

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 399**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2011** **PCT/IB2011/054194**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012** **WO12038932**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2011** **E 11773871 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 2619218**

54 Título: **Kits para detectar cáncer de mama u ovario en una muestra de fluido corporal y uso de los mismos**

30 Prioridad:

24.09.2010 CH 15532010

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

17.02.2021

73 Titular/es:

BARD1 LIFE SCIENCES LIMITED (100.0%)
PO Box 7493, Cloisters Square
Perth, WA 6850, AU

72 Inventor/es:

MAKOHLISO, SOLOMZI;
IRMINGER-FINGER, IRMGARD y
HERRERA, FERNANDO

74 Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 806 399 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

Kits para detectar cáncer de mama u ovario en una muestra de fluido corporal y uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a kits para la detección de tumores malignos de ovario y mama en una muestra. En particular, la invención se refiere a kits y un método que usa esos kits para el diagnóstico precoz de tumores malignos de mama y ovario en fluidos biológicos tales como suero humano.

10

Antecedentes de la invención

El cáncer de mama es el cáncer diagnosticado más habitualmente en mujeres después del cáncer de piel no melanoma y es la segunda causa principal de las muertes por cáncer después del cáncer de pulmón. Las evaluaciones clínicas han demostrado que el cribado mediante mamografía, con o sin exploración mamaria clínica, puede reducir la mortalidad por cáncer de mama. Por lo tanto, actualmente, la mamografía sigue siendo el método de referencia para el cribado del cáncer de mama, sin embargo, presenta un abanico de limitaciones, tales como riesgo de radiación, molestias considerables para las pacientes, aumento de las lecturas falsas con los tejidos mamarios más densos, la sensibilidad y especificidad varían según la pericia del personal técnico (60-80 %) y habitualmente se realiza un diagnóstico excesivo. Los biomarcadores de suero/sangre usados actualmente (p. ej., CA27.29, CA15.3, CEA, HER-2) se usan principalmente en el seguimiento y control debido a su deficiente sensibilidad y especificidad para aplicaciones distintas de esas. El tratamiento de las pacientes tras la sospecha inicial de cáncer de mama normalmente incluye la confirmación del diagnóstico, la evaluación del estadio de enfermedad, la extirpación quirúrgica del tejido tumoral y la selección de una terapia. La tasa de supervivencia para el cáncer de mama es superior a 90 % cuando se detecta y trata a tiempo con las terapias existentes.

El cáncer de ovario es el segundo cáncer ginecológico más habitual y el noveno cáncer más habitual, pero el quinto más mortal. En EE. UU., el cáncer de ovario se presenta en 1 de cada 2500 mujeres posmenopáusicas y es la neoplasia maligna ginecológica más letal, representando 5-6 % de todas las muertes por cáncer (Kulasingam y col., 2010, Nature Reviews, Cancer, 10, 371-377). El problema principal es que el cáncer de ovario normalmente no conduce a síntomas alarmantes. Una gran mayoría de las pacientes tienen cáncer avanzado y enfermedad generalizada en su presentación. Esta detección tardía del cáncer de ovario explica por el que la tasa de supervivencia global del cáncer de ovario es inferior a 40 %, mientras que la tasa de supervivencia es cercana a 90 % cuando se detecta en un estadio inicial. Asimismo, no hay pruebas de cribado eficaces que puedan detectar la enfermedad en sus estadios iniciales. Para las mujeres con mayor riesgo, la ovariectomía profiláctica se considera normalmente después de los 35 años si la madurez genital es completa. Las pacientes con histología celular evidente parecen tener un pronóstico peor.

El marcador más estudiado/usado para el cáncer de ovario es CA125, que es un antígeno proteico que se encuentra en niveles anómalamente elevados en la sangre de muchas pacientes con cáncer de ovario, pero también se encontró que es elevado en casos que no son de cáncer (p. ej., mujeres embarazadas). Asimismo, se encontró que el biomarcador CA125 tiene una sensibilidad y especificidad bajas y se usa esencialmente para el seguimiento de la respuesta al tratamiento para el cáncer de ovario. Aunque CA125 no tiene importancia como pronóstico cuando se mide en el momento del diagnóstico, parece demostrar una correlación con la supervivencia con la progresión de la enfermedad, especialmente cuando se mide después del ciclo de quimioterapia para pacientes con enfermedad en estadio III o estadio IV. Otro método usado para la detección precoz del cáncer de ovario es la ecografía transvaginal. Sin embargo, se sabe que este método tiene un valor predictivo positivo muy bajo de aproximadamente 3 % según un estudio reciente importante (Menon y col. 2009, Lancet Oncol., 10, 327-40).

