

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 637**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2016 PCT/FI2016/050490**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17005974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2016 E 16739195 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3317668**

54 Título: **Diagnóstico de enfermedades ginecológicas, especialmente cáncer de ovario epitelial**

30 Prioridad:

03.07.2015 FI 20155531

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

13.04.2020

73 Titular/es:

**KAIVOGEN OY (100.0%)
Tykistökatu 4 D
20520 Turku, FI**

72 Inventor/es:

**PETTERSSON, KIM y
GIDWANI, KAMLESH**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 753 637 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

Diagnóstico de enfermedades ginecológicas, especialmente cáncer de ovario epitelial

Campo de la invención.

5 La presente descripción se refiere al diagnóstico no invasivo de enfermedades ginecológicas, especialmente cáncer de ovario epitelial (EOC), sobre la base del patrón de glucosilación alterado de CA125, y proporciona varios métodos de diagnóstico, pronóstico o monitoreo de enfermedades ginecológicas, incluido el EOC.

Antecedentes de la invención.

10 La detección precoz del cáncer con biomarcadores sensibles y precisos es clave para el éxito de un tratamiento del cáncer. Tales biomarcadores son especialmente importantes para los cánceres que permanecen asintomáticos hasta la etapa de diseminación, cuando raramente se puede lograr una respuesta curativa. El cáncer de ovario epitelial (EOC) es un importante problema de atención médica, ya que no se detecta con suficiente sensibilidad ni especificidad. La tasa de supervivencia de 5 años para las mujeres diagnosticadas en la etapa inicial es del 90%, mientras que es del 20% si se detecta durante la etapa tardía.

15 El antígeno de cáncer humano 125 (CA125), también conocido como mucina 16 o MUC16, es una glucoproteína transmembrana compleja, y el biomarcador más utilizado para el EOC. Desempeña un papel importante no solo en el diagnóstico del cáncer primario de ovario epitelial, sino también en el monitoreo de la enfermedad en mujeres en situación postoperatoria. Los ensayos CA125 existentes son inmunoensayos de doble determinante basados en la detección de dos epítomos diferentes de la proteína CA125 por dos anticuerpos monoclonales diferentes.

20 Sin embargo, el CA125 carece de sensibilidad y especificidad para el cáncer, especialmente en las etapas precoces de EOC, debido a su elevada expresión también en condiciones ginecológicas benignas como neoplasias ováricas benignas y endometriosis, así como en enfermedades hepáticas e incluso durante el ciclo ovulatorio normal. Por lo tanto, el CA125 no se recomienda para la detección del EOC.

25 Durante la progresión del cáncer, los patrones de glucosilación de muchas proteínas cambian. Así pues, la detección de patrones de glucosilación relacionados con el cáncer podría ofrecer nuevos enfoques de diagnóstico para conseguir una mejor especificidad en la detección de tumores. De hecho, se ha reportado una composición alterada de glucano en el carcinoma de ovario en comparación con el tejido ovárico normal y, además, se han publicado estructuras alteradas de glucano en el CA125 del suero de pacientes con EOC.

30 Chen et al. (J. Proteome Res., 2013, 12, 1408 - 1418) publicaron que las O-glicofomas aberrantes de CA125 están presentes en el suero de pacientes con EOC primario y pueden detectarse con un inmunoensayo de tipo sándwich utilizando un anticuerpo monoclonal específico de O-glucano y VVL (*Vicia Villosa lectina*).

35 Aunque el glicoperfil de marcadores tumorales conocidos, como CA125, y el uso de un panel de diferentes marcadores tumorales parecen ser prometedores para aumentar la sensibilidad y la especificidad de la detección del cáncer de ovario a través de la eliminación de muchos resultados falsos positivos, todavía existe la necesidad de más marcadores específicos que permitan una discriminación suficiente y fácil de usar entre enfermedades benignas y cánceres de ovario epiteliales precoces curables.

Breve descripción de la invención.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar un estado patológico ginecológico en un sujeto. Dicho método comprende las etapas de:

40 ensayar una muestra obtenida de dicho sujeto para determinar el nivel de CA125 que se une a la lectina de tipo galactosa en macrófagos (CA125^{MGL}), determinando la unión de CA125 a MGL,

comparar el nivel detectado de CA125^{MGL} en dicha muestra con el de una muestra testigo o de control o un valor umbral predeterminado, y

45 determinar el estado de la enfermedad ginecológica en dicho sujeto sobre la base de dicha comparación, en donde la enfermedad ginecológica se selecciona entre el grupo de cáncer epitelial de ovario (EOC), endometriosis y cáncer de endometrio.

En algunas realizaciones, el aumento de nivel de CA125^{MGL} indica que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener cáncer de ovario epitelial (EOC), mientras que la ausencia de aumento del nivel de CA125^{MGL} indica que dicho sujeto no tiene o no está en riesgo de tener EOC pero puede tener o estar en riesgo de tener endometriosis o cáncer de endometrio, o puede estar aparentemente sano también con respecto a la endometriosis o el cáncer de endometrio.

5 En algunas de otras realizaciones el método puede comprender además analizar una muestra obtenida de dicho sujeto para determinar la concentración de proteína CA125, y comparar la concentración de proteína CA125 detectada con la de una muestra de control o un valor umbral predeterminado. El aumento de la concentración de proteína CA125 en combinación con un mayor nivel de CA125^{MGL} indicaría además que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener EOC, mientras que el aumento de la concentración de proteína CA125 en combinación con un nivel no aumentado de CA125^{MGL} indicaría que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener endometriosis.

10 Alternativamente, o además, el método puede también comprender analizar la concentración de HE4 en una muestra obtenida de dicho sujeto, y comparar la concentración de HE4 detectada con la de una muestra de control o un valor umbral predeterminado. El aumento de la concentración de HE4 en combinación con un aumento de nivel de CA125^{MGL} indicaría además si dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener EOC, mientras que el aumento de la concentración de HE4 en combinación con la ausencia de aumento del nivel de CA125^{MGL} indicaría que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener cáncer de endometrio.

15 El presente método puede usarse, por ejemplo, para el diagnóstico diferencial de una enfermedad ginecológica seleccionada entre el grupo que consiste en EOC, endometriosis o cáncer de endometrio, o para diagnosticar, pronosticar o controlar una enfermedad ginecológica seleccionada entre el grupo que consiste en EOC, endometriosis o cáncer de endometrio. En algunas realizaciones, dicho monitoreo puede abarcar el inicio del monitoreo de dicha enfermedad ginecológica, para controlar cualquier cambio en riesgo de tener o de desarrollar dicha enfermedad ginecológica, para controlar la respuesta al tratamiento, para controlar la recidiva de dicha enfermedad ginecológica o para controlar la recurrencia de dicha enfermedad ginecológica.

20 En algunas realizaciones adicionales, dicho análisis del nivel de CA125^{MGL} puede llevarse a cabo analizando el nivel de unión de CA125 a dicho MGL-NP, el cual análisis puede comprender capturar el CA125 contenido en la muestra usando un agente de captura, tal como un anticuerpo anti-CA125 o mesotelio, y midiendo dicho CA125 capturado para medir el nivel de unión a MGL-NP con la ayuda de una señal detectable. En otras palabras, dicha muestra se analiza para determinar la cantidad de CA125^{MGL} usando un agente de unión a CA125 y MGL-NP etiquetado de forma detectable.

25 En algunas otras realizaciones, dicho análisis del nivel de CA125^{MGL} puede llevarse a cabo ensayando el nivel de unión de CA125 a dicho MGL-NP, el cual ensayo puede comprender someter dicha muestra a MGL-NP para capturar la glucoforma de unión a MGL de CA125 contenido en la muestra, y medir la cantidad de CA125 capturado usando un agente de unión a CA125, tal como un anticuerpo anti-CA125 o mesotelio, con la ayuda de una señal detectable. En otras palabras, dicha muestra se analiza para determinar la cantidad de CA125^{MGL} usando MGL-NP y un agente de unión a CA125 marcado de forma detectable.

30 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit para uso en cualquiera de los métodos descritos en el presente texto. Dicho kit comprende un agente de unión a CA125, tal como un anticuerpo monoclonal anti-CA125 o mesotelio, y un MGL-NP. Dicho agente de unión a CA125 o dicho MGL-NP comprende un marcador detectable. En algunas realizaciones, dicho agente de unión a CA125 o dicho MGL-NP están unidos a una superficie sólida, tal como una placa de microtitulación.

35 En otro aspecto, la presente descripción proporciona el uso de un MGL-NP como se expone a continuación. Dicho MGL-NP puede usarse, por ejemplo, para diagnosticar, pronosticar y/o controlar un estado de enfermedad ginecológica en un sujeto seleccionado entre el grupo que consiste en EOC, endometriosis y cáncer de endometrio.

40 Otros objetivos, aspectos, realizaciones, detalles y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras, descripción detallada, ejemplos y reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de los dibujos.

En el texto que sigue, la invención se describirá con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

45 La Figura 1 ilustra los principios de diferentes ensayos de CA125 de la presente descripción. En un inmunoensayo CA125 convencional (Figura 1 A), tanto el agente de captura como el marcador son anticuerpos monoclonales que detectan diferentes epítomos proteicos de CA125. En un ensayo de tipo sándwich de anticuerpo-lectina (Figura 1 B), se usa un anticuerpo específico de epítomo de proteína CA125 como agente de captura, mientras que se usa una lectina marcada con Eu³⁺ específica de glucano como trazador. En un ensayo sándwich de nanopartículas de anticuerpo-lectina (Figura 1 C), se usa un anticuerpo específico del epítomo de proteína CA125 como agente de
50 captura, mientras que como marcador se usa una lectina marcada con nanopartículas de Eu³⁺ específico de glucano.

La Figura 2 muestra los resultados de un inmunoensayo de CA125 convencional. El CA125 de la línea celular de carcinoma de ovario primario OVCAR-3 (OvCa-CA125), líquido amniótico (AF-CA125) y homogenato placentario (Pla-CA125) fueron capturados en mAb Ov197 biotinilado. Se usó como marcador mAb Ov185 marcado con quelatos de

Eu³⁺. Todos los orígenes de CA125 mostraron relaciones señales/fondo casi similares, lo que indica que se usaron cantidades iguales de CA125 al margen del origen.

5 La Figura 3 ilustra el inmunoensayo CA125 convencional con cuatro muestras diferentes que contienen CA125, a saber, CA125 purificado de una línea celular de carcinoma primario de ovario OVCAR-3 (OvCa-CA125), homogenato placentario (Pla-CA125), líquido ascítico de cirrosis hepática (LC-CA125) y teratoma inmaduro (IT-CA125). Distintas cantidades de CA125 en el intervalo de 5 a 2000 U/ml (con la excepción de IT-CA125 cuya cantidad oscilaba entre 5 y 1000 U/ml) fueron capturadas en el mAb bioOv197 y se rastrearon con mAb Ov185-Eu³⁺ utilizado como marcador. Distintas muestras no pudieron ser discriminadas entre sí. Solo el IT-CA125 mostró deflexión a concentración más alta (500 a 1000 U/ml) debido al efecto de la matriz, ya que la concentración de CA125 en el líquido ascítico de IT fue de solo 904 U/ml.

10 La Figura 4 demuestra que, con la excepción de AAL, no se logró discriminación entre tres orígenes diferentes de CA125 cuando se usaron lectinas marcadas con quelatos de Europio N1 como trazadores. La línea celular OVCAR-3 se usó como fuente de CA125 canceroso (OvCa-CA125), mientras que el líquido amniótico y el homogenato placentario se usaron como fuentes de CA125 normal (AF-CA125 y Pla-CA125, respectivamente). AAL pudo discriminar CA125 derivado de líquido amniótico de CA125 canceroso y placentario. Obsérvense los altos niveles de señales de fondo expuestas en la Tabla 3 para cada una de las lectinas en relación con las señales específicas predominantemente bajas (señal - fondo) que se muestran en el eje Y.

15 La Figura 5 muestra los resultados del ensayo de anticuerpo anti-CA125 – lectina AAL con cuatro muestras clínicas. El CA125 de dos muestras de suero EOC y dos de endometriosis (EOC-1, EOC-2, Endo.1 y Endo.2, respectivamente) fue capturado en mAb bioOv197, así como en la fracción Fab2 del mismo, y se usó como trazador lectina AAL marcada con quelatos Eu³⁺. No se logró ninguna discriminación notable entre EOC y muestras de pacientes con endometriosis.

20 La Figura 6 muestra los resultados del ensayo de anticuerpo anti-CA125 – nanopartículas de lectina. Se capturaron CA125 de cuatro orígenes distintos en cantidades de 5, 50 o 100 U/ml en tampón TSA-BSA, en MAb bio-Ov185. Un panel de lectinas vegetales y humanas inmovilizadas en nanopartículas Eu³⁺ se utilizó como trazadores. Solo MGL-NP discriminó claramente CA125 derivado de OvCa de CA125 de otros orígenes. Las señales de fondo para cada una de las lectinas se muestran en la Tabla 4.

25 La Figura 7 muestra los resultados del ensayo de anticuerpo anti-CA125 – nanopartículas MGL con diferentes anticuerpos de captura biotinilados (Ovk95, Ov185 y Ov197). Se usó MGL-NP marcado con Eu³⁺ como marcador. En cada caso, OvCa-CA125 fue casi 10 veces discriminado de Pla-CA125. Las señales específicas más altas se obtuvieron cuando se usó bioOv185 como anticuerpo de captura.

30 La Figura 8 muestra los resultados del ensayo de MGL-NP en rangos dinámicos más amplios con cuatro orígenes diferentes de CA125. Se usaron CA125 de la línea celular primaria OvCa OVCAR-3 (OvCa-125), homogenato placentario (Pla-CA125) y ascitis de cirrosis hepática (LC-CA125) y teratoma inmaduro (IT-CA125) en una cantidad de 5 a 2000 U/ml (con la excepción de IT-CA125 con concentraciones que varían de 5 a 1000 U/ml). No se observó efecto gancho con concentraciones de CA125 incluso hasta 2000 U/ml.

35 La Figura 9 muestra los resultados del ensayo MGL-NP con muestras de CA125 añadidas en plasma masculino sano agrupado (HP) o en tampón TSA-BSA al 1% (TB). Las señales específicas fueron casi similares con matrices simples como TSA-BSA 1% y usando plasma masculino sano agrupado.

40 La Figura 10 muestra las relaciones de señales específicas obtenidas con el ensayo MGL-NP actual y el inmunoensayo de CA125 convencional. Las muestras de suero EOC (1 - 6) mostraron señales elevadas en comparación con las muestras de suero de mujeres embarazadas (7 - 8) y dos grupos de muestras de endometriosis (9 - 10). Por tanto, el ensayo MGL-NP es capaz de distinguir CA125 relacionado con EOC de CA125 normal o benigno.

45 La Figura 11 A muestra una presentación de Gráfico de Caja (*Box Plot*) de un inmunoensayo HE4 convencional con cinco grupos diferentes de muestras clínicas de suero (mujeres sanas como controles n = 51, etapas de endometriosis 1 - 2 n = 33, etapas de endometriosis 3 - 4 n = 88, casos de progresión/recidiva de EOC n = 43 (progresión de OvCa) y cáncer de endometrio n = 16 (EmCa)). La mediana de cada grupo se muestra dentro de las cajas.

50 La Figura 11 B muestra una presentación Box Plot de un inmunoensayo CA125 convencional con cinco grupos diferentes de muestras clínicas de suero (mujeres sanas como controles n = 51, etapas de endometriosis 1 - 2 n = 33, etapas de endometriosis 3 - 4 n = 88, casos de progresión/recidiva de EOC n = 43 (progresión de OvCa) y cáncer de endometrio n = 16 (EmCa)). La mediana de cada grupo se muestra dentro de las cajas.

La Figura 11 C muestra una presentación Box Plot del ensayo MGL-NP con cinco grupos diferentes de muestras clínicas de suero (mujeres sanas como controles n = 51, etapa de endometriosis 1 - 2 n = 33, etapa de endometriosis 3 - 4 n = 88, casos de progresión/recidiva de EOC n = 43 (progresión de OvCa) y cáncer de endometrio n = 16 (EmCa)). La mediana de EOC es 6, mientras que las medianas de todos los demás grupos son solamente 1.

Las Figuras 12A a 12D muestran presentaciones de Gráfico de Caja que demuestran la discriminación de EOC de la endometriosis benigna y controles sanos utilizando el inmunoensayo de CA125 convencional (Figuras 12A y 12C) y el ensayo de CA125^{MGL} (Figuras 12B y 12D). La Figura 12 muestra que CA125 en EOC seroso de alto grado preoperatorio (n = 21) y endometriosis (n = 121) fueron significativamente mayores que en controles sanos (n = 51) con inmunoensayo convencional de CA125 (p < 0,001). La Figura 12B muestra que no se observaron diferencias significativas entre la endometriosis y los controles sanos en los niveles de CA125^{MGL}, mientras que los niveles de EOC preoperatorios fueron significativamente mayores (p < 0,001). La Figura 12C indica que las muestras de EOC (n = 38) y endometriosis (n = 44) con concentraciones de CA125 marginalmente elevadas (35 - 200 U/ml), que son clínicamente las más difíciles de diagnosticar, no difirieron del inmunoensayo de CA125, mientras que la Figura 12D muestra que los niveles de CA125^{MGL} se mantuvieron significativamente diferentes.

La Figura 13A muestra las curvas ROC para HE4, CA125 y CA125^{MGL}, solas o en combinación, en una cohorte de todos los casos de EOC secuenciales (n = 213) frente a casos de endometriosis (n = 133). El valor más alto de AUC (área bajo la curva) se obtuvo con una combinación de los tres marcadores.

La Figura 13B muestra curvas ROC para HE4, CA125 y CA125^{MGL}, bien sea solas o en combinación en una cohorte de casos de progresión/recidiva de EOC (n = 43) frente a endometriosis (n = 133). El valor más alto de AUC se obtuvo con una combinación de los tres marcadores.

La Figura 13C muestra las curvas ROC para HE4, CA125 y CA125^{MGL}, bien sea solas o combinadas en una cohorte de casos de pretratamiento de EOC (n = 29) frente a endometriosis (n = 133). Todos los marcadores muestran valores altos de AUC, pero el valor más alto de AUC se obtuvo con una combinación de los tres marcadores.

La Figura 14 demuestra que el presente ensayo MGL-NP muestra cambios temporales relativos más precoces y más fuertes que los inmunoensayos HE4 y CA125. Cada panel representa a un paciente diferente y muestra concentraciones relativas de HE4, CA125 y CA125^{MGL} a lo largo del tiempo.

Las Figuras 15A a 15C demuestran que el estatus hormonal no tiene ningún efecto sobre los niveles séricos de CA125^{MGL} y HE4. Las cajas representan controles sanos o pacientes con endometriosis en diferentes etapas del ciclo de medición, como se indica. La línea discontinua horizontal muestra el valor de corte para el marcador en cuestión. Los gráficos de caja para CA125 y HE4 se adaptaron de Hallamaa et al. (Gynecol. Oncol., 2012, 125: 667 - 672). Abreviaturas: prol, prolif, proliferativo; secr, secretor; endo, endometriosis; IA, inmunoensayo.

