text{PSAI}}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente en el intervalo de (-5,8)-(-4,9),
 y donde preferentemente, además, para un 90% de sensibilidad se selecciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,25-0,35, preferentemente 0,3-0,33, es lo que se selecciona.

20 8. Método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la concentración de THBS1 (expresada en ng/ml), la proporción (expresada en el intervalo numérico de 0-1) de PSA libre (%PSAI), así como la concentración de OLFM4, ICAM1 así como CTSD (expresada en cada caso en ng/ml) se miden en la primera etapa, y donde preferentemente para el cálculo del valor de la puntuación combinada, los coeficientes de regresión se seleccionan de la siguiente forma:

25 β_0 en el intervalo de 3-3,8, preferentemente en el intervalo de 3,5-3,6;
 β_{OLFM4} en el intervalo de 0,001-0,003, preferentemente en el intervalo de 0,0015-0,0025;
 β_{ICAM1} en el intervalo de (-0,004)-(-0,002), preferentemente en el intervalo de (-0,0035)-(-0,00025);
 β_{CTSD} en el intervalo de 0,005-0,05, preferentemente en el intervalo de 0,008-0,012;
 β_{THBS1} en el intervalo de (-0,00009)-(-0,00003), preferentemente en el intervalo de (-0,00007)-(-0,00006);
 30 $\beta_{\% \text{PSAI}}$ en el intervalo de (-7,5)-(-2,5), preferentemente, en el intervalo de (-5,2)-(-4,8) y donde preferentemente, además, para un 90% de sensibilidad se selecciona un valor umbral del valor de la puntuación combinada de 0,3-0,35, preferentemente 0,32-0,335, es lo que se selecciona.

35 9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde THBS1 y/o al menos una de CTSD, OLFM4, ICAM1 tal como se miden comprenden modificaciones posteriores a la traducción, incluidas glicosilación, fosforilación, lipidación.

40 10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde para la medición de la concentración de al menos una de THBS1, CTSD, OLFM4, ICAM1, el suero, plasma o sangre del sujeto se diluye utilizando un tampón que tiene un valor de pH en el intervalo de 7-7,4 y que comprende un agente que controla el valor del pH, seleccionado preferentemente entre al menos uno de los siguientes sistemas: Tris (tris(hidroximetil)aminometano), Pipes (Ácido piperazina-1,4-bis-2-etanosulfónico), Mes (Ácido 4-morfolinoetanosulfónico), Hepes (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico), solución salina tamponada con fosfato (PBS), y opcionalmente componentes adicionales seleccionados entre al menos un sistema de la siguiente forma: detergente no iónico, preferentemente en una concentración del 0,01 al 0,1 % (v/v), preferentemente 0,025-0,05% (v/v), y seleccionado entre al menos uno del grupo que consiste en: Dodecilpoli(etilenglicoléter)m, donde m es un número entero de 5 a 40; 1-O-n-Octil- β -D-glucopiranosido (n-Octilglucósido); Alquilfenolpili(etilenglicol-éter)m, donde m es un número entero de 5 a 40, preferentemente m= 11; 1-O-n-Dodecil- β -D-glucopiranosil (1-4)alfa-D-glucopiranosido; Dodecilpoli-(etilenglicoléter)m, donde m es un número entero de 5 a 40, preferentemente m= 23;
 50 Monoéster de ácido graso de poli(oxietileno)(20)-sorbitán, preferentemente seleccionado entre monooleato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán, monolaurato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán, monopalmitato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán, monoestearato de poli(oxietileno)(20)-sorbitán; Octilfenolpoli(etilenglicoléter)m, donde m es un número entero de 5 a 40, preferentemente m= 10; albúmina de suero bovino, donde preferentemente el tampón tiene una fuerza iónica en el intervalo de 50-850mM, preferentemente en el intervalo de 200-400 o en el intervalo de 250 - 370
 55 mM.