En la mayoría de las familias afectadas por el síndrome de cáncer de mama y ovario o por cáncer de ovario de localización específica, se ha encontrado una vinculación genética con el locus BRCA1 en el cromosoma 17q21 (Easton y col., 1993, Am. J. Hum. Genet., 52 (4): 678-701). BRCA2, responsable de algunas formas de cáncer de ovario y mama hereditarios, se ha cartografiado mediante vinculación genética con el cromosoma 13q12 (Wooster y col., 1994, Science 265 (5181): 2088-90, 1994). La mayoría de las mujeres con esas mutaciones tienen supuestamente familiares con antecedentes de cáncer de ovario y/o mama; por lo tanto, pueden haber estado más atentas y predispuestas a participar en programas de cribado del cáncer que pueden haber conducido a la detección precoz. Sin embargo, para otras poblaciones de mujeres, la detección precoz sigue siendo más incierta.

Varias pruebas que usan biomarcadores en sangre han intentado hacer el diagnóstico del cáncer de ovario (CO) y cáncer de mama (CM) menos invasivo, más exacto, menos invasivo o menos arriesgado que el uso de herramientas de diagnóstico conocidas, es decir, mamografía para el CM. Sin embargo, la mayoría de ellas han sido descartadas después de una serie de interpretaciones erróneas desafortunadas o debido a un acopio de pruebas experimentales insuficiente (Kulasingam y col., 2010, arriba).

Hansen y col., 2001, Molecular Medicine, 7(4), página 230 identificaron epítomos de IgG específicos del cáncer de mama usando una estrategia de selección por presentación en fagos de péptidos. El documento WO2008/119802A1

se refiere a isoformas de proteínas, anticuerpos de las mismas y métodos relacionados útiles para el tratamiento de tumores malignos ginecológicos, que comprenden el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio y cáncer del cuello uterino.

- 5 Por lo tanto, hay una necesidad incipiente de desarrollar métodos y herramientas nuevos para proporcionar un diagnóstico sencillo, fiable (sensibilidad y especificidad mínimas), no invasivo y precoz de los tumores malignos de mama y/u ovario antes de que esos tumores malignos causen síntomas.

Resumen de la invención

10 La presente invención está orientada a un método para detectar tumores malignos de mama u ovario a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero y a un ensayo relacionado, kits y péptidos adecuados para la detección de tumores malignos de mama u ovario. En particular, la invención se refiere al hallazgo inesperado de que los péptidos según la invención usados como antígenos adsorbidos sobre una superficie sólida permiten la detección de anticuerpos endógenos en una muestra de sangre de un sujeto, que son indicativos de un cáncer de mama u ovario.

Un primer aspecto de la invención proporciona un método para detectar un cáncer de mama u ovario a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero que comprende las etapas de:

- 20 (a) proporcionar una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero;
 (b) poner dicha muestra de fluido biológico en contacto con una matriz sólida a la que está unido al menos un péptido, donde la puesta en contacto es en condiciones adecuadas para unir un anticuerpo presente en dicha muestra de fluido biológico a dicho al menos un péptido mediante interacciones antígeno-anticuerpo y donde dicho
 25 al menos un péptido tiene una secuencia de aminoácidos de un péptido según la invención o una variante del mismo como se define en esta memoria;
 (c) retirar la muestra de fluido biológico para retirar de la matriz sólida todos los anticuerpos no unidos de la superficie de dicha matriz sólida;
 (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo unido a dicha matriz sólida, donde la presencia de
 30 dicho complejo es indicativa de que la muestra de fluido biológico contiene uno o más anticuerpos endógenos asociados al cáncer de mama u ovario. Un segundo aspecto de la invención proporciona un kit para detectar un biomarcador para un cáncer de mama u ovario en una muestra de fluido biológico, comprendiendo el kit al menos un péptido según la invención o una variante del mismo o una combinación del mismo.