Descripción detallada de la invención.

La presente descripción se basa en estudios destinados a distinguir el CA125 relacionado con el cáncer de ovario epitelial (EOC) de otras especies de CA125 sobre la base del patrón de glicosilación de CA125. De acuerdo con este objetivo, la presente descripción proporciona medios y métodos para determinar un estado de enfermedad ginecológica en un sujeto que se sospecha que padece o corre el riesgo de padecer dicha enfermedad ginecológica, especialmente para diagnosticar, pronosticar o controlar una enfermedad ginecológica, particularmente una enfermedad ginecológica seleccionada entre el grupo que consiste en EOC, endometriosis y cáncer de endometrio.

Como se usa en el presente documento, el término "o" tiene el significado tanto de "y" como de "o" (es decir, "y/o"). Además, el significado de un sustantivo singular incluye el de un sustantivo plural y, por lo tanto, un término singular, a menos que se especifique lo contrario, también puede llevar el significado de su forma plural. En otras palabras, el término "un" o "uno" puede significar uno o más.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, y lo más preferiblemente una hembra. Dependiendo de una realización en cuestión, dicho sujeto puede sufrir una enfermedad ginecológica con o sin diagnóstico, ser sospechoso de padecer una enfermedad ginecológica, estar en riesgo de dicha enfermedad ginecológica, o haber sido tratado por una enfermedad ginecológica. En algunas realizaciones preferidas, dicha enfermedad ginecológica se selecciona entre el grupo que consiste en EOC, endometriosis y cáncer de endometrio. En algunas realizaciones más preferidas, dicha enfermedad ginecológica es EOC. Aquí, los términos "sujeto humano", "paciente" e "individuo" son indistintos.

Como se usa en el presente texto, el término "muestra" se refiere a una muestra de tejido, tal como una muestra de biopsia tomada de un ovario o del endometrio, y a una muestra de un fluido corporal, tal como fluido ascítico, orina, sangre, plasma, suero y fluido de la cavidad peritoneal, obtenido de un sujeto. En algunas realizaciones, dicha muestra de tejido puede ser una muestra de tejido fijada en formalina o embebida en parafina. En general, la obtención de la muestra a analizar de un sujeto no es parte del presente método para determinar el estado de la enfermedad ginecológica de un sujeto. Una muestra de sangre, suero o plasma es el tipo de muestra más preferido para usar en el presente método y en todas sus realizaciones.

En realizaciones que conciernen a la evaluación del nivel de más de un biomarcador, se pueden usar para cada evaluación muestras iguales o diferentes obtenidas de un sujeto cuyo estado de enfermedad ginecológica se ha de determinar. Dichas muestras diferentes pueden ser del mismo tipo o de un tipo diferente.

Como se usa en este documento, el término "nivel" es intercambiable con los términos "cantidad" y "concentración", a menos que se indique otra cosa.

5 Para determinar si el nivel detectado de un biomarcador es indicativo de la presencia o del riesgo de una enfermedad asociada con dicho biomarcador, debe determinarse su nivel en un control pertinente. Una vez que se conocen los niveles de control, los niveles de marcadores determinados se pueden comparar con ellos y la importancia de la diferencia se puede evaluar utilizando métodos estadísticos estándar. En algunas realizaciones, una diferencia estadísticamente significativa entre el nivel de biomarcador determinado y el nivel de control es indicativo de la enfermedad en cuestión. En algunas realizaciones adicionales, antes de compararlas con el control, se normalizan los niveles de biomarcadores usando métodos estándar.

10 Como se usa en este documento, el término "control" puede referirse a una muestra de control obtenida de un individuo aparentemente sano o de un grupo de individuos aparentemente sanos, o puede referirse a un valor umbral predeterminado, es decir, un valor de corte, que es indicativo de la presencia o ausencia de la enfermedad en cuestión. Los métodos estadísticos para determinar los valores umbral apropiados serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Los valores umbral pueden haberse determinado, en caso necesario, a partir de muestras de sujetos de
15 la misma edad, características demográficas y/o estado de la enfermedad, etc. El valor umbral puede originarse en un solo individuo no afectado por la enfermedad en cuestión o ser un valor agrupado de más de un individuo. Los ejemplos no limitantes de valores umbral predeterminados adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, 35 U/ml para CA125 y 70 pM para HE4, como se acepta generalmente.

20 En las cohortes estudiadas en la parte experimental, casi el 90% de las mujeres sanas mostraron una concentración de CA125^{MGL} por debajo de 2U/ml, mientras que solo 4 entre 51 mujeres sanas evaluadas mostraron una concentración de CA125^{MGL} > 2U/ml. Así pues, en algunas realizaciones el valor umbral predeterminado para CA125^{MGL} puede ser de aproximadamente 2 U/ml a aproximadamente 3 U/ml, por ejemplo, aproximadamente 2 U/ml o aproximadamente 2,8 U/ml. Sin embargo, dependiendo de la sensibilidad y especificidad deseadas, se pueden usar otros valores umbral predeterminados para CA125^{MGL}. Los ejemplos no limitantes de dichos otros valores umbral
25 incluyen cualquier valor que se encuentre dentro de los márgenes de aproximadamente 2 U/ml a aproximadamente 7 U/ml, de aproximadamente 2 U/ml a aproximadamente 6 U/ml, de aproximadamente 2 U/ml a aproximadamente 5 U/ml, y de aproximadamente 2 U/ml a aproximadamente 4 U/ml. Para fines de cribado y otros usos en los que la sensibilidad clínica del ensayo necesita ser maximizada, también se pueden usar valores umbral tan bajos como aproximadamente 0,5 a 2 U/ml, por ejemplo, aproximadamente 1 U/ml o 1,5 U/ml. Por otro lado, en diagnósticos u otras realizaciones donde la especificidad clínica del ensayo necesita ser maximizada, también pueden ser usados valores de umbral tan altos como aproximadamente 5 a 20 U/ml, por ejemplo aproximadamente 10 U/ml o 15 U/ml. Sin embargo, estos márgenes también pueden variar según los detalles de la técnica de detección o los medios para proporcionar MGL con suficiente avidez en el ensayo.

35 En algunas realizaciones, la expresión "muestra de control" se refiere a una muestra obtenida del mismo sujeto cuyo estado de enfermedad ginecológica debe determinarse, pero obtenido en un momento diferente del momento de la determinación del estado de la enfermedad. Los ejemplos no limitantes de estos diferentes momentos o puntos de tiempo incluyen uno o más puntos de tiempo antes del diagnóstico de la enfermedad, uno o más puntos de tiempo después del diagnóstico de la enfermedad, uno o más puntos de tiempo antes del tratamiento de la enfermedad, uno o más puntos de tiempo durante el tratamiento de la enfermedad, y uno o más puntos de tiempo después del
40 tratamiento de la enfermedad. Típicamente, tales muestras de control obtenidas del mismo sujeto se usan cuando el propósito de la determinación del estado de la enfermedad ginecológica es monitorear dicha enfermedad, especialmente para monitorear el inicio de la enfermedad, o el riesgo de desarrollo de la enfermedad, respuesta al tratamiento, recaída de la enfermedad o recurrencia de la enfermedad.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "aparentemente sano" se refiere a un individuo o un grupo de individuos que no muestran signos de una enfermedad en cuestión y, por lo tanto, se cree que no están afectados por dicha enfermedad en cuestión o que se predice que no desarrollarán dicha enfermedad en cuestión.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "indicativo de una enfermedad", cuando se aplica a un biomarcador, se refiere a un nivel que, utilizando métodos estadísticos de rutina que establecen niveles de confianza en un mínimo del 95%, es diagnóstico de dicha enfermedad o una etapa de dicha enfermedad de forma que el nivel detectado se encuentra con una frecuencia significativamente mayor en sujetos con dicha enfermedad o en una etapa de dicha enfermedad que en sujetos sin dicha enfermedad u otra etapa de dicha enfermedad. Preferiblemente, el nivel que es indicativo de una enfermedad se encuentra en al menos el 80% de los sujetos que tienen la enfermedad y se encuentra en menos del 10% de los sujetos que no tienen la enfermedad. Más preferiblemente, el nivel que es indicativo de dicha enfermedad se encuentra en al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o más en sujetos que
55 tienen la enfermedad y se encuentra en menos del 10%, menos del 8%, menos del 5%, menos del 2,5% o menos del 1% de los sujetos que no tienen la enfermedad.

Los inmunoensayos CA125 existentes utilizados en diagnósticos de forma rutinaria se basan en la determinación de los niveles de proteína CA125 en suero o plasma por dos anticuerpos monoclonales diferentes que reconocen

diferentes epítomos proteicos de CA125. Dichos inmunoensayos convencionales, denominados en el presente documento "ensayo de una muestra para la concentración de proteína CA125", están disponibles comercialmente de varios proveedores diferentes. En consecuencia, el término "CA125" se refiere al componente de proteína de CA125 independientemente de su patrón de glicosilación. En general, una concentración sérica de CA125 de 35 U/ml o inferior se considera normal. Sin embargo, las concentraciones de CA125 por encima de este nivel de corte se encuentran con frecuencia en pacientes con afecciones distintas al cáncer de ovario, como la endometriosis, que causa resultados falsos positivos en los diagnósticos de EOC.

De acuerdo con este defecto generalmente aceptado de los inmunoensayos de CA125, no se logró la discriminación entre CA125 epitelial relacionado con el cáncer de ovario y CA125 normal o benigno derivado de homogeneizados placentarios, líquido amniótico, ascitis cirrótica hepática o ascitis relacionada con teratoma inmaduro, como se describe en este documento con más detalle en el Ejemplo 2.

CA125 es una molécula fuertemente glucosilada con abundantes cadenas laterales de glucano unidas en N y unidas en O y un contenido general de carbohidratos de 24% a 28%. Se han sugerido las lectinas, es decir, miembros de una familia bien conocida de proteínas de unión a carbohidratos que son altamente específicas para glucanos dados en base a sus estructuras y secuencias de restos de azúcar, para identificar cambios en la glicosilación de células y tejidos cancerosos.

Por consiguiente, se usó un panel de lectinas vegetales y humanas en un ensayo de tipo sándwich de anticuerpo CA125 - lectina descrito con más detalle en el Ejemplo 3. De acuerdo con los resultados, ninguna de las lectinas empleadas pudo discriminar entre CA125 normal derivado de líquido amniótico o placenta normal y CA125 relacionado con cáncer de ovario derivado de una línea celular de carcinoma primario de ovario llamada OVCAR-3.

Sin embargo, inesperadamente se logró una excelente discriminación entre CA125 relacionado con EOC y no relacionado con EOC con lectina de tipo galactosa de macrófago (MGL) cuando se inmovilizó en una nanopartícula. Como se demostró en el Ejemplo 3, el presente método discrimina el CA125 relacionado con EOC del CA125 normal/benigno con una preferencia mínima de 10 veces sobre el CA125 placentario. La capacidad del presente método para distinguir CA125 relacionado con EOC del CA125 relacionado con el embarazo o la endometriosis se verificó con muestras clínicas de suero. Estos resultados no se limitan al uso de MGL cuando se inmoviliza en una nanopartícula, sino que se aplican a realizaciones, en las que el efecto de avidéz adecuado y la amplificación de señal se obtienen mediante otras técnicas.

Como se usa en el presente documento, el término "CA125^{MGL}" se refiere a una glicofoma de CA125, que se une a MGL, tal como MGL inmovilizado en nanopartículas (MGL-NP), específicamente.

Como se usa en el presente documento, el término "MGL" se refiere a una lectina aislada de tipo galactosa de macrófagos humanos, que es un receptor de lectina de tipo C (CLR) que está presente de forma natural en nuestras células inmunitarias, más específicamente células dendríticas y macrófagos. El MGL humano tiene una especificidad exclusiva para estructuras de GalNAc terminales raras, que se revelan en la mucina MUC1 asociada a tumor. El término "MGL" también abarca MGL fusionado en el extremo C al IgG1-Fc humano (MGL-Fc) de acuerdo con métodos estándar conocidos en la técnica. Tal MGL-Fc está disponible comercialmente. MGL se conoce también con los nombres CD301 y miembro A de la familia 10 del dominio de lectina de tipo C (CLEC10A). El CLEC10A humano recombinante sin ninguna fusión de Fc está disponible comercialmente.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un método para determinar un estado de enfermedad ginecológica en un sujeto analizando una muestra obtenida de dicho sujeto para determinar CA125^{MGL}. El aumento de nivel de CA125^{MGL} en dicha muestra en comparación con el de una muestra de control o un valor umbral predeterminado es indicativo de que dicho sujeto tiene EOC o está en riesgo de tenerlo. Por otro lado, el nivel no aumentado o normal de CA125^{MGL} en dicha muestra en comparación con el de una muestra de control o un valor umbral predeterminado es indicativo de que dicho sujeto es aparentemente sano con respecto a EOC o no está en riesgo de tener o desarrollar EOC. En algunas realizaciones, dicho método puede ser un método para determinar el estado de enfermedad EOC en un sujeto. En algunas de otras realizaciones, dicho método puede ser un método de diagnóstico, pronóstico o monitorización de EOC, en el que la monitorización de EOC abarca, pero no se limita a ello, monitorear el inicio de EOC, monitorear cualquier desarrollo en riesgo de EOC, monitorear la respuesta al tratamiento, monitorear la recaída de EOC y monitorear la recurrencia de EOC.

Sin embargo, el nivel no aumentado o normal de CA125^{MGL} como resultado de la prueba no excluye la posibilidad de que el sujeto cuyo estado de enfermedad ginecológica se va a determinar pueda sufrir o estar en riesgo de sufrir una enfermedad ginecológica distinta de EOC, como endometriosis o cáncer de endometrio. Por otro lado, un sujeto con tal resultado de prueba también puede ser aparentemente sano con respecto no solo a EOC, sino también a endometriosis y cáncer de endometrio. Así pues, si el propósito del presente método es no solo determinar el estado del EOC de un sujeto sino también determinar el estado de enfermedad de un sujeto con respecto a otras enfermedades ginecológicas como la endometriosis o el cáncer de endometrio y, si el nivel de CA125^{MGL} no aumenta en dicha muestra, pueden justificarse pruebas de diagnóstico adicionales para determinar el riesgo de que dicho sujeto tenga una enfermedad ginecológica que no sea EOC. Como se establece a continuación, dichas pruebas adicionales

pueden comprender analizar una muestra obtenida de dicho sujeto también para CA125 y/o HE4 con el fin de determinar el riesgo de que dicho sujeto tenga endometriosis o cáncer de endometrio. Alternativamente, o además, dichas pruebas adicionales también pueden incluir el uso de cualquier método de diagnóstico apropiado disponible en la técnica.

- 5 En algunas realizaciones, el método para determinar un estado de enfermedad ginecológica en un sujeto puede usarse para diagnósticos diferenciales entre EOC y endometriosis o cáncer de endometrio.

10 Como se indicó anteriormente, el nivel de CA125^{MGL} en una muestra puede cuantificarse o analizarse en alguna realización determinando el nivel de unión de CA125 a MGL inmovilizado en nanopartículas (MGL-NP), por ejemplo usando cualquier formato de ejemplo presentado en el presente documento. Aunque la presente descripción se centra en ensayos basados en MGL-NP, también se prevén otras técnicas para determinar el nivel de CA125^{MGL} en la muestra. En otras palabras, las nanopartículas son solo una forma preferida de proporcionar un efecto de avidéz adecuado y la amplificación de señal para llevar a cabo el presente método y sus diversas realizaciones.

15 Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" (NP) se refiere a una partícula, sintética o natural, que tiene una o más dimensiones, por ejemplo un diámetro, de menos de aproximadamente 1000 nm, por ejemplo aproximadamente 500 nm o menos, aproximadamente 100 nm o menos, o aproximadamente 50 nm o menos. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a un margen de valores de $\pm 10\%$ de un valor especificado. Por ejemplo, la frase "aproximadamente 100 nm" incluye $\pm 10\%$ de 100 nm, o de 90 nm a 110 nm. Las nanopartículas pueden tener generalmente una forma esférica pero también se pueden usar formas no esféricas tales como formas elipsoidales. En algunas realizaciones, todas las dimensiones de dicha nanopartícula son menores de aproximadamente 1000 nm, aproximadamente 500 nm o menos, aproximadamente 100 nm o menos, o aproximadamente 50 nm o menos.

20 Se puede utilizar una variedad de materiales diferentes en las presentes nanopartículas. Los ejemplos no limitantes de polímeros adecuados incluyen poli(etilenglicol) (PEG), poliestireno, polietileno, poli(ácido acrílico), poli (metilacrilato de metilo) (PMMA), polisacáridos y copolímeros o combinaciones de los mismos. Otros materiales de nanopartículas adecuados incluyen, pero no se limitan a ellos, oro coloidal, plata, puntos cuánticos, carbono, silicio poroso y liposomas. Otros materiales de nanopartículas adecuados incluyen nanopartículas de proteínas, nanopartículas minerales, nanopartículas de vidrio, cristales de nanopartículas, nanopartículas de metal y nanopartículas de material plástico.

25 Las nanopartículas adecuadas para su uso en el presente método pueden ser directa o indirectamente cualitativa o cuantitativamente detectables por cualquier medio conocido. Por ejemplo, las nanopartículas pueden ser detectables atendiendo a una calidad inherente, como en el caso, por ejemplo, de nanopartículas de conversión ascendente (UCNP), partículas de resonancia, puntos cuánticos y partículas de oro. En algunas otras realizaciones, las nanopartículas pueden hacerse detectables, por ejemplo, mediante marcadores fluorescentes, marcadores bioluminiscentes o marcadores quimioluminiscentes. En algunas de otras realizaciones, el etiquetado o dopaje con lantánidos, es decir, iones de lantánidos luminiscentes con emisión de luminiscencia en longitudes de onda visibles o cercanas al infrarrojo o infrarrojo y larga decadencia de fluorescencia, tales como europio (III), terbio (III), samario (III), disprosio (III), iterbio (III), erbio (III) y neodimio (III), son los medios preferidos para hacer que sean detectables las presentes nanopartículas.

30 En algunas realizaciones no limitantes, las nanopartículas más preferidas son las nanopartículas de poliestireno que tienen un diámetro de 97 nm o 107 nm. Tales nanopartículas están disponibles comercialmente al menos en Thermo Scientific Seradyn Inc.

La MGL se puede inmovilizar en nanopartículas por cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a ello, lo descrito en el Ejemplo 1. Aquí, el MGL inmovilizado en nanopartículas se denomina MGL-NP para abreviar.

35 La unión de CA125 a MGL-NP se puede determinar de diversas formas. En algunas realizaciones, dicha unión se determina mediante un ensayo de tipo sándwich en el que se usa un anticuerpo monoclonal específico de CA125 como agente de captura y MGL-NP como trazador. En algunas otras realizaciones, el ensayo de tipo sándwich puede realizarse usando una vía inversa. En tales casos, MGL-NP se usa como agente de captura y un anticuerpo monoclonal específico de CA125 como marcador. Dado que la orina contiene menos moléculas glucosiladas de interferencia que la sangre, el análisis de tipo sándwich invertido puede funcionar mejor con muestras de orina que con muestras de sangre.