60 11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, donde para la dilución para medir THBS1, se selecciona un factor de dilución en el intervalo de 1:1.000-1:20.000, preferentemente en el intervalo de 1:2.000-1:3.000 para un ensayo de inmunoadsorción, y en el intervalo de 1:5.000-1:15.000 para un ensayo basado en perlas,
 y/o donde para la dilución para medir la proteína CTSD, se selecciona un factor de dilución en el intervalo de 1:5-1:30, preferentemente en el intervalo de 1:10-1:30 para un ensayo de inmunoadsorción y en el intervalo de 1:10-1:20 para un ensayo basado en perlas, y donde preferentemente, el tampón utilizado se suplementa además con un detergente no iónico seleccionado como monolaurato de poli(oxietilén)(20)-sorbitán para conducir a una
 65 concentración adicional del mismo de 0,05% (v/v),
 y/o donde, para la dilución para medir ICAM1, se selecciona un factor de dilución en el intervalo de 1:50 -1:200,

- preferentemente en el intervalo de 1:80-1:150, y donde, preferentemente, el tampón utilizado está suplementado además con cloruro de sodio hasta un contenido adicional de cloruro de sodio de 250 mM, y/o donde para la dilución para medir OLFM4, se selecciona un factor de dilución en el intervalo de 1 5-1:30, preferentemente, en el intervalo de 1:5-1:20, y donde preferentemente el tampón usado se suplementa
- 5 adicionalmente con cloruro de sodio hasta un contenido adicional de cloruro de sodio adicional de 250 mM así como un agente de reducción, seleccionado preferentemente como ditioneitol (DTT) para producir una concentración de 5 mM del mismo.
12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el método incluye una primera etapa
- 10 que se lleva a cabo poniendo en contacto el suero, plasma o sangre del sujeto, preferentemente tras dilución del mismo, con al menos un reactivo de afinidad para cada proteína y detectar si se produce la unión entre la proteína respectiva y al menos un reactivo de afinidad y usar la lectura cuantitativa de la concentración de la proteína respectiva o, en el caso del PSA libre, su proporción, permitiendo el cálculo de la concentración respectiva en el suero, plasma o sangre original, y donde se usa en esta etapa bien un enzimoanálisis de adsorción de tipo
- 15 específico de la proteína respectiva, preferentemente con lectura visible, y/o un ensayo de anticuerpos de tipo sándwich basados en perlas para la proteína respectiva, preferentemente con lectura fluorescente.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, donde el enzimoanálisis de adsorción de tipo sándwich específico de la proteína respectiva preferentemente con lectura visible y/o el ensayo de anticuerpos de tipo
- 20 sándwich basado en perlas para la proteína respectiva, preferentemente con lectura fluorescente se puede obtener usando proteínas recombinantes de la THBS1, CTSD, ICAM1 y OLFM4 humana, respectivamente, y anticuerpos monoclonales de ratón generados mediante la inmunización de ratones con los mismos.
14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección cuantitativa de la
- 25 concentración respectiva implica la determinación de la concentración de dichos biomarcadores con respecto a un patrón de proteínas externo, que implica la preparación de una curva patrón de referencia midiendo concentraciones definidas de varios, preferentemente 5-7 patrones de proteínas diluidos en el mismo patrón que el usado para diluir la proteína que se va a medir en el mismo conjunto de mediciones de las muestras.
15. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde este implica una etapa de al menos
- 30 uno de vigilancia, diagnóstico, predicción del resultado de la biopsia de próstata, pronóstico, evaluación de riesgos, selección de terapia, vigilancia de la terapia del cáncer, en particular del cáncer de próstata, incluyendo el cáncer de próstata localizado o el uso de un método in vitro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores durante al menos uno de vigilancia, diagnóstico, predicción del resultado de la biopsia de próstata, pronóstico,
- 35 evaluación de riesgos, selección de terapia, vigilancia de la terapia del cáncer de próstata, incluido el cáncer de próstata localizado.