- 35 Un tercer aspecto de la invención proporciona un péptido aislado según la invención. Un cuarto aspecto de la invención proporciona una preparación de inmunoensayo para la detección de un cáncer de mama u ovario que comprende al menos un péptido según la invención.

- Un quinto aspecto de la invención proporciona un uso de un péptido según la invención en un ensayo para la detección de un cáncer de mama u ovario.

Un sexto aspecto de la invención proporciona un uso de un péptido según la invención para el revestimiento de una matriz sólida para realizar un inmunoensayo.

- 45 Un séptimo aspecto de la invención reside en un uso de un kit según la invención para detectar un cáncer de mama u ovario a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, las figuras y las secuencias.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra la densidad óptica (DO) medida a 405 nm de un ensayo ELISA inverso de uno de los estudios como se describe en el Ejemplo 2 en trece muestras de sangre de cáncer de ovario (Fig. 1A) y siete controles, es decir, muestras sanas (Fig. 1B) como se describe en el Ejemplo 3. El eje X representa los péptidos usados en el ensayo que se detallan en la Tabla 1, así como la notación que identifica las muestras. Las cajas representan la varianza de 3 mediciones. Las líneas verticales dividen la gráfica por muestra y la línea horizontal a $DO_{405nm} = 0,4$ permite una visualización mejor de la respuesta superior de las muestras de cáncer frente a los controles. Obsérvese que en este estudio, de hecho, fue posible distinguir a las pacientes en remisión, como se indica en la Figura 1A (muestras 11-13). En la Figura 1B, una muestra (control 7) presentó una respuesta significativamente superior a los otros estudios de casos de control. No quedó claro en última instancia si esto fue debido a un error o si, de hecho, la persona de control correspondiente tenía cáncer. La Figura 1C muestra los resultados de cuatro casos de cáncer de ovario (de los cuales uno era un caso de remisión: muestra 3) y cuatro controles sanos que fueron llevados a cabo por un laboratorio de diagnóstico profesional independiente. En general, los resultados fueron reproducibles, con el caso de remisión de nuevo claramente discernible.

La **Figura 2** muestra los resultados obtenidos a partir del conjunto de pruebas con el método de clasificación de

análisis de discriminantes lineales (LDA) (Friedman, 1989, Regularized Discriminant Analysis In: Journal of the American Statistical Association, 84(405): 165-175) sobre el conjunto de pruebas de cáncer de mama como se describe en el Ejemplo 3. Las puntuaciones del LDA obtenidas se encuentran en el intervalo de -5 a +3 aproximadamente, como se ilustra en las Figuras 2A y 2B. BBV= quiste de mama benigno (control); BOV= quiste de ovario benigno (control); GVABB= donantes de sangre sanas (control); CBV= tumor de mama maligno (casos de cáncer). En la Figura 2A, las puntuaciones del LDA de los controles están agrupadas independientemente de las de los casos de cáncer de mama. En la Figura 2B, las puntuaciones de cada grupo de muestras se presentan independientemente, a fin de permitir ver hasta qué punto los resultados/la invención pueden distinguir el tejido maligno de tejido benigno. La Figura 2C muestra la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) de los resultados del conjunto de pruebas. La ROC se obtiene representando gráficamente la sensibilidad (o tasa de positivos reales) frente a la tasa de falsos positivos (1-especificidad) para un sistema de clasificación binario (p. ej., enferma o sana), ya que su umbral de discriminación es variado. El área bajo la curva (AUC) de la ROC es un reflejo del rendimiento del sistema de clasificación binario o la prueba. Una prueba perfecta daría como resultado un AUC = 1. La ROC se representó gráficamente variando el umbral (puntuación del LDA) como se describe en el Ejemplo 3. Seleccionando una determinada puntuación del LDA umbral, por encima de la cual el resultado se considera positivo (es decir, presencia de cáncer), la sensibilidad se representó gráficamente (tasa de positivos reales) frente a la (1-especificidad), lo que condujo a un AUC = 0,92.

Descripción detallada de la invención

El término "sujeto", como se emplea en esta memoria, se refiere a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos contemplados por la presente invención incluyen seres humanos, primates, animales domesticados tales como ganado bovino, ganado ovino, ganado porcino, caballos y similares.