En algunas realizaciones más del presente ensayo de MGL-NP, se puede usar mesotelina, una glucoproteína unida a glucosilfosfatidilinositol, en lugar de un anticuerpo monoclonal específico de CA125 como agente de captura o como marcador.

55 Los ensayos de tipo sándwich de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención pueden llevarse a cabo sobre una superficie sólida, tal como una placa de microtítulo, o en formato de flujo lateral. Los medios y métodos para

5 unir un agente de captura a una superficie sólida, por ejemplo, a través de un complejo de estreptavidina-biotina, o para incorporar un agente de captura a un ensayo de flujo lateral, son conocidos en la técnica y son fácilmente evidentes para una persona experta. Cualquier marcador puede haber sido marcado con una etiqueta detectable, como un quelato de lantánido seleccionado entre europio (III), terbio (III), samario (III) y disprosio (III). En algunas realizaciones específicas, el quelato de europio se usa como marcador detectable. En una realización preferida no limitante, MGL-NP se usa como trazador y se dopa con 30000 quelatos de Eu. En algunas otras realizaciones específicas, el MGL está unido a partículas de fósforo (UCP) de conversión ascendente, que son particularmente adecuadas para su uso como trazadores en el formato de flujo lateral.

10 Se puede usar cualquier anticuerpo monoclonal anti-CA125 en los ensayos de tipo sándwich mencionados anteriormente. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos comerciales anti-CA125 adecuados incluyen Ov185, Ov197 y OvK95, disponibles al menos de Fujirebio Diagnostics, Suecia. Se pueden producir otros anticuerpos monoclonales específicos de CA125 de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

15 Los sustratos adecuados para usar en el presente ensayo MGL-NP incluyen, pero sin limitarse a ellos, vidrio, sílice, aluminosilicatos, borosilicatos, óxidos metálicos tales como alúmina y óxido de níquel, oro, varias arcillas, nitrocelulosa o nylon. En algunas realizaciones, el sustrato puede recubrirse con un compuesto para mejorar la unión del anticuerpo anti-CA125 al sustrato. En algunas realizaciones adicionales, uno o más anticuerpos de control están también unidos al sustrato.

20 Las curvas de Características Operativas del Receptor (ROC) se pueden utilizar para demostrar el equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad de un marcador, como es bien sabido por los expertos en la técnica. La sensibilidad es una medida de la capacidad del marcador para detectar la enfermedad, y la especificidad es una medida de la capacidad del marcador para detectar la ausencia de la enfermedad. El eje horizontal X de la curva ROC representa especificidad 1, que aumenta con la tasa de falsos positivos. El eje vertical Y de la curva representa la sensibilidad, que aumenta con la tasa de verdaderos positivos. Así pues, para un punto de corte particular seleccionado, se pueden determinar los valores de especificidad y sensibilidad. En otras palabras, los puntos de datos en las curvas ROC representan la proporción de clasificaciones de verdadero positivo y falso positivo en varios límites de decisión. Se obtienen resultados óptimos a medida que la proporción positiva verdadera se aproxima a 1,0 y la proporción positiva falsa se aproxima a 0,0. Sin embargo, a medida que se modifica el valor de corte para aumentar la especificidad, la sensibilidad generalmente se reduce, y viceversa.

30 Como se usa en este documento, el término "falso positivo" se refiere al resultado de una prueba que clasifica incorrectamente a un sujeto no afectado como sujeto afectado. Del mismo modo, "falso negativo" se refiere al resultado de una prueba que clasifica incorrectamente a un sujeto afectado como sujeto no afectado.

Como se usa en este documento, el término "verdadero positivo" se refiere al resultado de una prueba que clasifica correctamente a un sujeto que tiene una enfermedad como sujeto afectado. Del mismo modo, "verdadero negativo" se refiere al resultado de una prueba, que clasifica correctamente a un sujeto no afectado como no afectado.

35 De acuerdo con lo anterior, el término "tasa de éxito" se refiere a la proporción expresada en porcentaje de individuos afectados con un resultado positivo, mientras que el término "tasa de falso positivo" se refiere a la proporción expresada en porcentaje de individuos no afectados con un resultado positivo.

40 El área bajo la curva ROC, denominada frecuentemente AUC, es una medida de la utilidad de un marcador en la identificación correcta de los sujetos de la enfermedad. Así pues, el AUC puede usarse para determinar la efectividad de la prueba. Un área de 1 representa una prueba perfecta; un área de 0,5 representa una prueba sin valor. Una guía aproximada tradicional para clasificar la precisión de una prueba diagnóstica o preventiva es la siguiente: los valores de AUC de 0,9 a 1 representan una prueba con una excelente potencia de diagnóstico o pronóstico, los valores de AUC de 0,80 a 0,90 representan una prueba con buena potencia de diagnóstico o pronóstico, los valores de AUC de 0,70 a 0,80 representan una prueba con una potencia de diagnóstico o pronóstico justa, los valores de AUC de 0,60 a 0,70 representan una prueba con escasa potencia de diagnóstico o pronóstico, y los valores de AUC de 0,50 a 0,60 representan una prueba con potencia de diagnóstico o pronóstico fallida.

50 Como se muestra en la parte experimental, dependiendo del grupo de pacientes con EOC empleado (los 213 casos de EOC, 43 casos que representan etapas tempranas de EOC o 29 casos que representan etapas avanzadas de EOC), el presente ensayo MGL-NP pudo distinguir entre EOC y endometriosis con valores de AUC de 0,815, 0,870 o 0,899. La tasa de éxito del presente ensayo MGL-NP en la cohorte clínica que representa etapas precoces de progresión/recidiva de EOC fue del 71,9%.

55 Los valores anteriores mejoraron cuando el ensayo MGL-NP se combinó con el inmunoensayo convencional CA125, que determina la concentración sérica total de la proteína CA125 independientemente de su composición de glicoforina. La tasa de éxito de la determinación combinada de CA125^{MGL} y CA125 en la cohorte clínica que representa las primeras etapas de EOC se mejoró a 81,2%. Por lo tanto, en algunas realizaciones el presente método para determinar el estado de la enfermedad ginecológica de un sujeto puede comprender la determinación de los niveles de CA125^{MGL} y CA125 en una muestra obtenida de dicho sujeto, preferiblemente en una muestra de sangre, más

preferiblemente en suero o plasma. Tal determinación combinada al menos en algunos casos mejoraría la precisión del resultado de la prueba o la confirmaría.

5 La determinación combinada del nivel de CA125^{MGL} y CA125 es particularmente útil para distinguir sujetos que tienen o que están en riesgo de tener EOC y sujetos que tienen o que están en riesgo de endometriosis entre sí, es decir, para el diagnóstico diferencial entre EOC y endometriosis. Esto es al menos en parte porque, aunque tiene una excelente capacidad para detectar CA125 relacionada con EOC, CA125^{MGL} no distingue a los sujetos aparentemente sanos de los que padecen endometriosis, porque la concentración de CA125^{MGL} no aumenta en las muestras obtenidas de sujetos con endometriosis. En otras palabras, el nivel normal o no aumentado de CA125^{MGL} no dice si el sujeto es aparentemente sano con respecto a la endometriosis o si tiene o está en riesgo de tener endometriosis. La concentración de proteína CA125, a su vez, aumenta generalmente tanto en EOC como en la endometriosis. Por tanto, el aumento de la concentración de CA125^{MGL} y CA125 es indicativo de la presencia o el riesgo de EOC, mientras que el nivel no aumentado de CA125^{MGL} con el aumento concomitante de la concentración de proteína CA125 es indicativo de la presencia o el riesgo de endometriosis. Por otro lado, la ausencia de falta de aumento de la concentración tanto de CA125^{MGL} como de CA125 es indicativa de la presencia o del riesgo de EOC ni de endometriosis.

15 En consecuencia, en algunas realizaciones, el presente método para determinar un estado de enfermedad ginecológica puede ser un método para determinar el estado de la enfermedad EOC en un sujeto, tal como un método de diagnóstico, pronóstico o monitoreo de EOC en un sujeto, en donde el método comprende ensayar una muestra obtenida de dicha muestra para CA125^{MGL}, y analizar la misma o una muestra diferente obtenida de dicho sujeto para la concentración de proteína CA125. En dicho método, un mayor nivel de CA125^{MGL} en combinación con una mayor concentración de proteína CA125 sería indicativo de que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener EOC. Por otro lado, un nivel no aumentado o normal de CA125^{MGL} en combinación con una concentración de proteína CA125 no aumentada o normal sería indicativo de que dicho sujeto no tiene o no está en riesgo de tener EOC, es decir, es aparentemente sano con respecto a EOC.

25 En algunas otras realizaciones, el método puede ser un método para determinar el estado de la enfermedad de endometriosis en el sujeto, tal como un método para diagnosticar, pronosticar o controlar la endometriosis, en el que el método comprende ensayar una muestra obtenida de dicha muestra para CA125^{MGL}, y analizar la misma muestra o una muestra diferente obtenida de dicho sujeto para la concentración de proteína CA125. En tal método, el nivel no aumentado de CA125^{MGL} en combinación con el aumento de la concentración de proteína CA125 sería indicativo de que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener endometriosis. Por otro lado, el nivel no aumentado de CA125^{MGL} en combinación con la concentración no aumentada de proteína CA125 sería indicativo de que dicho sujeto no tiene o no está en riesgo de tener endometriosis, es decir, aparentemente es saludable con respecto a la endometriosis.

35 Como se muestra en la parte experimental, el rendimiento del ensayo MGL-NP para distinguir sujetos con EOC de sujetos con endometriosis también se mejoró mediante el uso combinado con un inmunoensayo HE4 convencional. La HE4 (proteína 4 del epidídimo humano) es un biomarcador sérico conocido, que se sobreexpresa en los cánceres de ovario y endometrio. La tasa de éxito de la determinación combinada de CA125^{MGL} y HE4 en la cohorte clínica que representa las primeras etapas de EOC fue mejorado a 93,7%. Por tanto, en algunas realizaciones, el presente método para determinar el estado de la enfermedad ginecológica de un sujeto puede comprender la determinación de niveles de CA125^{MGL} y HE4, preferiblemente en sangre, más preferiblemente en suero o plasma. En cualquiera de las realizaciones del presente método que implican medidas de HE4, los valores umbral predeterminados adecuados para comparar con la concentración de HE4 detectada incluyen, pero sin limitarse a ellos, 70 pM, especialmente para sujetos premenopáusicos o sujetos menores de 50 años, y 90 pM o 140 - 150 pM, especialmente para sujetos postmenopáusicos o sujetos que superan la edad de 50 años.

45 Por consiguiente, en algunas realizaciones la determinación de los niveles séricos de CA125^{MGL} y HE4 se puede usar para determinar el estado de la enfermedad EOC en un sujeto, más específicamente para diagnosticar, pronosticar o controlar el EOC en dicho sujeto. En dicho método, una mayor concentración de CA125^{MGL} y HE4 indicaría la presencia o el riesgo de EOC, mientras que una falta de aumento de la concentración de CA125^{MGL} y HE4 indicaría que dicho sujeto no tiene o no está en riesgo de tener EOC, es decir, es aparentemente sano con respecto a EOC.

50 En algunas otras realizaciones, la determinación de los niveles séricos tanto de CA125^{MGL} como de HE4 puede usarse para el diagnóstico diferencial de EOC y cáncer de endometrio. En tal método, el aumento de la concentración de CA125^{MGL} y HE4 sería indicativo de la presencia o el riesgo de EOC, mientras que la falta de aumento de la concentración de CA125^{MGL} con el aumento concomitante de la concentración de HE4 sería indicativo de la presencia o el riesgo de cáncer de endometrio.

55 En algunas otras realizaciones, la determinación de los niveles séricos tanto de CA125^{MGL} como de HE4 puede usarse para determinar el estado patológico del cáncer de endometrio en un sujeto, más específicamente para diagnosticar, pronosticar o controlar el cáncer de endometrio en dicho sujeto. En dicho método, la falta de aumento de la concentración de CA125^{MGL} con un aumento concomitante en la concentración de HE4 indicaría que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener cáncer de endometrio, mientras que la ausencia de aumento de la concentración de ambos

sujetos, CA125^{MGL} y HE4, indicaría que dicho sujeto no tiene o no está en riesgo de tener cáncer de endometrio, es decir, aparentemente es sano con respecto al cáncer de endometrio.

5 En algunas otras realizaciones, CA125^{MGL}, CA125 y HE4 pueden usarse en combinación para determinar el estado de una enfermedad ginecológica de un sujeto, especialmente en lo que concierne a una enfermedad seleccionada entre EOC, endometriosis y cáncer de endometrio, para diagnósticos diferenciales entre EOC, endometriosis y cáncer de endometrio, y para cualquier propósito de diagnóstico, pronóstico y/o monitoreo relacionados con EOC, endometriosis y cáncer de endometrio.

10 Como se muestra en los ejemplos que siguen, el uso combinado de los tres biomarcadores proporcionó una excelente discriminación de EOC de la endometriosis. Para ser más concretos, se obtuvieron valores de AUC de 0,899, 0,947 y 0,967 en el grupo de muestras de EOC no categorizadas (n = 213), el grupo de muestras de suero que representan las primeras etapas de EOC (n = 43) y el grupo de muestras de suero que representan etapas de EOC avanzadas (n = 29), respectivamente. Por tanto, en algunas realizaciones se proporciona un método para determinar el estado patológico del EOC de un sujeto, tal como un método de diagnóstico, pronóstico o monitoreo de EOC en dicho sujeto, analizando muestras iguales o diferentes para concentraciones de CA125^{MGL}, CA125 y HE4 en dicha muestra. En
15 tales métodos, el aumento concomitante de la concentración de CA125^{MGL}, CA125 y HE4 sería indicativo de que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener EOC. Por otro lado, las concentraciones concomitantemente no aumentadas de CA125^{MGL}, CA125 y HE4 serían indicativas de que dicho sujeto no tiene o no está en riesgo de tener EOC.

20 En algunas otras realizaciones, se proporciona un método para determinar el estado de la endometriosis de un sujeto, tal como un método para diagnosticar, pronosticar o controlar la endometriosis en dicho sujeto, analizando muestras iguales o diferentes para concentraciones de CA125^{MGL}, CA125 y HE4 en dicha muestra. En tales métodos, una mayor concentración de CA125 en combinación con una concentración concomitantemente no aumentada de CA125^{MGL} y HE4 sería indicativo de que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener endometriosis. Por otro lado, las concentraciones concomitantemente no aumentadas de CA125^{MGL}, CA125 y HE4 serían indicativas de que dicho sujeto no tiene o no está en riesgo de tener endometriosis.

25 En algunas formas de realización adicionales, se proporciona un método para determinar el estado del cáncer de endometrio de un sujeto, tal como un método para diagnosticar, pronosticar o controlar el cáncer de endometrio en dicho sujeto, analizando muestras iguales o diferentes de concentraciones de CA125^{MGL}, CA125 y HE4 en dicha muestra. En tales métodos, una mayor concentración de HE4 en combinación con una concentración concomitantemente no incrementada de CA125^{MGL} y CA125 sería indicativo de que dicho sujeto tiene o está en riesgo
30 de tener endometriosis. Por otro lado, las concentraciones concomitantemente no aumentadas de CA125^{MGL}, CA125 y HE4 serían indicativas de que dicho sujeto no tiene o no está en riesgo de tener cáncer de endometrio.

35 Además, se pueden usar diversas realizaciones del presente método para el diagnóstico diferencial entre enfermedades ginecológicas seleccionadas entre el grupo que consiste en EOC, endometriosis y cáncer de endometrio, y otras enfermedades asociadas con dolor abdominal que incluyen, pero no se limitan a ellas, cáncer de colon, colitis ulcerosa, intestino irritable, síndrome del intestino irritable y enfermedad de Crohn.

40 Como se expuso anteriormente, el presente método está dirigido en algunas realizaciones al diagnóstico de una enfermedad ginecológica, que incluye EOC, endometriosis y cáncer endometrial, es decir, determinar si un sujeto tiene o no riesgo de dicha enfermedad ginecológica. Esto también tiene la intención de incluir casos en los que la presencia o el riesgo de la enfermedad ginecológica no se determine finalmente, pero que se justifiquen más pruebas de diagnóstico. En tales realizaciones, el método no es en sí mismo determinante de la presencia o ausencia, o del riesgo de la enfermedad ginecológica en el sujeto, pero puede indicar que se necesitan más pruebas de diagnóstico o que serían beneficiosas. Por tanto, el presente método puede combinarse con uno o más métodos de diagnóstico para la determinación final de la presencia o de la ausencia, o del riesgo de la enfermedad ginecológica en el sujeto. Dichos otros métodos de diagnóstico son bien conocidos por los expertos en la materia.

45 No siendo invasivo y adecuado para analizar muestras de suero, el presente método y sus diversas realizaciones pueden incorporarse fácilmente en un protocolo de cribado de la población para identificar sujetos que tienen o que están en riesgo de tener o desarrollar EOC, endometriosis o cáncer de endometrio. Esto permitiría no solo el diagnóstico precoz de EOC, endometriosis o cáncer de endometrio, sino también la vigilancia activa de la aparición de EOC, endometriosis o cáncer de endometrio en sujetos con mayor riesgo identificado de desarrollar EOC,
50 endometriosis o cáncer de endometrio en el futuro. Además, la detección temprana de EOC, endometriosis o cáncer de endometrio permitiría tratar precozmente la enfermedad cuando las posibilidades de curación son más altas.

55 El presente método y sus diversas realizaciones pueden usarse no solo con fines de diagnóstico, sino también para el pronóstico o la predicción del resultado de una enfermedad ginecológica, incluyendo EOC, endometriosis y cáncer endometrial, o para monitorear la recuperación o supervivencia del sujeto de dicha enfermedad ginecológica, cualquier posible recidiva o recurrencia de la enfermedad o respuesta al tratamiento. En algunas realizaciones, el método comprende monitorear dicho estado de enfermedad ginecológica de dicho sujeto comparando los niveles de unión de CA125 a dicho MGL-NP o la cantidad de CA125^{MGL}, comparando simultáneamente o no los niveles de uno o ambos de HE4 y CA125, en diferentes puntos de tiempo después del diagnóstico de la enfermedad ginecológica en cuestión

y/o antes, durante y después de la intervención terapéutica, por ejemplo, mediante cirugía, radioterapia, quimioterapia, cualquier otro tratamiento terapéutico adecuado, o cualquier combinación de los mismos, para aliviar o curar la enfermedad ginecológica en cuestión. En algunas otras realizaciones, el método comprende determinar que dicho sujeto tiene recidiva o recurrencia de EOC o que está en riesgo de recidiva o recurrencia de EOC, si el nivel de unión de CA125 a dicho MGL-NP o la cantidad de CA125^{MGL} es mayor que en un control o por encima de un valor umbral predeterminado.