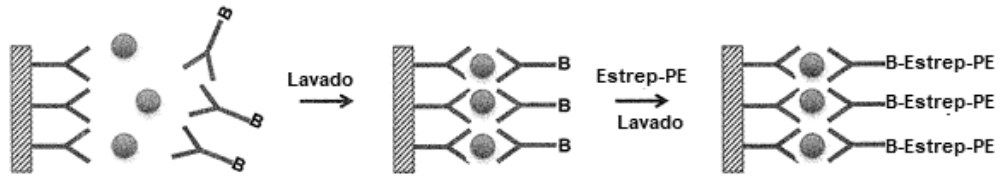


FIG. 1

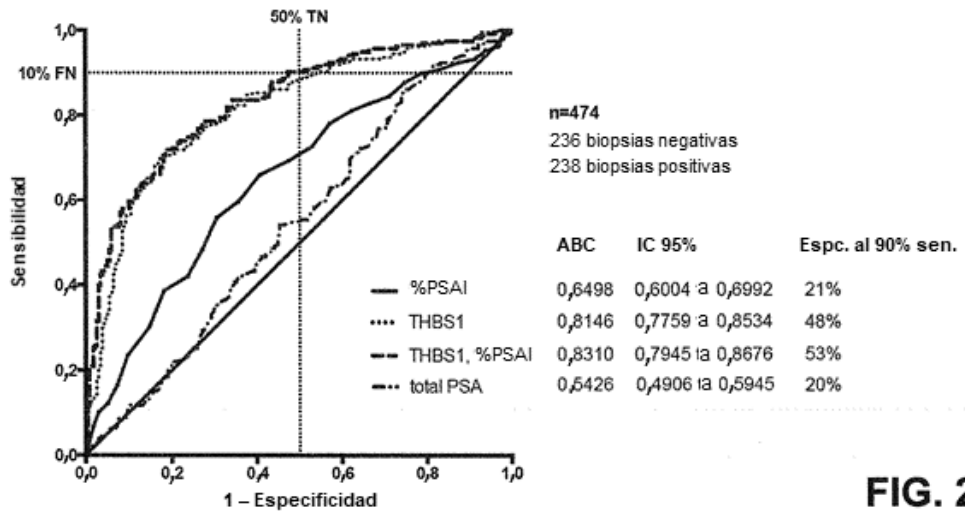


FIG. 2

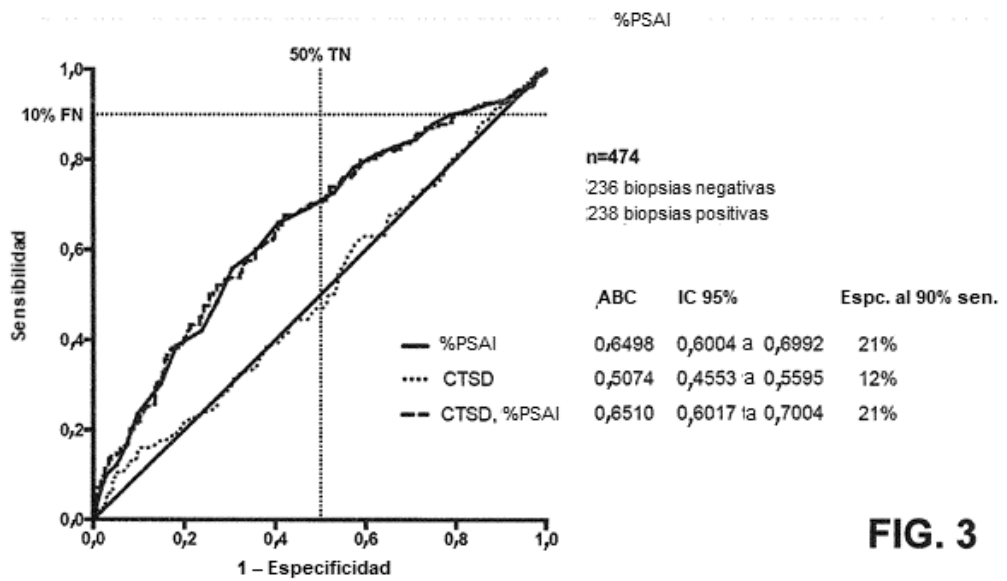