El término "aislado/a" se usa para indicar que la molécula está exenta de asociación con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo, como un producto de la purificación.

La expresión "cáncer de mama" incluye neoplasia maligna de mama, es decir, cáncer que se origina a partir de tejido mamario, más habitualmente a partir del revestimiento interior de los conductos galactóforos o los lobulillos que suministran leche a los conductos.

La expresión "cáncer de ovario" incluye todas las diversas neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido circundante de los ovarios y metastatizar a puntos del cuerpo nuevos. El proceso patológico se caracteriza por tales crecimientos. Por ejemplo, el cáncer de ovario incluye el carcinoma de ovario de células claras.

La expresión "muestra de fluido biológico" se refiere a una muestra clínica de fluido para pruebas que se toma de un fluido corporal de un mamífero tal como saliva, sangre y orina. Por ejemplo, una muestra de fluido biológico es una muestra de suero de un sujeto humano.

La expresión "muestra de control" se refiere a una muestra de control positivo o de control negativo. Una muestra de control negativo incluye una muestra de fluido corporal tomada de un sujeto que es de la misma especie o una homóloga al sujeto que se va a someter a ensayo para la determinación de autoanticuerpos y se sabe que tiene un estado biológico normal, p. ej., sin autoanticuerpos detectables contra al menos un péptido según la invención o una solución que no contiene anticuerpos que son inmunorreactivos con al menos un péptido según la invención. Una muestra de control positivo incluye una muestra tomada de un sujeto de control. Una muestra de control positivo incluye una muestra de fluido corporal tomada de un sujeto que es de la misma especie o una homóloga al sujeto que se va a someter a ensayo para la determinación de autoanticuerpos y se sabe que tiene autoanticuerpos detectables contra al menos un péptido según la invención o una solución que contiene anticuerpos que son inmunorreactivos con al menos un péptido según la invención.

El término "variante", como se denomina en esta memoria, significa un polipéptido sustancialmente homólogo a la secuencia del péptido original, pero que tiene una delección o inserción en la secuencia de aminoácidos. El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante inspección visual y/o cálculo matemático, o más fácilmente comparando la información de las secuencias usando un programa informático conocido utilizado para la comparación de secuencias tal como el paquete Clustal versión 1.83.

El término "matriz sólida" incluye todos los soporte en fase sólida adecuados para llevar a cabo un inmunoensayo o un método según la invención. Esto incluye perlas, micropartículas, nanopartículas, tubos, tejidos o placas, películas, portaobjetos, pocillos, contruidos de, o revestidos con, vidrio, poliestireno, polipropileno, nitrocelulosa, cuarzo, cerámica, dextrano u otros materiales. Por ejemplo, la matriz sólida está en forma de pocillos de microtitulación, tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos.

La expresión "kit" comprende al menos un polipéptido según la invención, o una variante del mismo o una combinación de mismo, como se describe en esta memoria, que se va a acoplar, o ya está acoplado, a una matriz sólida y opcionalmente material instructivo.

Péptidos

Según un aspecto de la invención, se proporciona un péptido aislado según la invención que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo como se define en la reivindicación 1.

La Tabla 2 siguiente presenta los números de identificación de secuencia y las moléculas asociadas:

Tabla 2

SEQ ID NO:	Molécula
1 (p2)	EGGTMPDNRQPRNR(C)
2 (p8)	ILSRKPKPDSQVTQ(C)
3 (p11)	(C)SVMNTGQRRDGPL
4 (p13)	VAYHARPDSDQRF(C)
5 (p16)	DNELSDLKEDKPRK(C)
6 (p21)	PVCYTPAWIQDLKINRQLDSMIQL(C)
7 (p24)	KAGRCRIIG(C)
8 (p25)	MVAVPGPTVAPR(C)
9 (p34)	LRCSRCNIFG(C)
10 (p35)	AARVGKACL(C)
11 (p36)	DNELSGVKA(C)
12 (p37)	HIFCSNIFGL(C)

Los métodos químicos de síntesis, tales como la síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden usar para sintetizar los polipéptidos según la invención. La purificación de esos péptidos se puede llevar a cabo por medio de cualquier técnica conocida en la técnica de la purificación de proteínas/péptidos. Las técnicas ejemplares incluyen la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y métodos de inmunoafinidad.