En algunas realizaciones, el diagnóstico, pronóstico y/o monitoreo de EOC, como se establece en el presente documento, están abarcados por la expresión "determinar un estado patológico de EOC", ya sea *de novo* o aparición recurrente o sospecha de EOC. Por lo tanto, el presente método puede formularse como método para determinar el estado patológico de EOC en un sujeto sospechoso de sufrir EOC, que comprende analizar el nivel de CA125 que se une a MGL-NP o el nivel de CA125^{MGL} en una muestra obtenida de dicho sujeto, y determinar el estado patológico del EOC en dicho sujeto sobre la base de dicho nivel de CA125 que se une a MGL-NP o dicho nivel de CA125^{MGL}. En otras palabras, el método de diagnóstico, pronóstico y/o monitoreo de EOC en un sujeto sospechoso de sufrir o estar en riesgo de sufrir EOC, puede comprender analizar el nivel de CA125 que se une a MGL-NP o el nivel de CA125^{MGL} en una muestra obtenida de dicho sujeto, y diagnosticando, pronosticando y/o monitoreando EOC en dicho sujeto sobre la base de dicho nivel de CA125 que se une a MGL-NP o dicho nivel de CA125^{MGL}. En tales métodos, el nivel aumentado de CA125 que se une a MGL-NP o el nivel aumentado de CA125^{MGL} en comparación con un control relevante o un valor umbral predeterminado es indicativo de la presencia de EOC o de un riesgo de EOC.

La comparación del nivel de unión de CA125 a MGL-NP o el nivel de CA125^{MGL} en la muestra a analizar con el de un control pertinente o un valor umbral predeterminado puede llevarse a cabo en algunas realizaciones mediante un procesador de un dispositivo informático. Al margen de que el procesador del dispositivo informático se use o no para dicha comparación, el nivel de unión de CA125 a MGL-NP o la cantidad de CA125^{MGL} se determina, al menos en algunas realizaciones, como "aumentado" o "más alto" si el nivel de unión de CA125 a MGL-NP o la cantidad de CA125^{MGL} en la muestra es, al menos aproximadamente, por ejemplo 1,5 veces, 1,75 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces o 30 veces el nivel umbral predeterminado, o el nivel de unión de CA125 a MGL-NP o la cantidad de CA125^{MGL} en la muestra de control. En algunas realizaciones, la diferencia entre el nivel de unión de CA125 a MGL-NP o la cantidad de CA125^{MGL} en la muestra a analizar y el nivel umbral predeterminado, o el nivel de unión de CA125 a MGL-NP o la cantidad de CA125^{MGL} en la muestra de control debe ser estadísticamente significativa para proporcionar un resultado diagnóstico, pronóstico o predictivo adecuado. La concentración "aumentada" de HE4 o CA125 puede definirse en correspondencia, como es evidente para los expertos en la técnica.

La concentración de CA125^{MGL}, CA125 o HE4 en una muestra obtenida de un sujeto cuyo estado de enfermedad ginecológica se va a determinar o a quien se va a diagnosticar, pronosticar o controlar una enfermedad ginecológica, se considera "no aumentada" o "normal" si la concentración detectada de la misma es menor, esencialmente la misma o esencialmente no alterada en comparación con la de una muestra de control pertinente o un valor umbral predeterminado.

En algunas realizaciones, el presente método es particularmente adecuado para el diagnóstico precoz de EOC y la detección precoz de recidiva, recurrencia y progresión de EOC. Del mismo modo, el CA125^{MGL} puede servir como marcador tumoral precoz para el EOC, así como para la recidiva, recurrencia y/o progresión del EOC. Por lo tanto, el presente método y el CA125^{MGL} pueden usarse no solo para fines de diagnóstico, pronóstico y monitoreo, sino también para el cribado de EOC en mujeres asintomáticas o un riesgo de desarrollar EOC.

La presente descripción también proporciona un *kit* para usar en el presente método y sus diversas realizaciones. El *kit* comprende un agente de unión a CA125, tal como un anticuerpo monoclonal anti-CA125 o mesotelina, y nanopartículas en las que se ha inmovilizado MGL. Dicho agente de unión a CA125 o MGL-NP comprende un marcador detectable, y puede haber sido inmovilizado en una superficie sólida, tal como una placa de microtítulo. Diversos detalles y realizaciones del presente método se aplican también al presente *kit*, como entiende fácilmente un experto en la técnica. Por lo tanto, las propiedades y características de las nanopartículas adecuadas, por ejemplo, no se repiten aquí.

En algunas realizaciones, dicho anticuerpo anti-CA125 se ha unido a una superficie sólida, tal como una placa de microtítulo. En algunas formas de realización adicionales, el recubrimiento de estreptavidina de las placas y la biotinylación del anticuerpo se usan para dicha unión. Para lograr lo mismo, los expertos en la técnica disponen fácilmente de formas alternativas.

Opcionalmente, el *kit* puede también comprender un control para comparar con un valor medido de unión de CA125 a MGL-NP. En algunas realizaciones, el control es un valor umbral para comparar con el valor medido.

En algunas realizaciones, el *kit* puede comprender además uno o más reactivos para analizar la concentración de proteína CA125 y/o HE4. Los ejemplos no limitantes de reactivos típicos para analizar la concentración de proteína CA125 incluyen dos agentes de unión a CA125, tales como dos anticuerpos monoclonales anti-CA125, que se unen a diferentes epítopos de proteínas en CA125. Uno de los agentes de unión a CA125 puede ser el mismo que el agente

de unión a CA125 proporcionado para analizar el CA125^{MGL}. Los ejemplos no limitantes de reactivos típicos para analizar la concentración de proteína HE4 incluyen dos agentes de unión HE4, como dos anticuerpos monoclonales anti-HE4, que se unen a diferentes epítopos de proteínas en HE4. Uno de los dos agentes de unión a CA125 o HE4 puede inmovilizarse en una superficie sólida, mientras que el otro agente de unión a CA125 o HE4 puede comprender un marcador detectable.

En algunas otras realizaciones, el *kit* puede comprender también un medio legible por computadora que comprende instrucciones ejecutables por computadora para realizar cualquier método de la presente descripción.

Las realizaciones del *kit* que contienen reactivos para analizar muestras para determinar la concentración de CA125^{MGL} y preferiblemente también para CA125 y/o HE4, también pueden comprender reactivos para analizar dichas muestras para cualquier otro biomarcador, especialmente para uno o más biomarcadores asociados con cualquier otra enfermedad distinta del EOC, endometriosis o cáncer de endometrio, como otras enfermedades ginecológicas o enfermedades asociadas con dolor abdominal bajo. Por lo tanto, el *kit* puede usarse no solo para diagnosticar, pronosticar o monitorear EOC, endometriosis y/o cáncer de endometrio, sino también para diagnosticar, pronosticar o monitorear, por ejemplo, otras enfermedades ginecológicas u otras enfermedades asociadas con el dolor abdominal bajo, dependiendo de la especificidad y sensibilidad del uno o más biomarcadores cuyas concentraciones se van a analizar.

También se proporcionan nanopartículas descritas en el presente documento que comprenden MGL inmovilizado (MGL-NP); una composición que comprende dicho MGL-NP; uso de MGL, dicho MGL-NP, o dicha composición para determinar el estado de una enfermedad ginecológica, especialmente una enfermedad ginecológica seleccionada entre el grupo que consiste en EPC, endometriosis y cáncer de endometrio, en un sujeto; uso de MGL, dicho MGL-NP, o dicha composición para diagnosticar, pronosticar o monitorear una enfermedad ginecológica en un sujeto; uso de MGL, dicho MGL-NP o dicha composición para diagnosticar, pronosticar o monitorear el EOC en un sujeto; uso de MGL, dicho MGL-NP o dicha composición para diagnosticar, pronosticar o monitorear la endometriosis en un sujeto; uso de MGL, dicho MGL-NP o dicha composición para diagnosticar, pronosticar o monitorear el cáncer de endometrio en un sujeto; uso de MGL, dicho MGL-NP o dicha composición para diagnósticos diferenciales de EOC, endometriosis o cáncer de endometrio; uso de MGL, dicho MGL-NP o dicha composición para diferenciar EOC, endometriosis o cáncer de endometrio de otras enfermedades asociadas con dolor abdominal inferior, como cáncer de colon, colitis ulcerosa, enfermedad del intestino irritable, síndrome del intestino irritable y enfermedad de Crohn. En algunas realizaciones, dichos usos de MGL, dicho MGL-NP, o dicha composición pueden requerir el uso simultáneo de reactivos o métodos para la determinación de la concentración de proteína HE4 y/o CA125 para lograr el efecto diagnóstico o pronóstico deseado, o para permitir monitorear el inicio, la progresión, la recidiva o la recurrencia de la enfermedad en cuestión, o la respuesta al tratamiento. Cualquier detalle y aplicación descritos con respecto al presente método y sus realizaciones se aplican a los diversos usos de MGL-NP, aunque los detalles y las aplicaciones no se repitan aquí.

Para una persona experta en la materia será evidente que, a medida que avanza la tecnología, el concepto inventivo puede implementarse de varias maneras. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos a continuación, pero pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos.

Ejemplo 1: Materiales y métodos.

Orígenes de CA125 y muestras clínicas.

Se obtuvo de Fujirebio Diagnostics, Suecia, CA125 purificado a partir de una línea celular de carcinoma primario de ovario (OvCa), OVCAR-3. En los presentes experimentos, dicho antígeno CA125 derivado de OVCAR-3 se usó para representar CA125 maligno porque es el único antígeno estudiado en detalle (clonación, glicosilación, interacciones).

Todas las muestras biológicas fueron proporcionadas por el Departamento de Patología de la Universidad de Turku, Finlandia, con los permisos apropiados y los consentimientos informados de acuerdo con las directrices éticas del Distrito Hospitalario de Finlandia del Sudoeste.

Inicialmente se usaron el líquido amniótico normal y el sobrenadante de homogeneizado placentario como fuentes no malignas (es decir, normales) de CA125. Más tarde, se incluyeron fluidos ascíticos de pacientes con cirrosis hepática (LC) y teratoma inmaduro (cáncer de ovario de línea germinal diferente de EOC; IT) como fuentes adicionales de CA125. El contenido de CA125 en cada muestra se determinó mediante un inmunoensayo convencional de CA125 usando como patrón CA125 derivado de OVCAR-3 purificado.

También se emplearon muestras de suero archivadas (n = 401) con cuatro estatus clínicos diferentes como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Muestras clínicas de suero.

Estado clínico	Número de muestras de suero (n = 401)
Cáncer de ovario epitelial, muestras secuenciales de 68 pacientes	213
Endometriosis (Etapa 1 - 2 y 3 - 4)	121 (Etapa 1 - 2 = 33; Etapa 3 - 4 = 88)
Control sano	51
Cáncer de endometrio	16

Anticuerpos anti-CA125.

Se obtuvieron tres anticuerpos monoclonales anti-CA125 diferentes, a saber, Ov185, Ov197 y OvK95, que detectan diferentes epítomos proteicos de CA125, de Fujirebio Diagnostics (Göteborg, Suecia).

- 5 Para su uso como trazadores, los anticuerpos se marcaron con quelatos Eu^{3+} usando protocolos estándar conocidos en la técnica.

- 10 Para su uso como agentes de captura en fase sólida, los anticuerpos se biotinilaron durante 4 horas a temperatura ambiente (RT) con un exceso molar de 40 veces de isotiocianato de biotina, usando un procedimiento estándar conocido en la técnica. Los anticuerpos biotinilados se purificaron con columnas de filtración en gel NAP-5 y NAP-10 (GE Healthcare, Schenectady, NY, EE. UU.) usando 50 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,75), que contiene 150 mmol/L de NaCl y 0,5 g/L de NaN_3 . Los anticuerpos marcados se estabilizaron con 1 g/L de BSA (Bioreba, Nyon, Suiza) y se almacenaron a +4 °C.

Lectinas.

- 15 Se adquirió un panel de lectinas vegetales en el laboratorio VECTOR y se proporcionaron dos lectinas humanas, a saber, MGL y DC-SIGN, por el VU University Medical Center Amsterdam, Holanda. La parte extracelular de MGL se amplificó en pRc/CMV-MGL con PCR, se confirmó mediante análisis de secuencia y se fusionó en el extremo C al IgG1-Fc humano en el vector Sig-plgG1-Fc. Se produjo MGL-Fc por transfección transitoria de células CHO. En los presentes ejemplos, MGL-Fc se denomina MGL.

Tabla 2. Lectinas empleadas en los presentes experimentos.

Nombre de la lectina	Especificidad de unión a los carbohidratos principales
SBA (aglutinina de soja)	GalNAc α 1-Ser/Thr
SNA (aglutinina de <i>Sambucus nigra</i>)	ácido siálico α 2,6Gal/GalNAc
PNA (aglutinina de cacahuete)	Gal β 1,3GalNAc α 1-Ser/Thr
MAA (lectina I de <i>Maackia amurensis</i>)	ácido siálico α 2,3Gal β 1,4GlcAc
AAL (aglutinina de <i>Aleuria aurantia</i>)	Fuc α 1,6 GlcNAc
UEA (aglutinina de <i>Ulex europeus</i>)	Fuc α 1,2 Glc
PHA-E (aglutinina - eritroaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>)	GalNAc β 1,4 unido al resto β -manosilo del núcleo de trimanosilo
RCA (aglutinina de <i>Ricinus communis</i>)	Gal β 1,4GlcNAc
WGA (aglutinina de germen de trigo)	GlcNAc β 1,4 GlcNAc
WFA (aglutinina de <i>Wisteria floribunda</i>)	GAINac posición α o β - 3 o 6 de galactosa
PSA (aglutinina de <i>Pisum sativum</i>)	α -fucosa ligada a manosa α N-acetilquitobiosa
VVL (lectina de <i>Vicia villosa</i>)	α - o β -GalNAc ligada a serina o treonina en un polipéptido (antígeno Tn)
TJA-II (aglutinina de <i>Trichosanthes japonica</i>)	Fuc α 1-2Gal y β -GalNAc
MGL (lectina de galactosa de macrófagos)	GalNAc unido a serina o treonina en un polipéptido (antígeno Tn)
DC-SIGN	Antígeno de Lewis no sialilado

- 20 Las lectinas se marcaron con quelatos de europio N1 o se inmovilizaron en nanopartículas de poliestireno Fluoro-Max™ modificadas con carboxilo monodispersas, dopadas con quelato de europio, (107 nm de diámetro, contenido de carboxilo 0,157 mEq/g, área de estacionamiento 56,6 Å²) que se obtuvieron de Thermo Scientific Seradyn Inc., Indianápolis, IN). Las nanopartículas empleadas producen una fluorescencia de larga duración equivalente a 30.000 iones quelados por partícula.

- 25 Los grupos amino primarios de las lectinas se acoplaron covalentemente a grupos carboxilo de las nanopartículas activados usando un procedimiento descrito anteriormente con algunas modificaciones menores (Soukka et al., Anal. Chem. 2001, 73, 2254 - 2260). Las nanopartículas (1×10^{12} partículas) se suspendieron en tampón fosfato 10 mmol/L (pH 7,0), y sus superficies se activaron con 0,75 mmol/L de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (Sigma-Aldrich,

5 St. Louis, MO, EE.UU.) y 10 mmol/L de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (Sigma-Aldrich). Las concentraciones de lectinas en las reacciones de acoplamiento fueron 0,625 mg/ml, y las reacciones contenían 100 mmol/L de NaCl. Las partículas activadas fueron mezcladas con las lectinas. Las reacciones de acoplamiento se incubaron durante 2 horas a +23 °C con agitación vigorosa. Los lavados finales y el bloqueo de los grupos activos restantes se realizaron en tampón basado en Tris (10 mmol/L de Tris, 0,5 g/L NaN₃, pH 8,5), y los conjugados de nanopartículas-lectina se almacenaron en el mismo tampón suplementado con 2 g/L BSA a 4 °C. Antes de la primera ocasión de uso, las partículas se mezclaron a fondo, se sonicaron y se centrifugaron ligeramente (350 g, 5 min) para separar los agregados no coloidales de la suspensión monodispersa.

Ensayos de CA125.

10 El tampón de ensayo rojo, el tampón de lavado y las placas de microtítulo de baja fluorescencia recubiertas con estreptavidina usadas en estos experimentos se adquirieron de Kaivogen Oy, Turku, Finlandia.

Los anticuerpos biotinilados en fase sólida (200 ng) se inmovilizaron en pocillos de microtitulación recubiertos con estreptavidina en 100 µL del tampón de ensayo. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente y de agitar a 900 rpm, los pocillos se lavaron dos veces con la solución de lavado y se usaron inmediatamente en los ensayos.

15 A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µL de muestras diluidas (1: 5 en tampón de ensayo), y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Los antígenos CA125 de diferentes orígenes capturados de este modo en los pocillos se usaron en tres formatos diferentes de ensayo de fluorescencia de resolución temporal (TRF) con tres trazadores diferentes etiquetados con Eu³⁺, a saber, mAb Ov185-Eu³⁺ para detectar el epítipo proteico de CA125 y varias lectinas marcadas con Eu³⁺ o nanopartículas de lectina marcadas con Eu³⁺ para detectar el epítipo de glucano de CA125.

20 Para detectar CA125 capturado en fase sólida en un inmunoensayo de CA125 convencional (Ejemplo 2), se añadieron a cada pocillo 200 µL de tampón de ensayo que contenía 25 ng de mAb Ov185-Eu³⁺, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo para el europio (lex: 340 nm; lem: 615 nm) después de agregar una solución de mejora durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación a 900 rpm usando el contador Victor3V 1420 Multilabel.

25 Para detectar CA125 capturado en fase sólida en un ensayo de tipo sándwich anticuerpo anti-CA125 – lectina (Ejemplo 3), se añadieron a cada pocillo 200 µL de tampón de ensayo que contenía 25 ng de Eu⁺³-lectina, y se incubaron durante 1 hora a RT agitando en sacudidora. Se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo para el europio (lex: 340 nm; lem: 615 nm) después de agregar una solución de mejora durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación a 900 rpm usando el contador Victor3V 1420 Multilabel.

30 Para detectar CA125 capturado en fase sólida en un ensayo de tipo sándwich de nanopartículas de anticuerpo anti-CA125 – lectina (Ejemplo 4), se añadieron a cada pocillo 100 µL de tampón de ensayo que contiene 5e6 Eu³⁺ - NPs recubiertos con varias lectinas, con CaCl₂ 6 mM adicional para CLR (DC -SIGN, MGL), y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Después de la incubación, los pocillos se lavaron 6 veces con el tampón de lavado. La fluorescencia resuelta en el tiempo para europio se midió (lex: 340 nm; lem: 615 nm) a partir de pocillos secos usando el contador Victor3V 1420 Multilabel.

Ensayos de HE4 y CA125 para muestras clínicas de suero.

35 Se analizaron las concentraciones de proteína de epidídimo humano (HE4) y de la proteína CA125, en muestras de suero mediante análisis ELISA (Fujirebio Diagnostics Inc., Malvern, PA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2: Inmunoensayo de CA125 convencional.

40 Se usó una combinación de mAb Ov197 biotinilado (como anticuerpo de captura para CA125 en placas de estreptavidina) y mAb Ov185 marcado con Eu³⁺ (como anticuerpo marcador) en un inmunoensayo de fluorescencia con resolución temporal (TRF) DELFIA®. Los mAbs utilizados detectan diferentes epítipos de proteínas en CA125. El principio básico de este inmunoensayo convencional de CA125 se ilustra en la Figura 1A, mientras que los detalles experimentales se dan en el Ejemplo 1.