FIG. 3

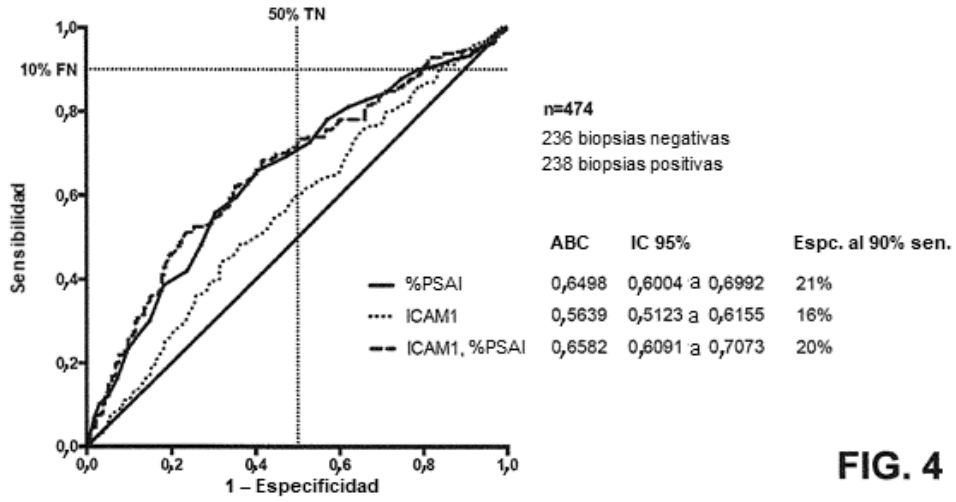


FIG. 4

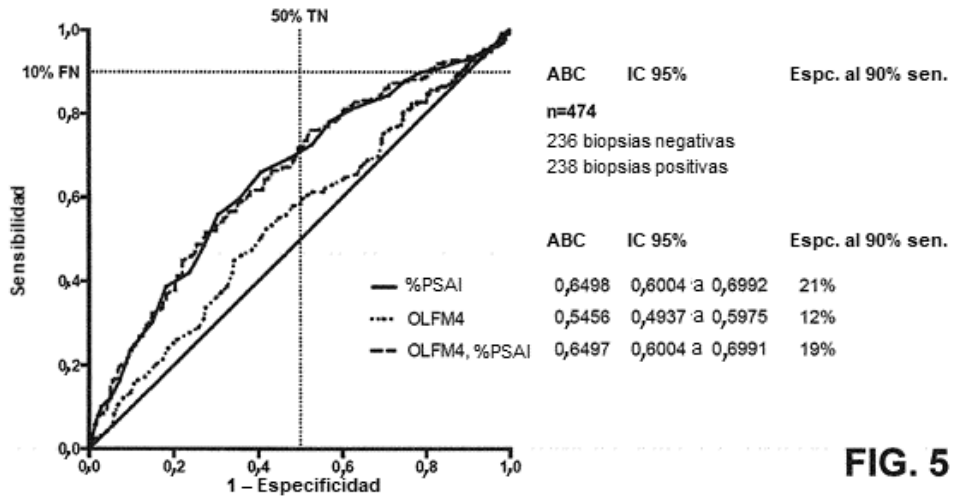


FIG. 5

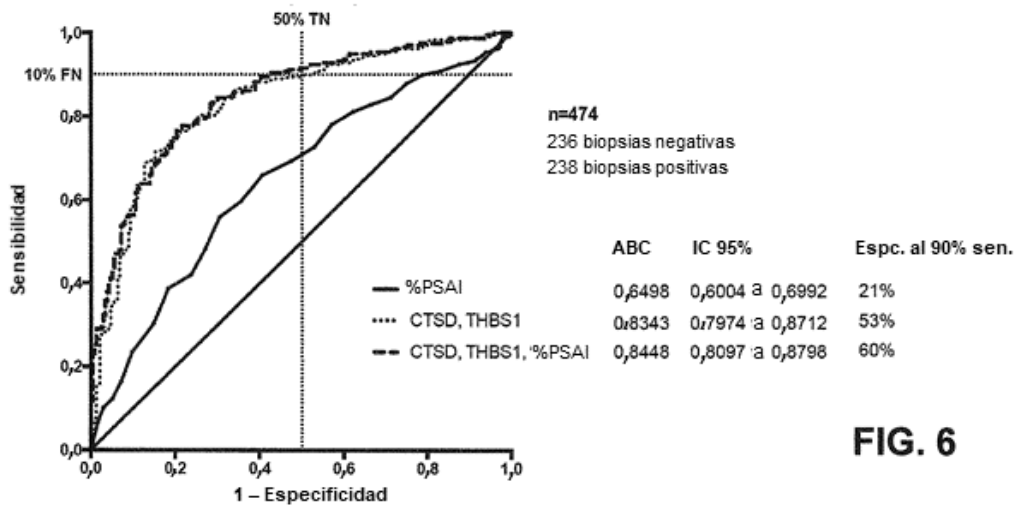