Según otra realización, se proporciona un inmunoensayo útil para la detección de un biomarcador para un cáncer de mama u ovario en una muestra de fluido biológico que comprende al menos un péptido según la invención.

Según una realización adicional, se proporciona un inmunoensayo útil para la detección de un biomarcador para un cáncer de mama en una muestra de fluido biológico que comprende una combinación de péptidos según la invención o de variantes de los mismos. En particular, la combinación comprende: a) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo; y b) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 5 o de SEQ ID NO: 10 o una variante del mismo.

Según otra realización adicional, se proporciona un inmunoensayo útil para la detección de un biomarcador para un cáncer de ovario en una muestra de fluido biológico una combinación de péptidos según la invención o de variantes de los mismos. En particular, la combinación comprende: a) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo; y b) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 4 o una variante del mismo.

Según otra realización, se proporciona un uso de un inmunoensayo según la invención para el revestimiento de una matriz sólida para realizar un inmunoensayo.

Kit

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un kit para detectar un biomarcador para un cáncer de mama u ovario en una muestra de fluido biológico, comprendiendo el kit al menos un péptido según la invención, o una variante del mismo o una combinación del mismo. Según un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para llevar a cabo un método según la invención.

El kit según la invención comprende al menos un polipéptido según la invención, una variante del mismo o una combinación del mismo para acoplarlo, o ya acoplado, a una matriz sólida como soporte en fase sólida como se denomina en esta memoria. Se pueden usar diversas matrices sólidas, que incluyen, pero no se limitan a, vidrio, poliestireno, polipropileno, nitrocelulosa, cuarzo, cerámica, dextrano u otros materiales. Las formas adecuadas de la

matriz sólida incluyen perlas, micropartículas, nanopartículas, tubos, tejidos o placas, películas, portaobjetos, pocillos contruidos de, o revestidos con, estos materiales. Típicamente, la matriz sólida comprende pocillos de microtitulación, tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos.

La fijación de los péptidos según la invención a la matriz sólida en un kit según la invención se puede llevar a cabo mediante adsorción o acoplamiento químico a un soporte en fase sólida. Se puede usar cualquier medio conocido en la técnica para inmovilizar una proteína o un péptido a un soporte sólido. Los péptidos según la invención pueden estar unidos indistintamente covalente o no covalentemente a la matriz sólida mediante técnicas tales como la unión covalente a través de un enlace de tipo amida o éster o mediante adsorción. Los péptidos se pueden unir usando pares de unión tales como biotina y avidina o anticuerpo y antígeno. Después de que los péptidos están fijados a la matriz sólida, la matriz sólida se puede incubar con una solución de bloqueo (que contiene una proteína de bloqueo tal como albúmina sérica bovina) para reducir la adsorción inespecífica de anticuerpos en una muestra de prueba a la superficie de soporte. Según un aspecto, los polipéptidos según la invención se pueden sintetizar directamente sobre la matriz sólida del kit de la invención.

Según una realización, cuando el kit comprende al menos un polipéptido según la invención, una variante del mismo o una combinación del mismo para acoplarlo a una matriz sólida como soporte en fase sólida, el kit comprende opcionalmente, además reactivos de acoplamiento y/o una matriz sólida para realizar un inmunoensayo.

Según otra realización adicional, el kit según la invención comprende además al menos un reactivo de lavado para lavar el material no unido antes de la detección a fin de evitar la detección de ruido de fondo. Típicamente, los reactivos de lavado comprenden tampones convencionales conocidos en la técnica.

Según otra realización adicional, el kit según la invención comprende además al menos una muestra de control opcionalmente junto con información de la calibración para la cuantificación de los autoanticuerpos detectados.