En primer lugar se analizaron tres muestras diferentes que contienen CA125, a saber, CA125 purificado derivado de OVCAR-3, líquido amniótico (AF) y homogenato placentario (Pla) como se expuso anteriormente.

50 Los resultados mostraron que CA125 de diferentes orígenes dio señales netas casi similares que indican que la cantidad de proteína CA125 en cada muestra era casi la misma (Figura 2). Por lo tanto, el inmunoensayo convencional de CA125 no puede usarse para discriminar CA125 maligno de CA125 normal.

5 A continuación, los resultados anteriores se verificaron en un rango dinámico más grande con otro conjunto de orígenes de CA125. Con este fin, en las placas Ov197 se aplicó CA125 de cuatro orígenes diferentes, es decir, CA125 canceroso de la línea celular OVCAR-3 y CA125 normal/benigno de homogenato placentario (Pla) y dos ascitis de cirrosis hepática (LC) y teratoma inmaduro (IT), en una cantidad que varía de 5 a 2000 U/ml con la excepción de IT-CA125 que se usó en una cantidad que varía de 5 a 1000 U/mL. Se usó Ov185 como trazador para detectar la unión de CA125 de diferentes orígenes a Ov197. Estos resultados confirmaron que el inmunoensayo convencional CA125 no puede usarse para discriminar entre sí CA125 de diferentes orígenes (Figura 3).

Ejemplo 3: Ensayo de tipo sándwich de anticuerpo anti-CA125 – lectina.

10 En estos experimentos, se usaron CA125 de tres orígenes diferentes en cantidades que varían de 10 a 100 U/mL en TSA-BSA al 1%. Se capturó el CA125 en el anticuerpo anti-CA125 Ov185 biotinilado. Se usó un panel de lectinas vegetales marcadas con Eu³⁺ así como lectinas humanas como trazadores, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1B y se describe en detalle en el Ejemplo 1. La mayoría de las reacciones mostraron fondos altos en relación con las señales específicas predominantemente bajas.

15 La Figura 4 muestra que ninguna de las lectinas empleadas pudo discriminar entre CA125 no maligno y CA125 derivado de EOC. El fondo más bajo se obtuvo con MGL pero las señales netas de las reacciones con CA125 fueron muy escasas. Las señales de fondo para cada una de las lectinas empleadas se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3.

Quelatos lectina-Eu	Señales de fondo (cuentas)
WFA	2066
PHA E	1918
PNA	50479
MGL	248
SNA	844
MALII	5624
AAL	11747

20 Por otro lado, AAL (lectina del hongo *Aleuria amantia*) pudo reaccionar con CA125 derivado de líquido amniótico pero no con CA125 canceroso o placentario. Para probar si AAL podría usarse o no para identificar CA125 benigno en pacientes con endometriosis, se emplearon cuatro muestras clínicas de suero, dos de pacientes con EOC y dos de pacientes con endometriosis. Como se muestra en la Figura 5, AAL no puede usarse para discriminar el CA125 derivado de EOC del CA125 derivado de endometriosis. Se usaron fracciones Fab de los anticuerpos de captura en un intento de reducir las señales de fondo, pero no se logró una mejora significativa.

Ejemplo 4: Ensayo de tipo sándwich de anticuerpo anti-CA125 – nanopartículas de lectina.

25 Dado que el marcado directo de quelato de Eu de las lectinas no discriminaba entre los diferentes orígenes de CA125, las lectinas se inmovilizaron en nanopartículas dopadas con Eu³⁺ como se describe en el Ejemplo 1, para mejorar la afinidad funcional (efecto de avidéz). Se observó que dos características en particular de las nanopartículas contribuyen a la mejora de los resultados: 1) amplificación de señal proporcionada por 30.000 quelatos en una partícula de 107 nm, y 2) el refuerzo de la afinidad funcional de las lectinas a sus epítomos diana a través del efecto de avidéz proporcionado por la alta densidad de lectinas inmovilizadas en la partícula.

35 En estos experimentos, se utilizaron cuatro fuentes diferentes de CA125, a saber, CA125 derivado de OVCAR-3 purificado (150900 U/mL), homogenato placentario (Pla), líquido ascítico de cirrosis hepática (LC) y líquido ascítico de teratoma inmaduro (IT). A continuación, se analizaron de 5 a 100 U/mL de CA125 de las cuatro fuentes diferentes añadidas en TSA-BSA usando un ensayo de tipo sándwich de anticuerpo – nanopartículas de lectina. El mAb Ov185 biotinilado se usó como anticuerpo de captura, mientras que las nanopartículas dopadas con quelato de Eu se cargaron con varias lectinas vegetales diferentes, a saber, WGA, WFA, SNA, PHAE, SBA, AAL, UEA, MAA, RCA, PSA, VVL, TJA o PNA, o receptores de lectina de tipo C humanos (CLR), a saber, MGL y DC-SIGN, se utilizaron como trazadores.

40 Como se muestra en la Figura 6, solamente las nanopartículas MGL de lectina humana mostraron una especificidad mejorada para el CA125 derivado de EOC. La señal neta con CA125 derivado de EOC fue de 10 a 12 veces más alta que con CA125 derivado de homogenato placentario (Pla-CA125). Se obtuvo una señal neta insignificante con CA125 derivado de cirrosis hepática (LC-CA125) y con CA125 derivado de teratoma inmaduro (IT-CA125). Las señales de fondo para cada una de las lectinas empleadas se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4.

Lectina recubierta en Eu-NP	Señales de fondo (cuentas)
MGL	217
DC-SIGN	416
PHA-E	30044
SBA	128
WGA	4230
SNA	758
PNA	959
WFA	4369
PSA	1642
VVL	6659
RCA	359
TJA	834
MAA	3796

5 WGA mostró cuatro veces más señales netas con LC-125 e IT-CA125 que con CA125 derivado de EOC o placentario, mientras que SNA, PHA-E, PNA, VVL y DC-SIGN mostraron reactividad solamente con CA125 placentario (Figura 6). Los resultados indican que ninguna de estas lectinas es adecuada para discriminar el CA125 relacionado con EOC del CA125 normal o benigno.

A continuación, los tres mAbs anti-CA125 (Ov185, Ov197 y OvK95) fueron comparados como agentes de captura para CA125 en el ensayo de nanopartículas MGL. Ov185 dió las señales netas más elevadas, así como la relación señal/fondo (S/B) con una discriminación muy buena entre el antígeno CA125 derivado de OvCa y el normal/benigno. Se estimó que el límite de detección analítica era menor que 5 U/mL para CA125 derivado de OvCa (Figura 7).

10 No se observó efecto gancho aunque en el ensayo MGL-NP se usaron concentraciones muy altas de CA125 (Figura 8). Este es un importante resultado que indica que no se obtendrán resultados falsos negativos con el presente método debido a las altísimas concentraciones de CA125 en una muestra a analizar.

Ejemplo 5: Adecuación de las muestras de sangre para el ensayo de tipo sándwich de anticuerpo anti-CA125 – nanopartículas de lectina.

15 Después de la buena separación del CA125 derivado de OvCa del CA125 de otros orígenes con el presente ensayo NP de MGL-Fc en matrices simples/tampón (TSA-BSA 1%), se determinó el valor de recuperación del mismo en matrices complejas como suero/plasma humano. Para este propósito, se añadieron de 5 a 100 U/mL de CA125 de diferentes orígenes en paralelo en plasma masculino sano reunido o bien en tampón simple (TSA-BSA 1%) y se capturaron en el mAb Ov185 biotilado en placas de microtítulo de estreptavidina y, después del lavado, finalmente se rastrearon con MGL-Fc NPs para ver la tasa de recuperación. Se logró una excelente recuperación de casi 95 a 20 110%, indicando que los componentes plasmáticos inherentes no interfieren con el presente ensayo de nanopartículas de MGL-Fc (Figura 9).

Ejemplo 6: Análisis de muestras clínicas.

25 Para probar si los resultados obtenidos con el antígeno CA125 basado en la línea celular OVACAR-3 podían traducirse al contexto clínico, se analizó una pequeña cohorte de muestras clínicas junto con el presente ensayo MGL-NP y el inmunoensayo CA125 convencional. La cohorte incluyó muestras de suero de pacientes con EOC (n = 12) y mujeres embarazadas sanas (n = 2), así como muestras de suero agrupadas de pacientes con endometriosis (n = 2). Las relaciones de señal obtenidas con los dos métodos indicaron claramente que las muestras clínicas de EOC se pueden distinguir de las muestras clínicas de endometriosis (Figura 10). Para validar los resultados en una cohorte más grande y comparar el poder diagnóstico de CA125^{MGL} con el marcador de proteína CA125 convencional y HE4, se emplearon 30 varias muestras de suero clínico archivadas (n = 401). Las concentraciones en suero de HE4, se evaluó proteína CA125 y CA125^{MGL} en 213 muestras secuenciales de 68 pacientes con cáncer de ovario, y se compararon con los resultados obtenidos en 121 pacientes con endometriosis, 16 pacientes con cáncer de endometrio y 51 mujeres sanas como controles (Tabla 1). Todos los casos de EOC provenían de etapas avanzadas de la enfermedad, pero 43 35 muestras de suero de 32 casos de EOC individuales pertenecían a una etapa de progresión/recidiva de la enfermedad. Estas muestras de suero de progresión/recidiva (n = 43) se consideraron como imitaciones de las primeras etapas de la enfermedad y, por lo tanto, se trataron como grupo separado de muestras clínicas en algunos de los análisis realizados.

Análisis del Gráfico de Caja.

40 Los análisis de Gráficos de Caja de cinco grupos distintos de muestras clínicas (control sano n = 51, etapas de endometriosis 1 - 2 n = 33, etapas de endometriosis 3 - 4 n = 88, casos de progresión/recidiva de EOC n = 43 y cáncer de endometrio n = 16) con respecto a su contenido de proteína HE4, el contenido de proteína CA125 (convencional)

y el contenido de glicofoma CA125^{MGL} se muestran en las Figuras 11 A a 11 C. De acuerdo con los resultados, el contenido de HE4 fue elevado en el grupo de EOC y, en menor medida, también en el grupo de cánceres de endometrio. El contenido de proteína CA125 convencional fue elevado en el grupo de progresión/recidiva de EOC en comparación con los grupos de controles sanos y cánceres de endometrio, pero el contenido de proteína CA125 se solapaba con el grupo de etapas de endometriosis 3 - 4. El contenido de CA125^{MGL}, a su vez, se elevó solo en el grupo de progresión/recidiva de EOC en comparación con todos los demás grupos. En conjunto, estos resultados indican que, de los marcadores estudiados, solo CA125^{MGL} puede usarse con éxito para distinguir los casos clínicos de EOC de los otros grupos de casos.

En otra serie de análisis del Gráfico de Caja, el ensayo de CA125^{MGL} se aplicó al análisis de muestras de suero de individuos sanos (n = 51) y los pacientes con endometriosis (n = 121) y con EOC seroso de alto grado (n = 21), y los comparó con los valores convencionales del inmunoensayo CA125. Los valores mediana de CA125 preoperatorios en muestras de suero de controles sanos, pacientes con endometriosis y pacientes con EOC fueron 6,4, 24,9 y 700 U/mL, respectivamente (Figura 12A), mostrando concentraciones significativamente elevadas tanto en endometriosis como en EOC en comparación con los controles sanos. En cambio, los valores mediana de CA125^{MGL} preoperatorios (Figura 12B) no difirieron significativamente entre los controles sanos (0,486 U/mL) y los pacientes con endometriosis (0,841 U/ml; p = 0,073). En el grupo de EOC, la mediana de CA125^{MGL} fue de 37,93 U/mL, 45 veces mayor que en la endometriosis. Además, se estudiaron muestras de suero de pacientes con endometriosis (n = 44) y EOC (n = 38) con valores de CA125 marginalmente elevados (35 - 200 U/mL) para evaluar la discriminación entre afecciones malignas y benignas mediante el inmunoensayo de CA125 convencional y el ensayo de CA125^{MGL} (Figuras 12C y 12D). Como se pone de evidencia en la Figura 12D, el ensayo de CA125^{MGL} proporcionó niveles significativamente más altos (6,1 veces, valor p < 0,001) en las muestras de suero de EOC en comparación con los medidos en los pacientes con endometriosis. Por otro lado, la diferencia entre controles sanos y pacientes con endometriosis se redujo significativamente. Se observó una diferencia de 8,3 veces (p < 0,001) con el ensayo convencional, mientras que se observó una diferencia de 2,5 veces alcanzando aún significación (p = 0,005) con el ensayo CA125^{MGL}.

Curva ROC y análisis de AUC (área bajo la curva).

Los análisis de la curva ROC para discriminar la endometriosis (n = 121) de todos los casos de EOC secuenciales (n = 213), o los casos de EOC de progresión/recidiva (n = 43), o bien de los casos de EOC preoperatorio avanzado (n = 29) se realizaron con respecto a HE4, CA125 y CA125^{MGL}, bien sea solos o en combinación. Las curvas ROC se muestran en las Figuras 13A a 13C, mientras que los valores de AUC obtenidos se resumen a continuación.

Tabla 5. Valores de AUC obtenidos del análisis ROC realizado para la discriminación de endometriosis (n = 121) de todos los casos de EOC secuenciales (n = 213).

Marcador	AUC
HE4	0,876
CA125	0,776
CA125 ^{MGL}	0,815
Combinación de los tres marcadores	0,899

Tabla 6. Valores de AUC obtenidos del análisis de ROC realizado para la discriminación de endometriosis (n = 121) de los casos de EOC de progresión/recidiva (n = 43).

Marcador	AUC
HE4	0,928
CA125	0,759
CA125 ^{MGL}	0,870
Combinación de los tres marcadores	0,947

Tabla 7. Valores de AUC obtenidos del análisis de ROC realizado para la discriminación de endometriosis (n = 121) de casos de EOC preoperatorios (n = 29).

Marcador	AUC
HE4	0,941
CA125	0,959
CA125 ^{MGL}	0,889
Combinación de los tres marcadores	0,967

En los dos primeros análisis, el valor de AUC para HE4 fue mayor que para CA125 o CA125^{MGL} debido a la falsa positividad insignificante en la endometriosis con HE4 (FP = 2,5%). Los valores de FP correspondientes para CA125 y CA125^{MGL} en endometriosis son 37,2% y 7,4%, respectivamente.

En el último análisis, que concernía a muestras de suero preoperatorias, es decir, muestras que representan etapas avanzadas de EOC, el valor de AUC para CA125 fue el más alto. Este resultado está de acuerdo con el valor de diagnóstico conocido de CA125, particularmente en EOC avanzado.

5 En cada análisis de AUC, el valor de AUC obtenido con una combinación de los tres marcadores fue mayor que el de cualquier marcador individual.

Evaluación de las tasas de éxito.

10 Se determinaron las tasas de éxito de los marcadores HE4, CA125 y CA125^{MGL}, bien sea solos o en combinaciones pareadas, con respecto al grupo de enfermedad de los casos de progresión/recidiva (n = 32, la primera muestra secuencial de cada paciente de progresión/recidiva individual). Cada muestra de suero se clasificó como negativa o como positiva para cada marcador utilizando los siguientes valores de corte: 35 IU/mL para CA125, 70 pM para HE4 y 2 IU/mL para CA125^{MGL}.

Serie de tablas 8. Distribución de muestras de suero (n = 32) basándose en la positividad o negatividad de su marcador.

	HE4				CA125				HE4		
CA1		+	-	CA1		+	-	CA1		+	-
	+	13	7		+	17	6		+	14	9
	-	8	4		-	3	6		-	7	2

	Nº positivo (%)	Nº positivo (%)	Nº positivo (%)
HE4	21 (65.6)	-	21 (65.6)
CA125	20 (62.5)	20 (62.5)	-
CA125^{MGL}	-	23 (71.9)	23 (71.9)
Combinación	28 (87.5)	26 (81.2)	30 (93.7)

15 Estos resultados indican que la tasa de éxito de CA125^{MGL} para identificar los casos precoces de EOC como individuos afectados puede mejorar de 71,9% a 81,2% e incluso a 93,7% cuando se usa en combinación con CA125 y HE4, respectivamente.

Análisis longitudinales.

20 Se determinaron los cambios relativos de concentración (concentración/corte) de HE4, CA125 y CA125^{MGL} en muestras de suero secuenciales de casos de EOC bajo progresión de la enfermedad (n = 29). Todos los pacientes fueron tratados por enfermedad diseminada, con cirugía y quimioterapia, y estaban bajo vigilancia de la progresión de la enfermedad. Todos los pacientes tuvieron una respuesta inicial al tratamiento significativa enjuiciada por la reducción de los valores de CA125 y por los criterios de respuesta radiológica, pero experimentaron una progresión verificada de la enfermedad durante el seguimiento. Se incluyeron muestras con niveles positivos bajos, pero se excluyeron del análisis las fases altas de tratamiento preoperatorio/precoc. Los valores de corte utilizados HE4, CA125 y CA125^{MGL} fueron 70 pM, 35 U/mL y 2 U/mL, respectivamente.

30 Los resultados mostraron que en el 69% de los casos (20/29) el nivel de CA125^{MGL} aumentó con más intensidad que los otros dos marcadores tras la progresión de la enfermedad. Además, CA125^{MGL} mostró un aumento más precoz que HE4 y CA125 en el 31% de los casos (9/29). Por lo tanto, los médicos podrían ser avisados mucho antes de una posible recidiva si se usara CA125^{MGL} para controlar a los pacientes bajo tratamiento por EOC. La mediana de la concentración de CA125^{MGL} en muestras obtenidas en la progresión de EOC, o justo antes de ella, fue de 7,97 U/mL. Algunos ejemplos de los análisis longitudinales realizados se muestran en la Figura 14.

Ejemplo 7: Efecto del estatus hormonal en los niveles de CA125^{MGL} en suero.

35 Las muestras de suero de mujeres pre-menopáusicas sanas y mujeres con endometriosis analizadas precocemente para CA125 y HE4 (Hallamaa et al., Gynecol. Oncol., 2012, 125: 667 - 672) se analizaron ahora para CA125^{MGL} mediante el presente ensayo MGL-NP. Los resultados indican que los ensayos de CA125^{MGL} y HE4 se pueden llevar a cabo en cualquier fase del ciclo menstrual e independientemente de la medicación hormonal sin distorsión de los resultados (Figuras 15A y 15C, respectivamente). Este hallazgo extiende la aplicabilidad de estos dos marcadores en la práctica clínica. Por otra parte, el ensayo convencional de CA125 indicó diferencias significativas entre las diferentes etapas del ciclo menstrual (Figura 15B).