FIG. 6

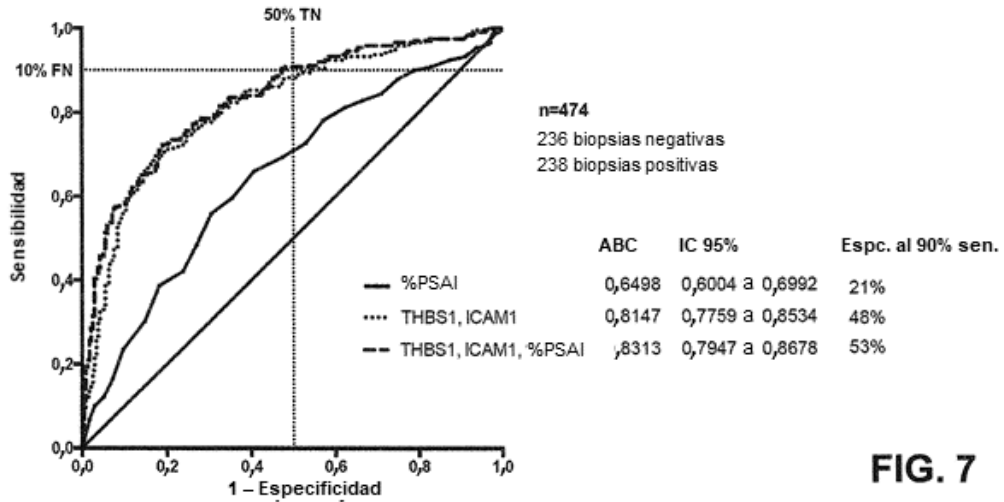


FIG. 7

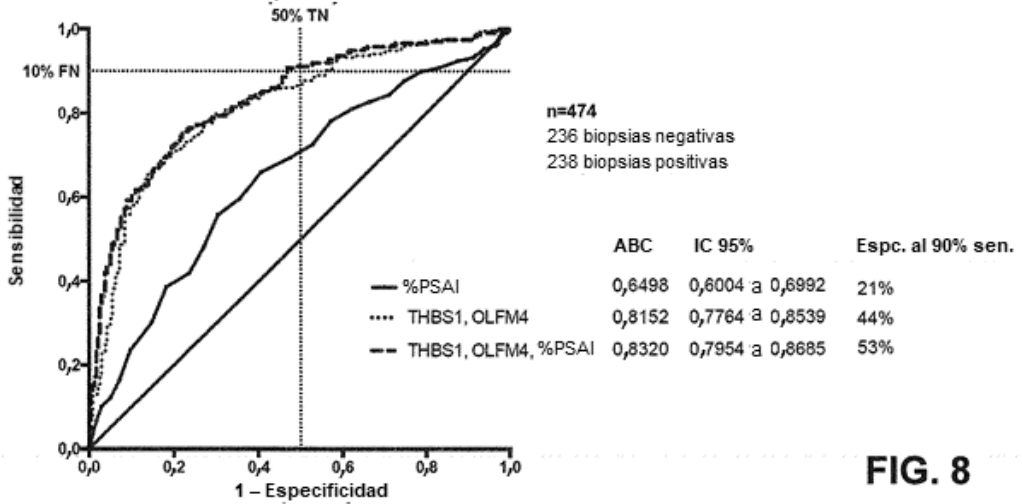


FIG. 8

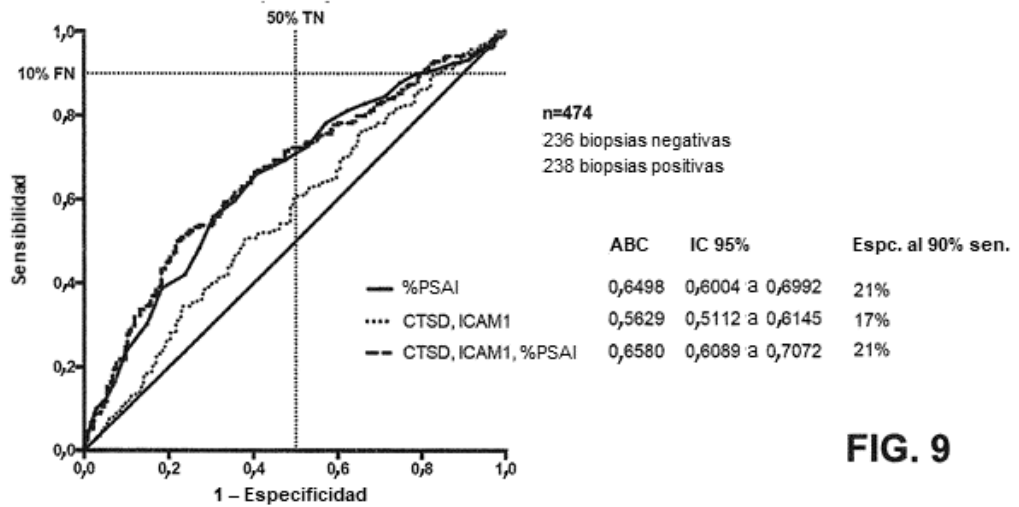