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un estado de enfermedad ginecológica en un sujeto, comprendiendo dicho método:
 - 5 analizar una muestra obtenida de dicho sujeto para determinar el nivel de CA125 que se une a la lectina de tipo galactosa de macrófagos (CA125^{MGL}), determinando la unión de CA125 a MGL,
 - comparar el nivel de CA125^{MGL} detectado en dicha muestra con el de una muestra de control o un valor umbral predeterminado, y
 - determinar el estado de la enfermedad ginecológica en dicho sujeto sobre la base de dicha comparación,
 - 10 en donde la enfermedad ginecológica se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de ovario epitelial (EOC), endometriosis y cáncer de endometrio.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el aumento de nivel de CA125^{MGL} en dicha muestra, comparado con una muestra de control o un valor umbral predeterminado indica que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener cáncer de ovario epitelial (EOC).
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde el método comprende además analizar una muestra
 - 15 obtenida de dicho sujeto para determinar la concentración de proteína CA125 y comparar la concentración detectada de proteína CA125 con la de una muestra de control o un valor umbral predeterminado.
4. El método según la reivindicación 3, en donde el aumento de la concentración de proteína CA125 en combinación con el aumento de nivel de CA125^{MGL} indica además que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener EOC.
5. El método según la reivindicación 3, en el que el aumento de la concentración de proteína CA125 en
 - 20 combinación con la ausencia de aumento del nivel de CA125^{MGL} indica que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener endometriosis.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el método comprende además
 - 25 analizar una muestra obtenida de dicho sujeto para determinar la concentración de proteína HE4, y comparar la concentración de proteína HE4 detectada con la de una muestra de control o un valor umbral predeterminado.
7. El método según la reivindicación 6, en el que el aumento de la concentración de proteína HE4 en combinación con el incremento de nivel de CA125^{MGL} indica además que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener EOC.
8. El método según la reivindicación 6, en el que el aumento de la concentración de proteína HE4 en
 - 30 combinación con la ausencia de aumento del nivel de CA125^{MGL} indica que dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener cáncer de endometrio.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el diagnóstico diferencial de una enfermedad ginecológica seleccionada entre el grupo que consiste en EOC, endometriosis o cáncer de endometrio.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para diagnosticar, pronosticar o controlar una
 - 35 enfermedad ginecológica seleccionada entre el grupo que consiste en EOC, endometriosis o cáncer de endometrio.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el nivel de CA125^{MGL} se determina analizando el nivel de CA125 que se une a MGL inmovilizada en una nanopartícula (MGL-NP).
12. Un *kit* para su uso en el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:
 - 40 un agente de unión de CA125, y
 - una MGL inmovilizada en nanopartículas,

en donde dicho agente de unión de CA125 o dicha MGL inmovilizada en nanopartículas comprende un marcador detectable.
13. El *kit* según la reivindicación 12, que comprende además uno o más reactivos para el análisis de la concentración de proteína CA125.
14. El *kit* según la reivindicación 12 o 13, que comprende además uno o más reactivos para analizar la
 - 45 concentración de HE4.

15. El uso de MGL inmovilizada en nanopartículas (MGL-NP) para determinar un estado de enfermedad ginecológica en un sujeto ensayando una muestra obtenida de dicho sujeto para determinar el nivel de CA125 que se une a la MGL, en donde la enfermedad ginecológica se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de ovario epitelial (EOC), endometriosis y cáncer de endometrio.