FIG. 9

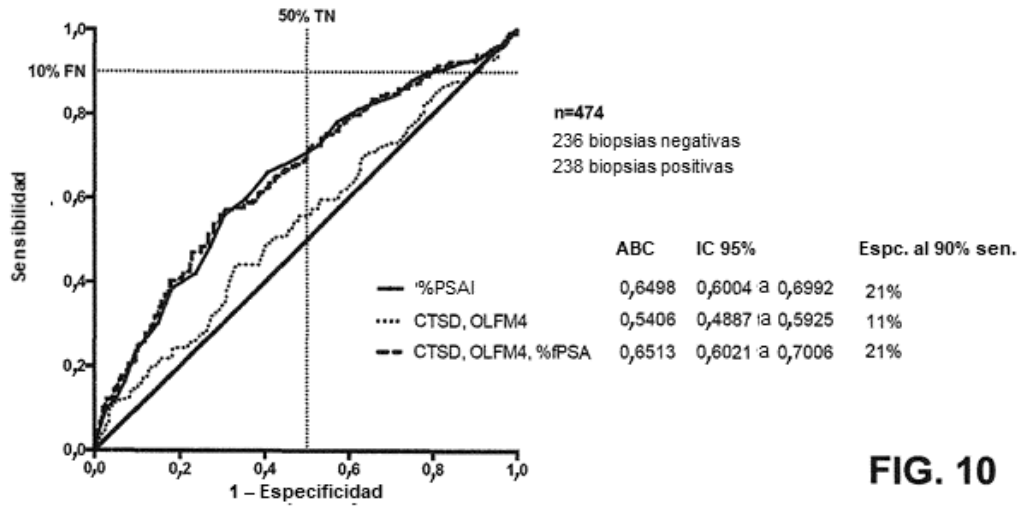


FIG. 10

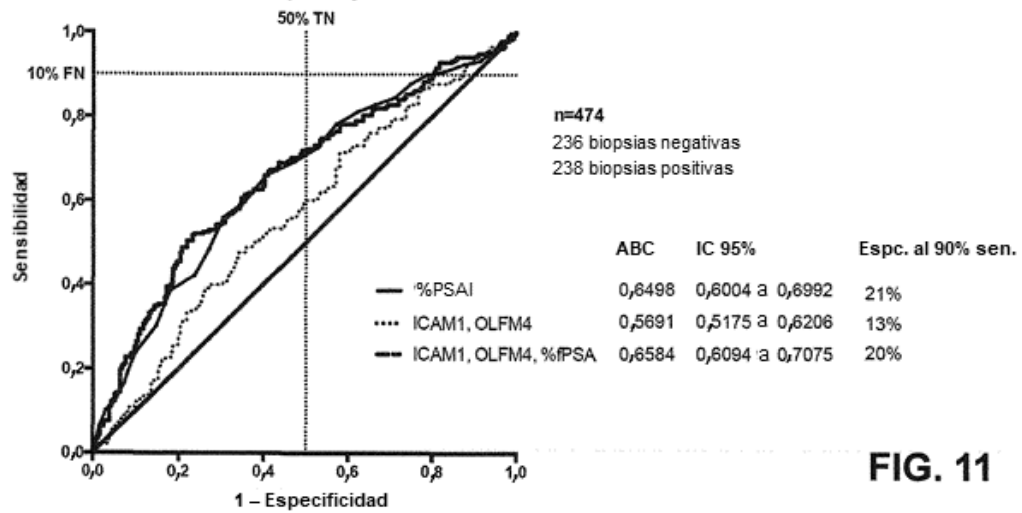


FIG. 11

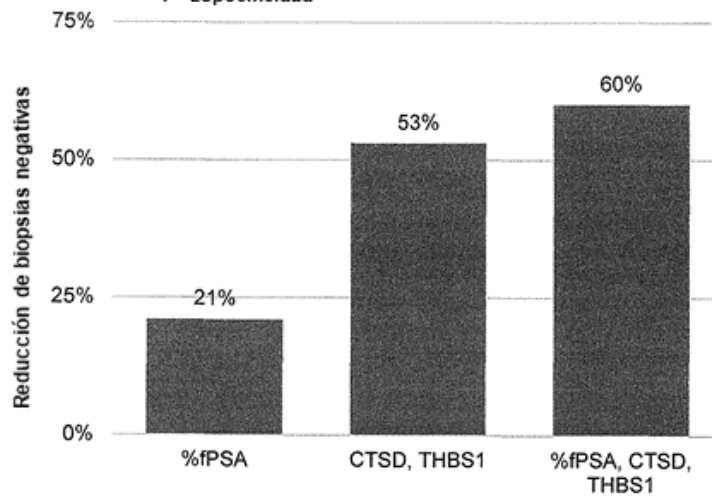


FIG. 12

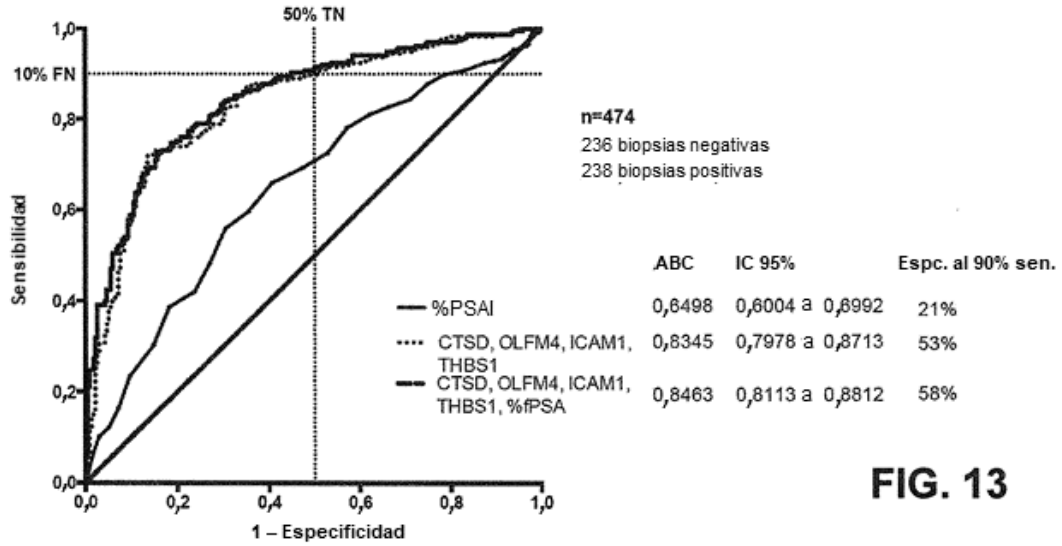


FIG. 13

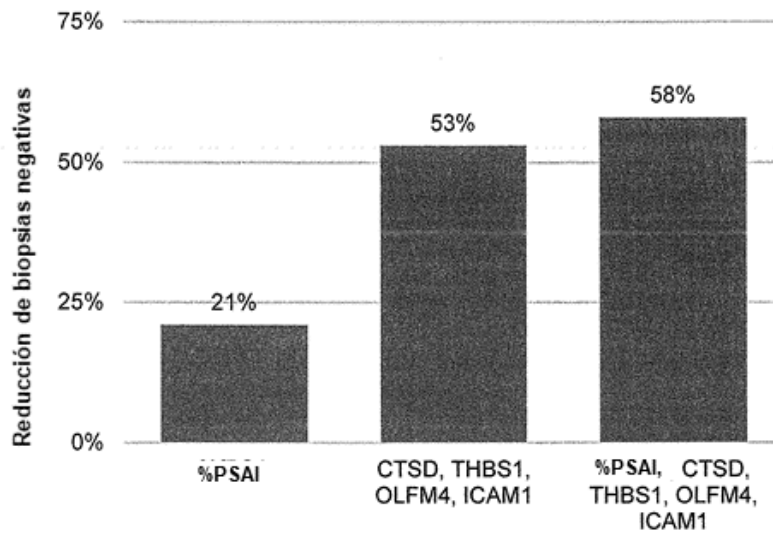


FIG. 14