5

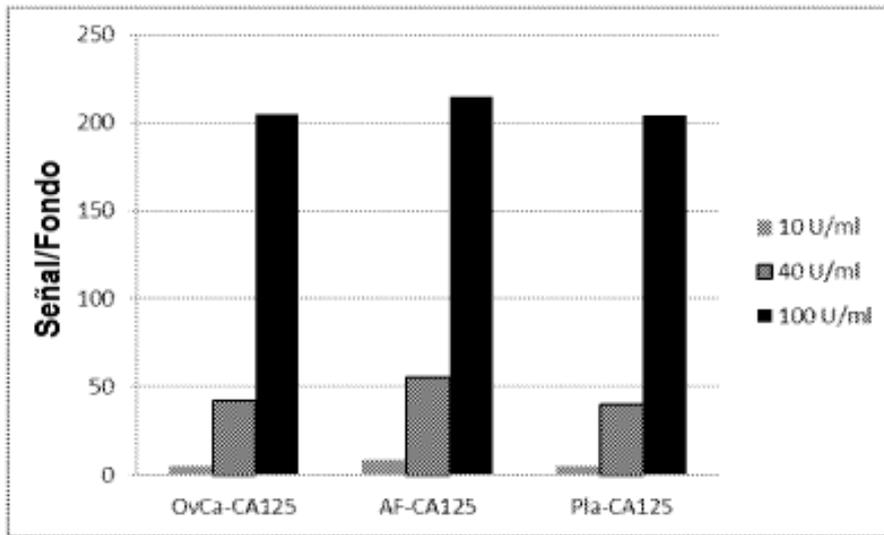


Figura 2

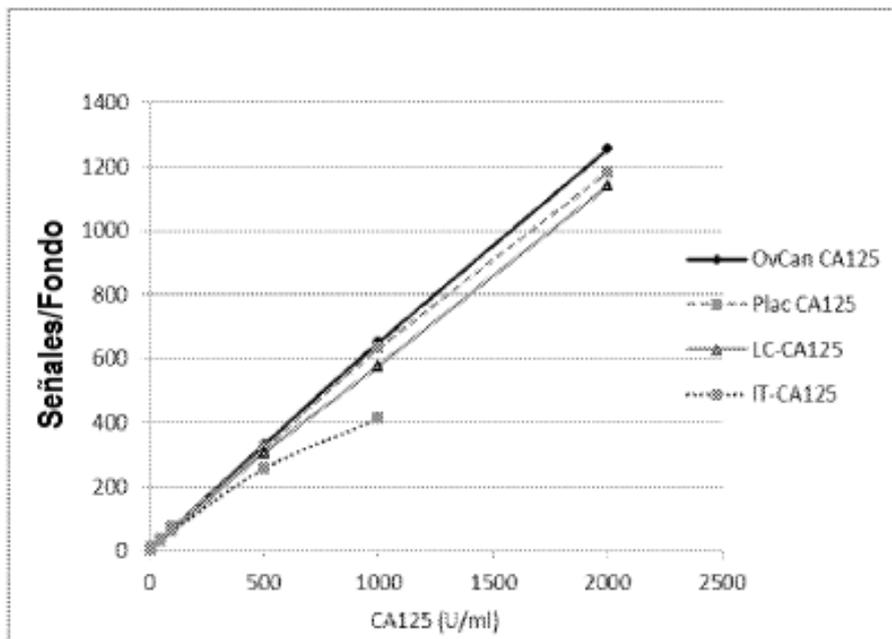


Figura 3

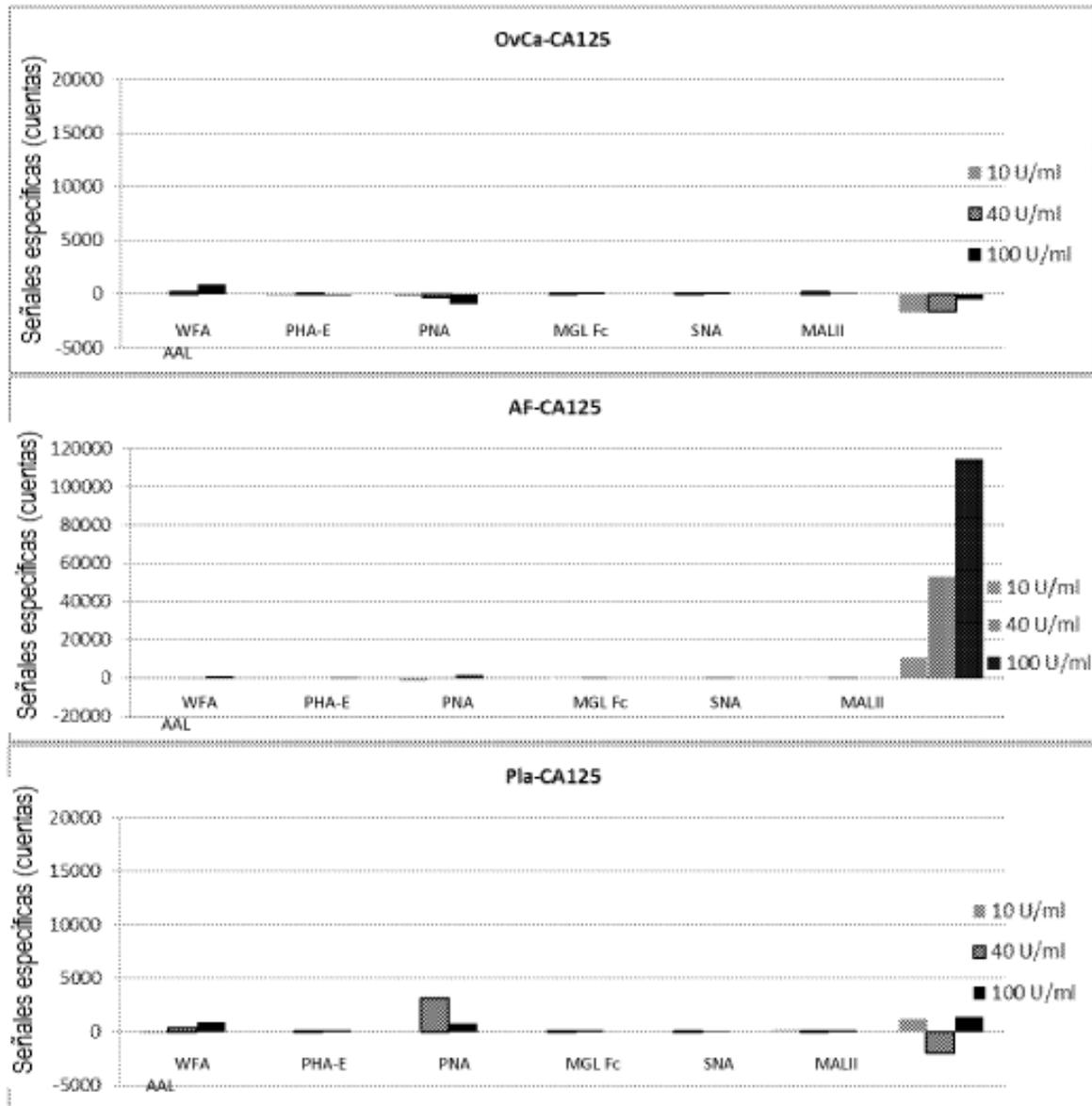


Figura 4

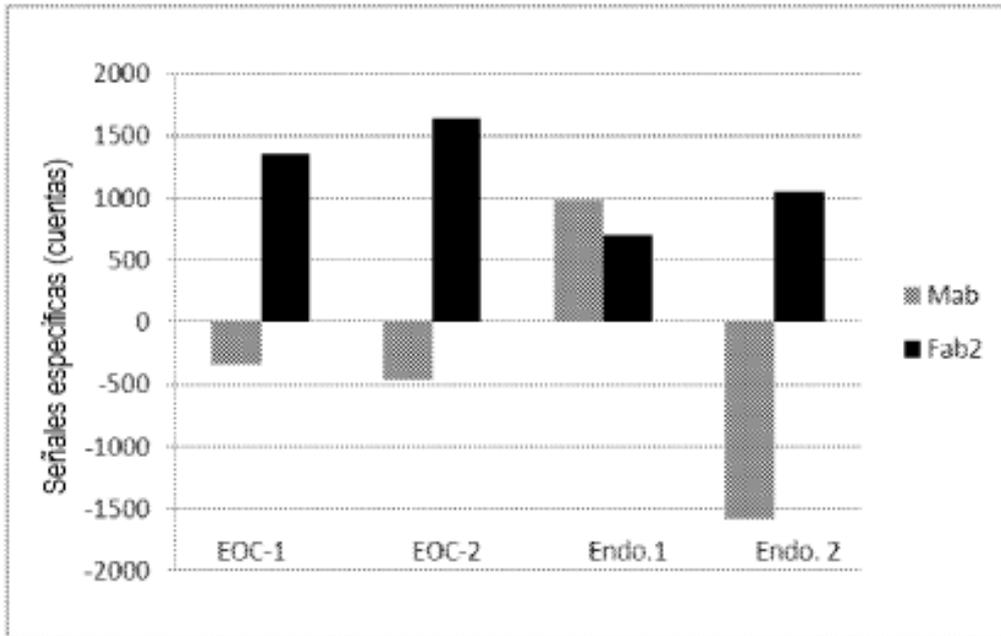


Figura 5

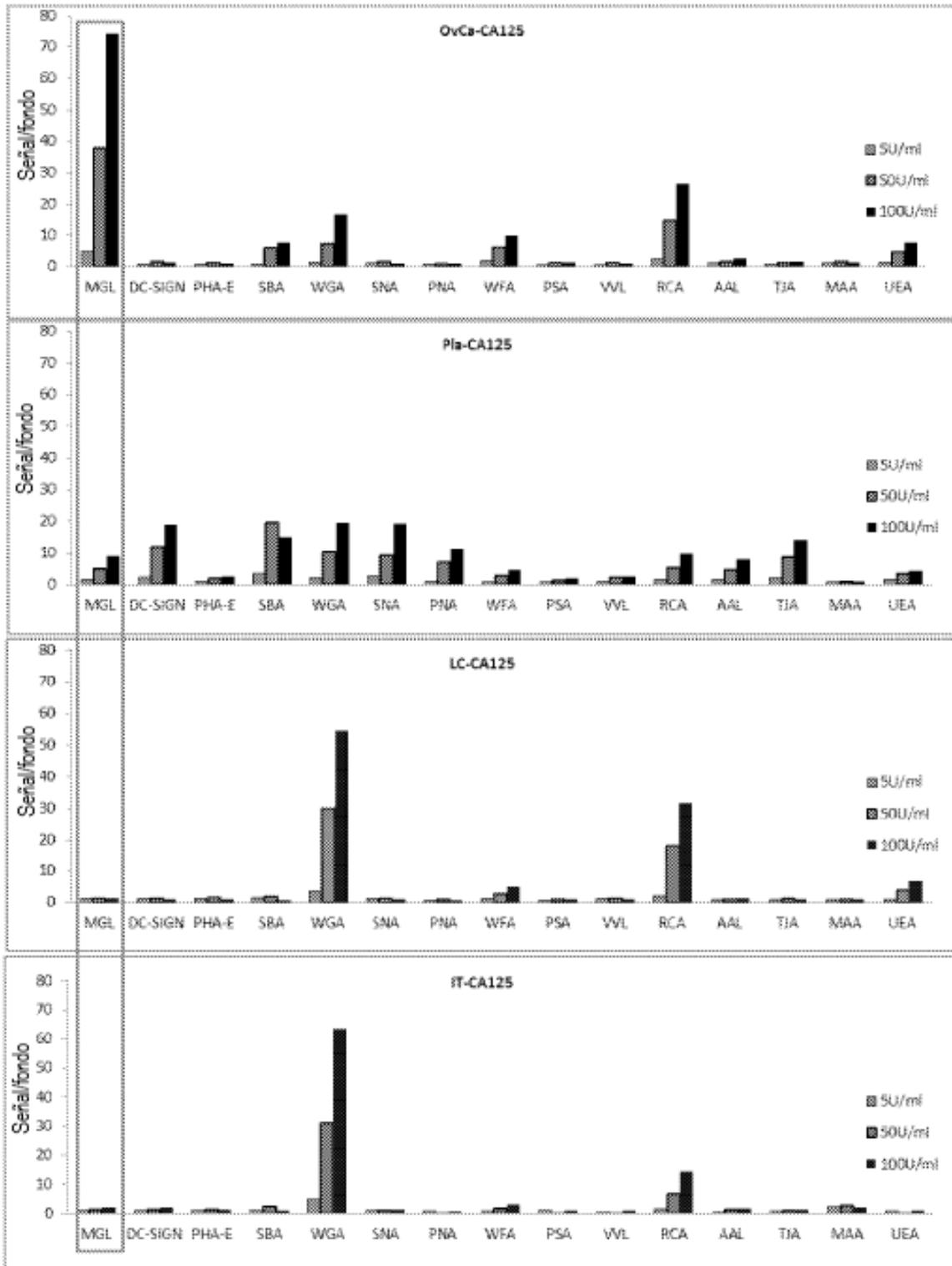


Figura 6

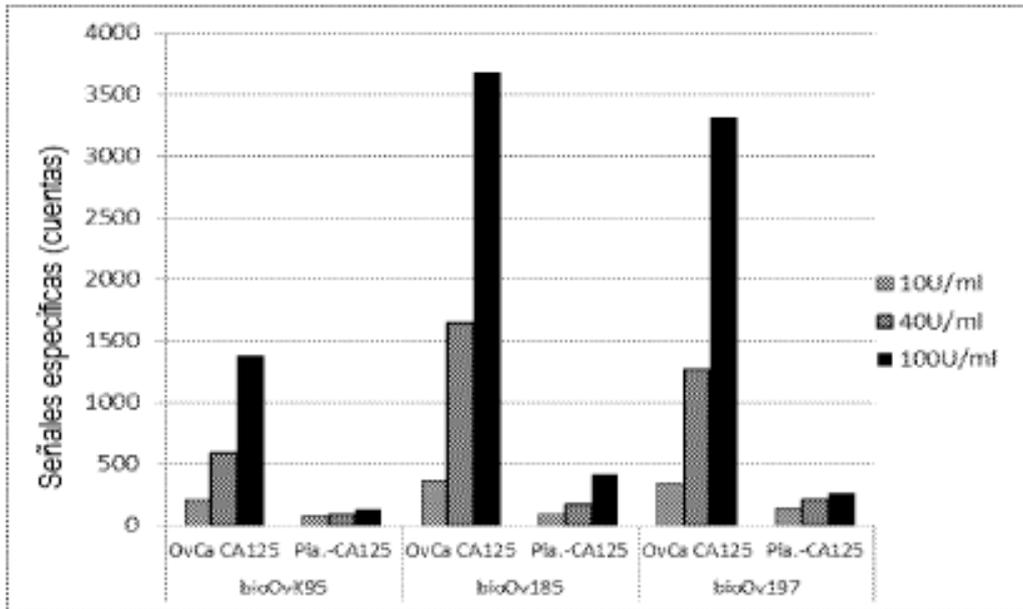


Figura 7

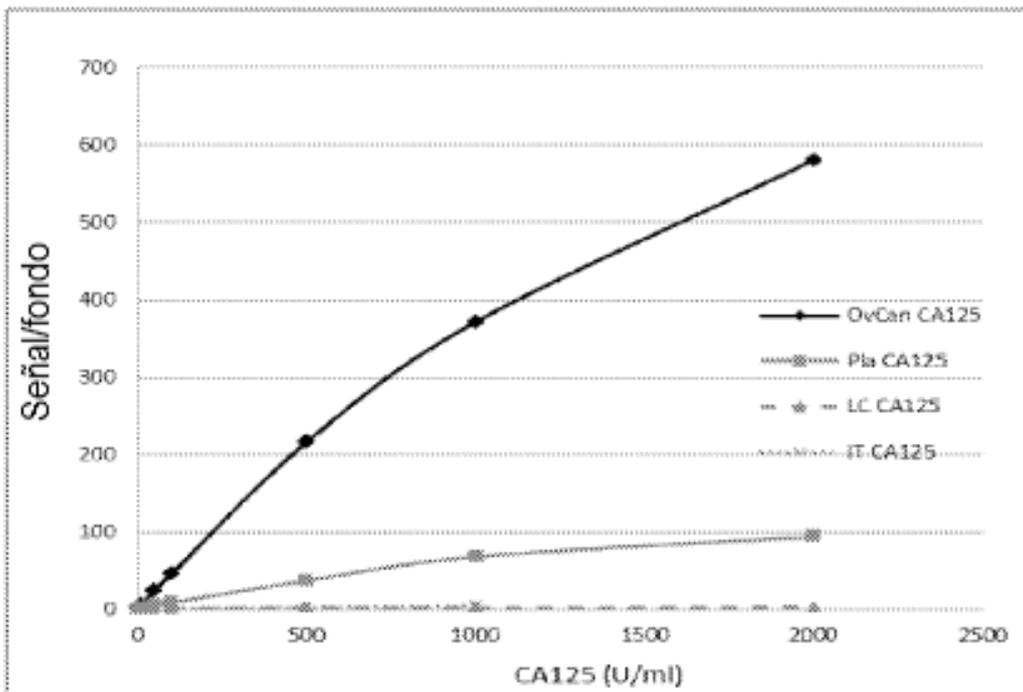


Figura 8

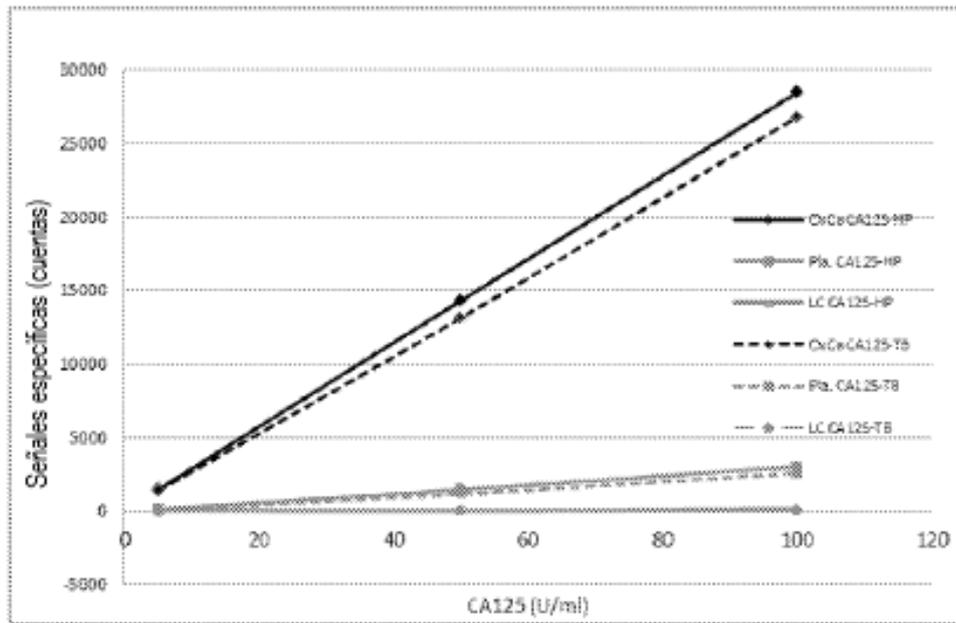


Figura 9

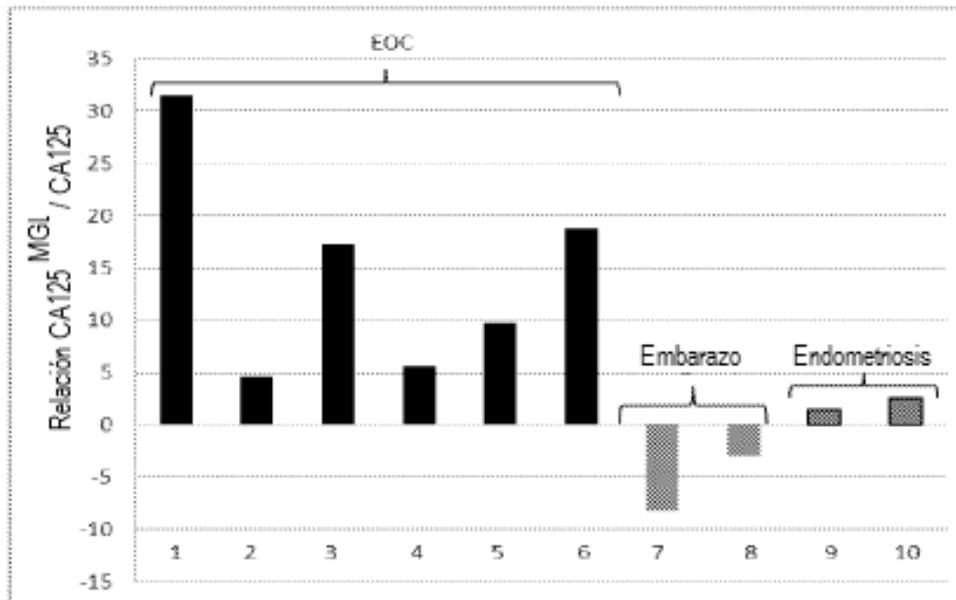


Figura 10

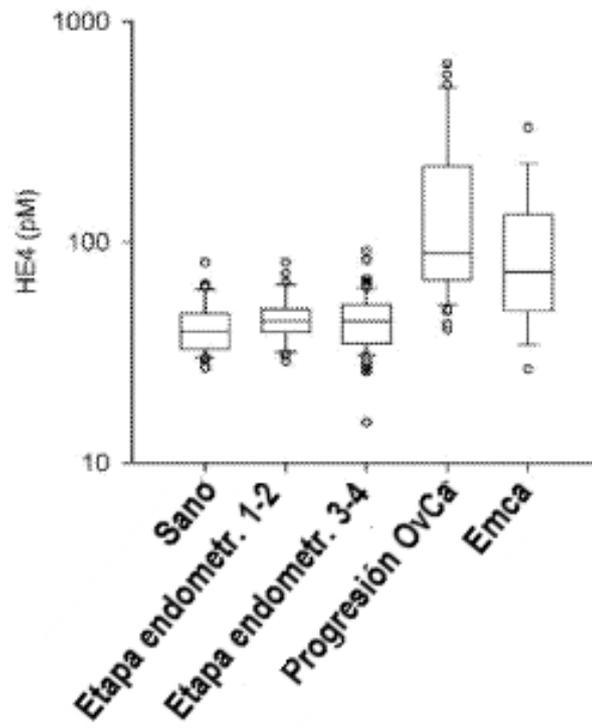


Figura 11 A

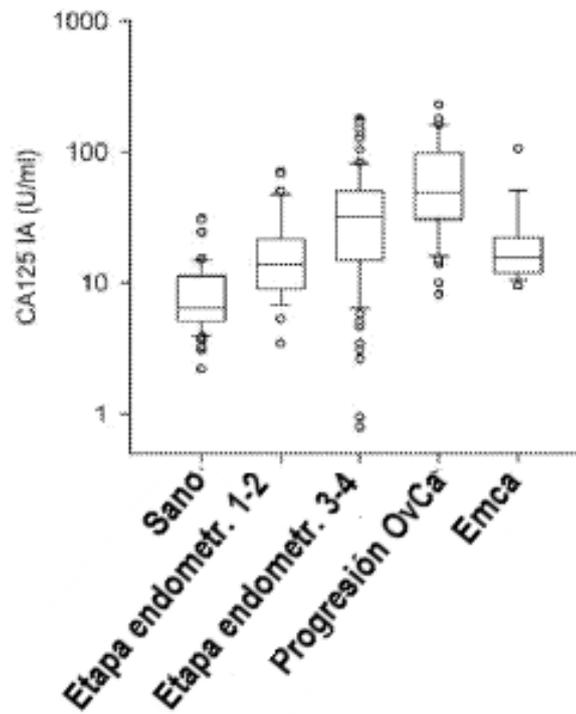


Figura 11 B

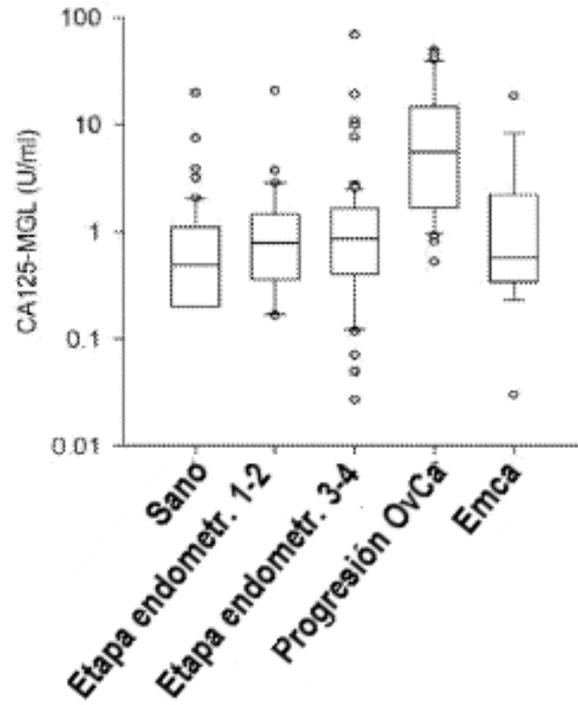


Figura 11C

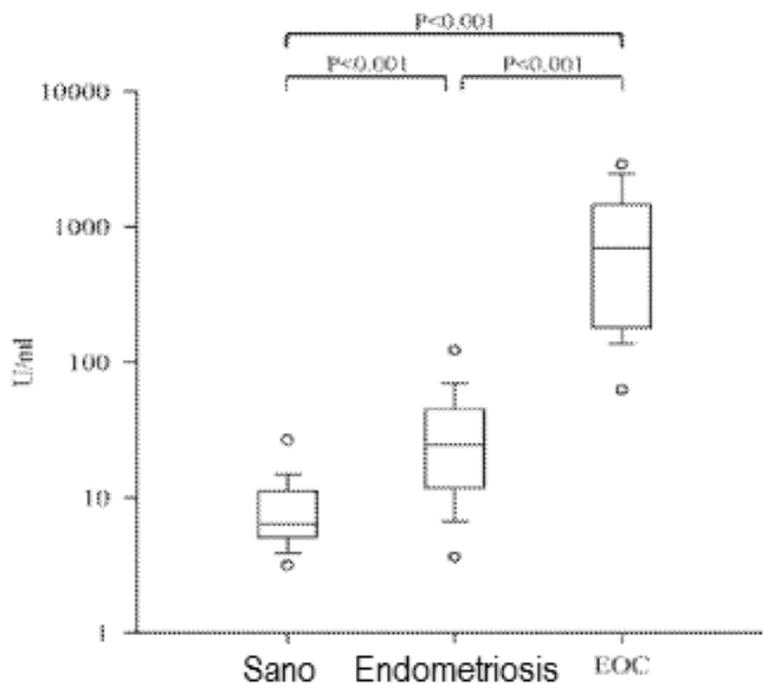


Figura 12A

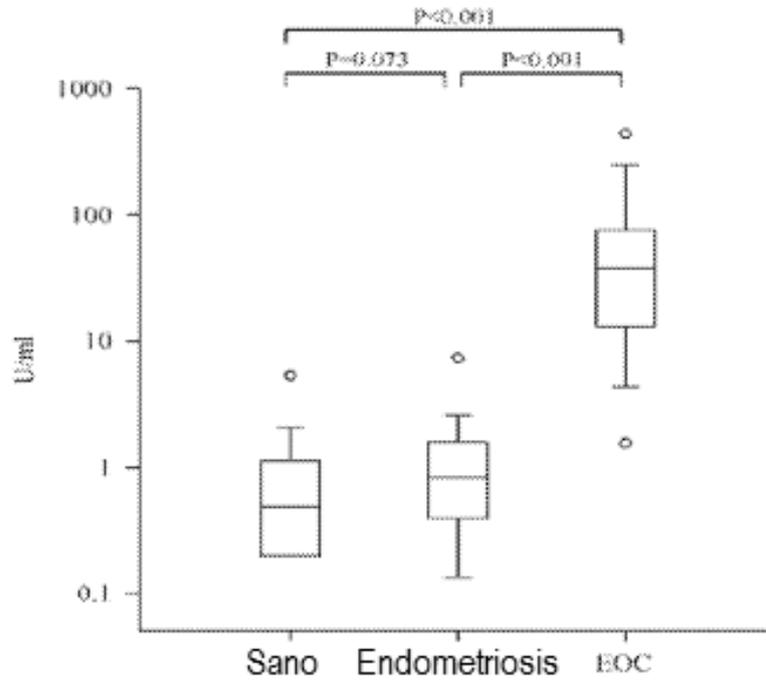


Figura 12B

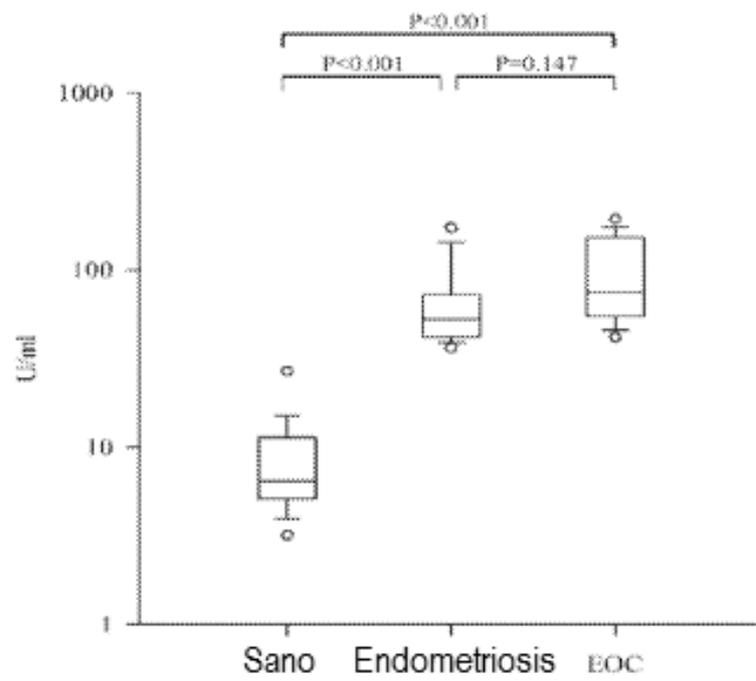


Figura 12C

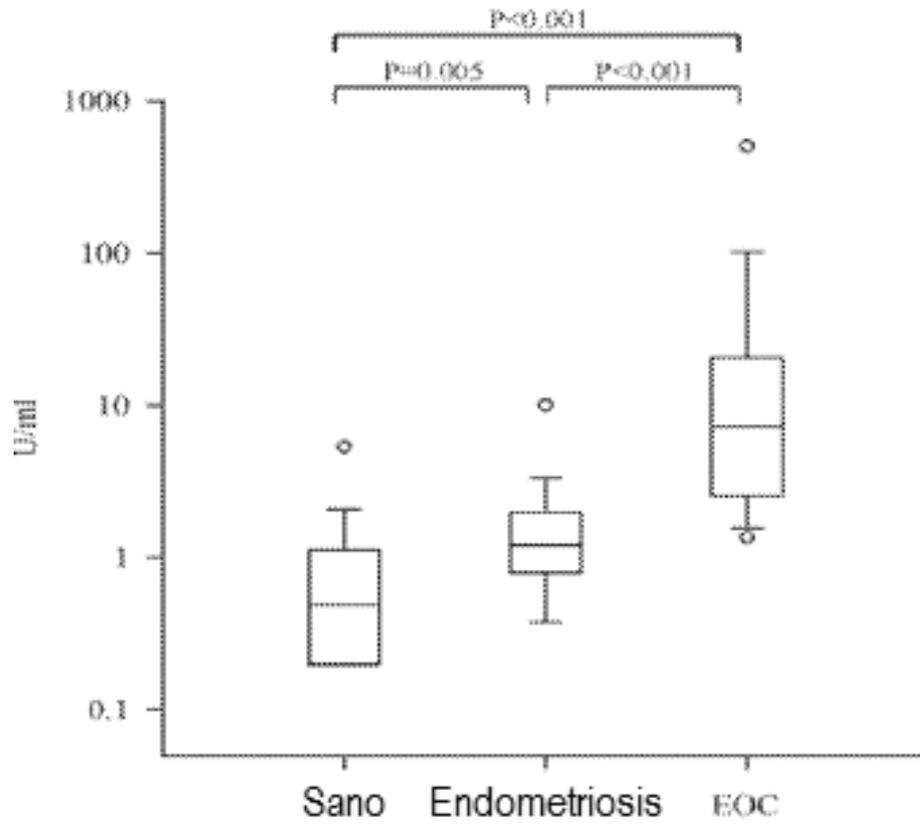


Figura 12D

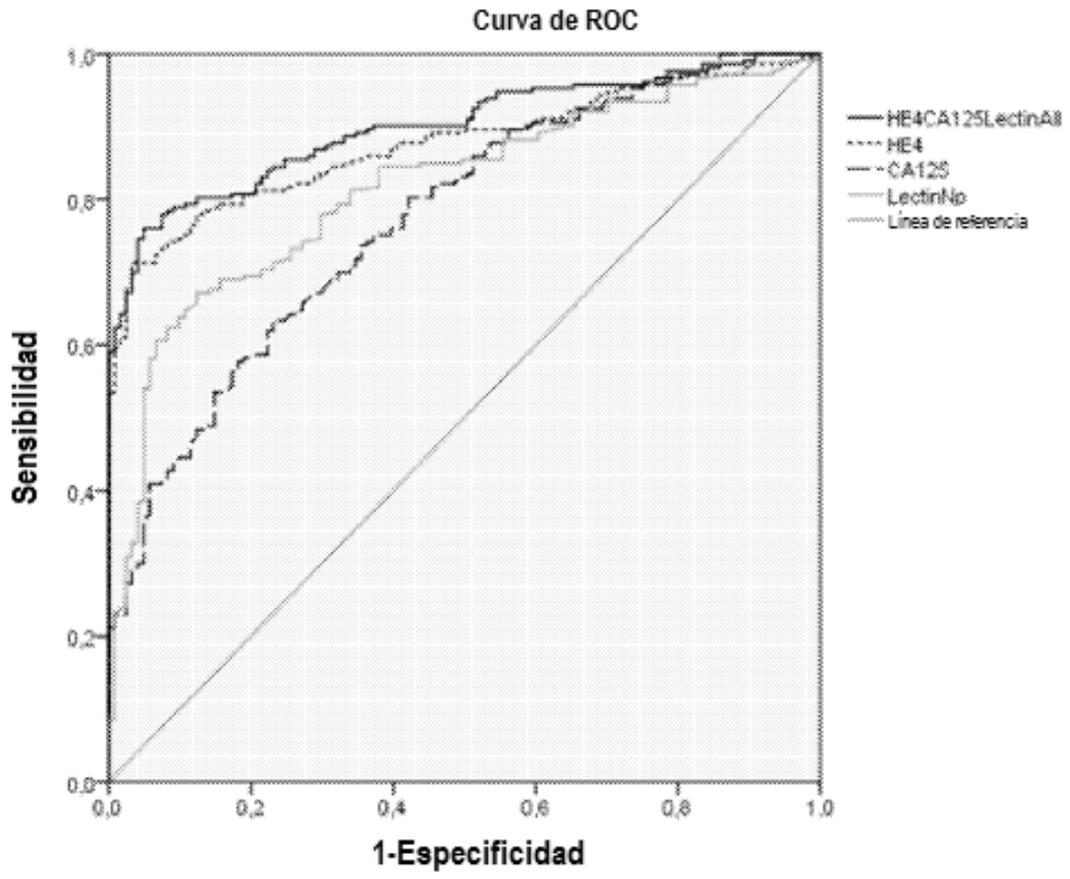


Figura 13A

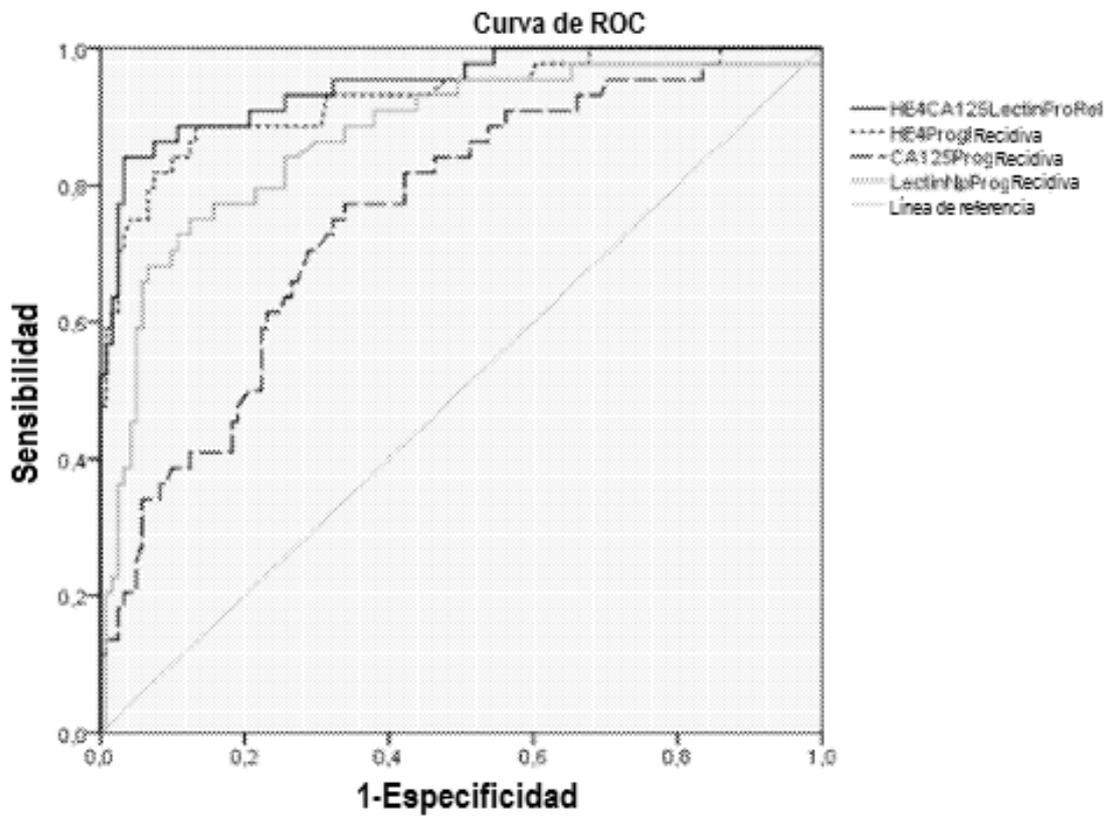


Figura 13B

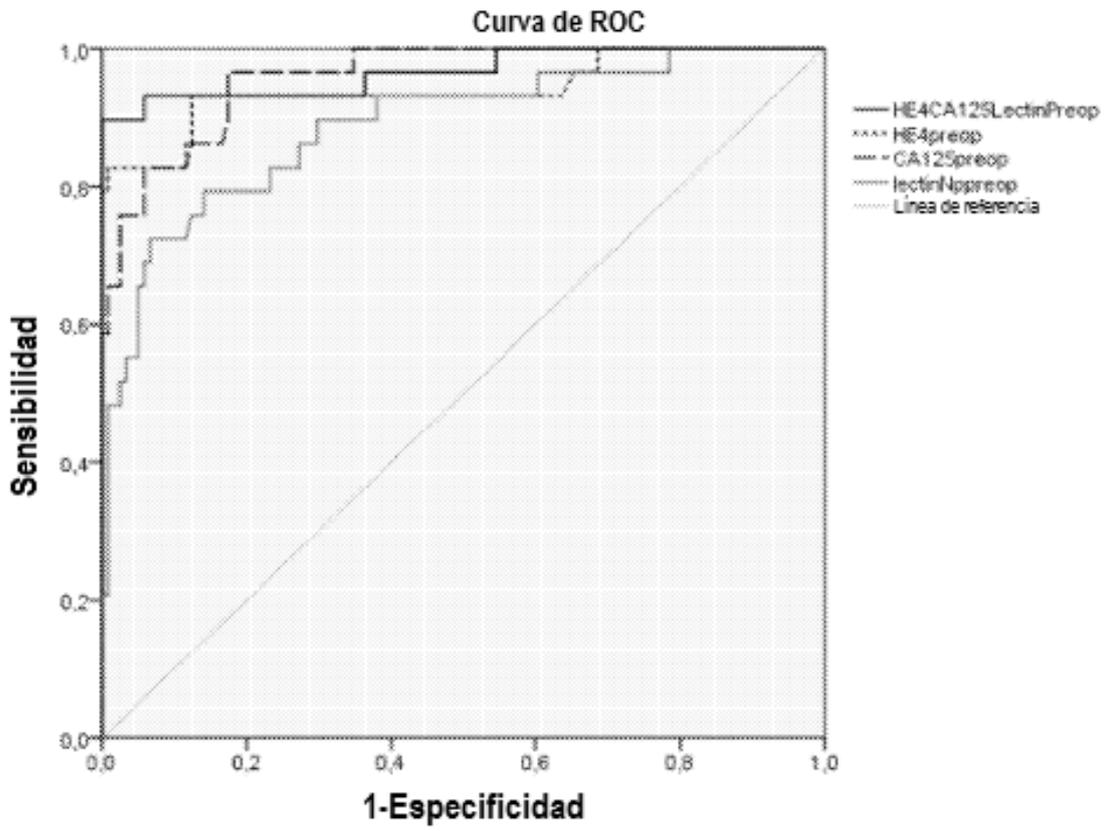


Figura 13C

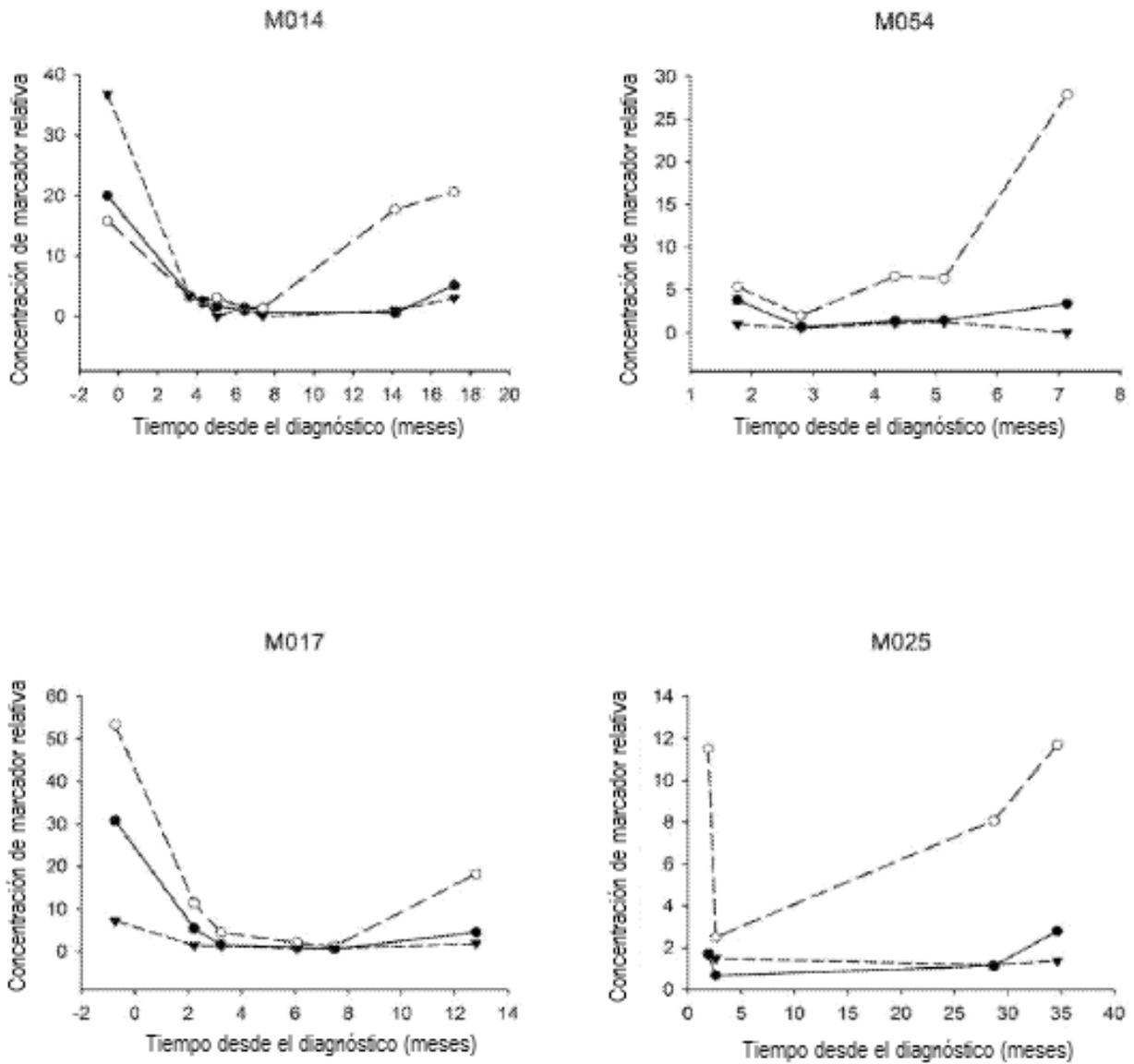


Figura 14

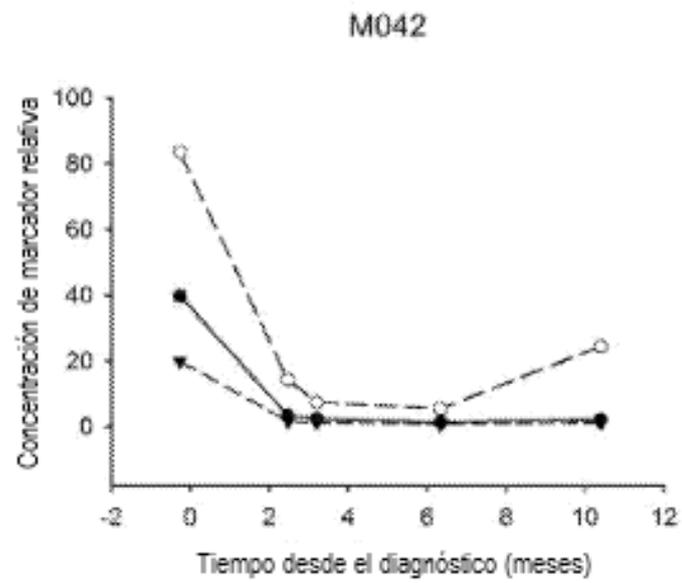
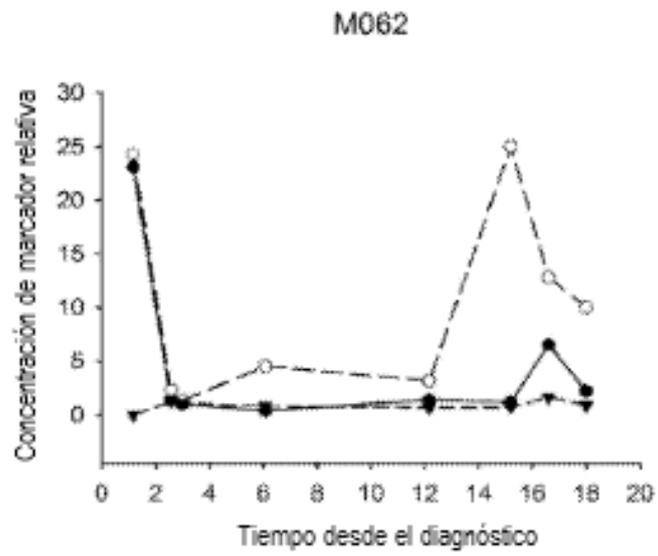


Figura 14 cont.

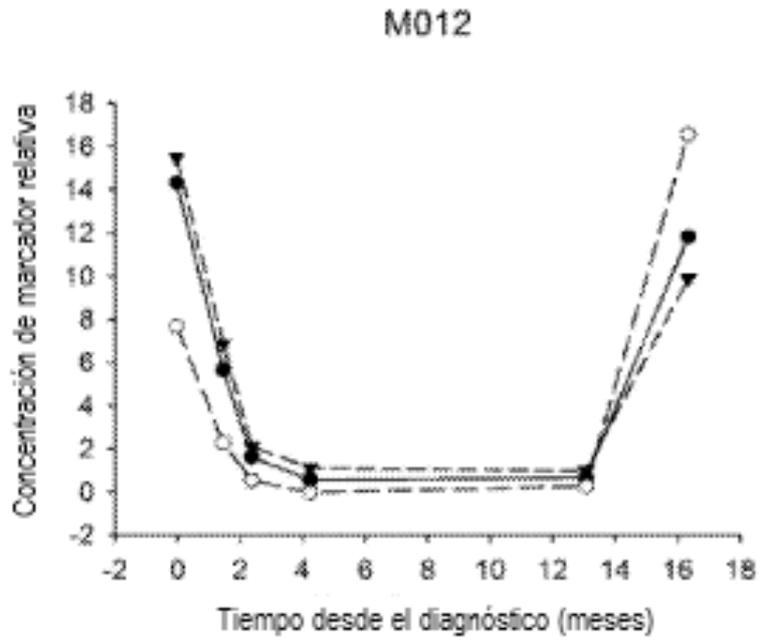


Figura 14 cont.

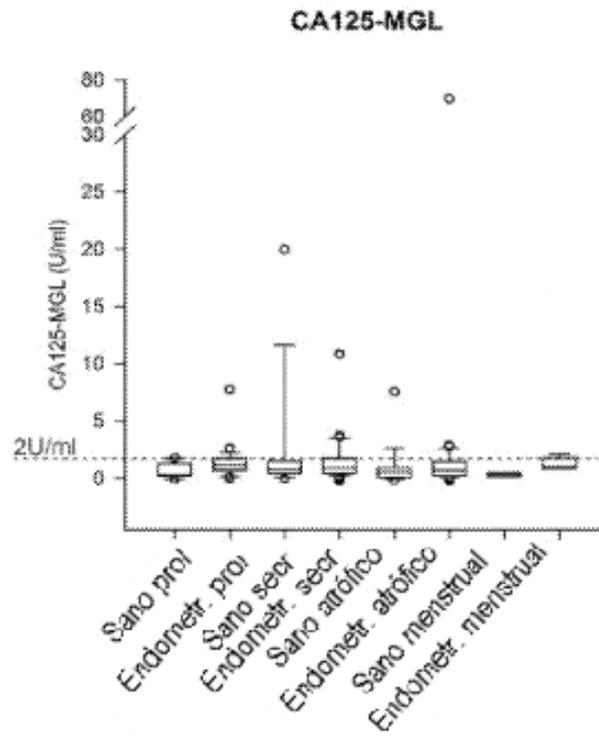


Figura 15A

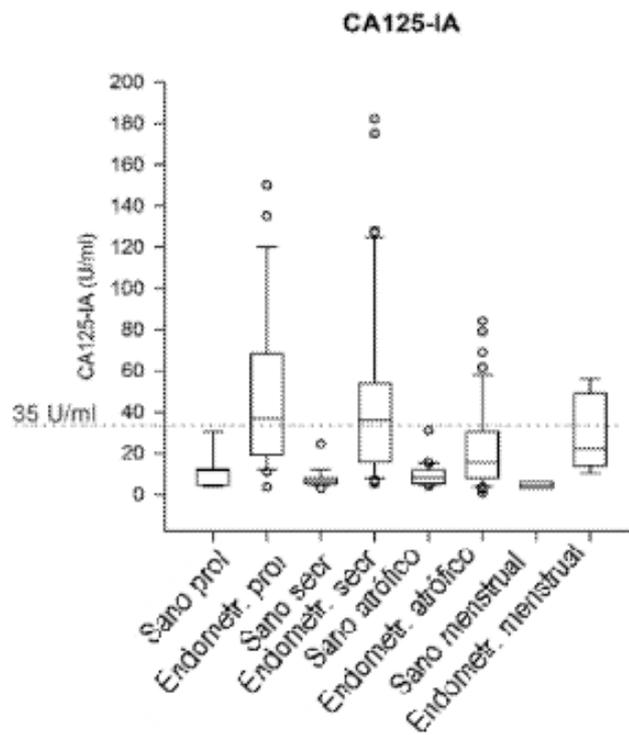


Figura 15B

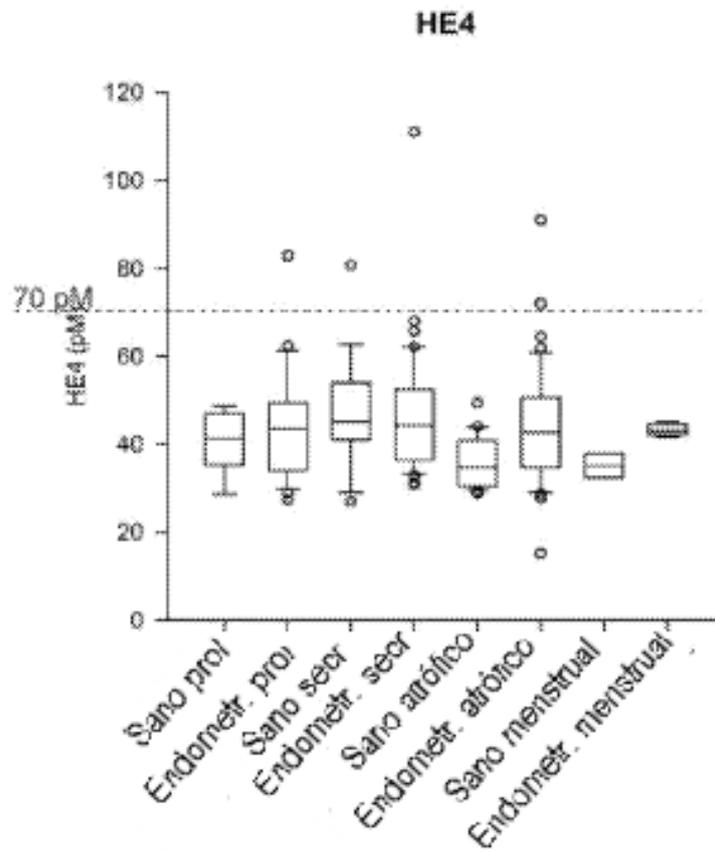


Figura 15C