Métodos que usan un kit según la invención

Según otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar un cáncer de mama u ovario a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero;
- (b) poner dicha muestra de fluido biológico en contacto con una matriz sólida a la que está unido al menos un péptido, donde la puesta en contacto es en condiciones adecuadas para unir un anticuerpo presente en dicha muestra de fluido biológico a dicho al menos un péptido mediante interacciones antígeno-anticuerpo y donde dicho al menos un péptido tiene una secuencia de aminoácidos de un péptido seleccionada de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma;
- (c) retirar la muestra de fluido biológico de la matriz sólida para retirar todos los anticuerpos no unidos de la superficie de dicha matriz sólida;
- (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo unido a dicha matriz sólida, donde la presencia de dicho complejo es indicativa de que la muestra de fluido biológico contiene uno o más autoanticuerpos asociados al cáncer de mama u ovario. Según una realización adicional se proporciona un método según la invención, donde dicho al menos un péptido tiene una secuencia de aminoácidos de un péptido seleccionada de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

Según otra realización adicional, se proporciona un método según la invención, donde dicha muestra de fluido biológico se pone en contacto con dicha matriz sólida en la etapa b), en la que una combinación de péptidos o de variantes de los mismos según la invención se une a dicha matriz sólida.

Según otra realización adicional, se proporciona un método para detectar un cáncer de mama a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero donde dicha muestra de fluido biológico se pone en contacto con dicha matriz sólida en la etapa b), en la que una combinación de péptidos o de variantes de los mismos se une a dicha matriz sólida y en la que la combinación comprende: a) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo; y b) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 5 o de SEQ ID NO: 10 o una variante del mismo.

Según otra realización adicional, se proporciona un método para detectar un cáncer de ovario a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero donde dicha muestra de fluido biológico se pone en contacto con dicha matriz sólida en la etapa b), en la que una combinación de péptidos o de variantes de los mismos se une a dicha matriz sólida y en la que la combinación comprende: a) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo; y b) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 4 o una variante del mismo.

Según otra realización adicional, se proporciona un método según la invención, donde el método comprende además

una etapa de comparar la señal obtenida en la etapa de detección d) con la misma señal obtenida para al menos una muestra de control, donde la señal obtenida para dicha al menos una muestra de control se recoge previamente, simultáneamente o después de la etapa d) para dicha muestra de fluido biológico.

- 5 La detección de los anticuerpos capturados/unidos en la etapa d) mediante cualquier método conocido en la técnica para detectar anticuerpos o proteínas capturados sobre superficies tal como técnicas de detección óptica (p. ej., ELISA), detección de variaciones de masa (p. ej., resonancia de plasmones superficiales, espectrometría de masas), detección eléctrica (p. ej., espectroscopía de impedancia, electroquímica).
- 10 Los resultados del ensayo pueden ser cualitativos o cuantitativos. La cantidad de anticuerpos capturados/unidos asociados a la matriz sólida se puede comparar con controles positivos y negativos. Los controles se analizan típicamente de manera simultánea a la muestra que se va a analizar. Un control positivo puede ser un suero o una solución que contiene anticuerpos que son inmunorreactivos con al menos un péptido según la invención. Un control positivo puede ser un suero o una solución que no contiene anticuerpos que son inmunorreactivos con al menos un péptido según la invención. Para la cuantificación, se puede generar y/o usar una curva de calibración que usa cantidades conocidas de anticuerpo contra al menos un péptido según la invención. Los anticuerpos para uso como controles positivos se pueden producir usando toda, o fragmentos de, la secuencia de aminoácidos de un péptido según la invención.
- 15
- 20 La comparación con muestras de fluido biológico sano normal se puede conseguir con métodos diferentes. Según una realización, se puede llevar a cabo incluyendo una reacción de control con una muestra de sangre sana. Según otra realización, se puede llevar a cabo empleando un valor para la concentración de anticuerpos endógenos para una muestra de fluido biológico típica de un sujeto sano. Típicamente, la comparación del nivel de anticuerpos endógenos presentes en una muestra en investigación se puede realizar con respecto a un valor determinado en cada procedimiento de prueba o con respecto a un valor predeterminado. El valor predeterminado se puede determinar para el procedimiento de prueba en general o, alternativamente, el valor puede ser válido solo para un cierto lote de reactivos de prueba. Por ejemplo, el valor de referencia puede ser válido solo para un periodo de calibración definido y se puede redefinir tras la calibración del procedimiento de prueba.
- 25
- 30 El método, el kit y los usos según la invención pueden ser adecuados con fines de cribado, así como con fines de diagnóstico, y se pueden utilizar en el diagnóstico principal, así como en el seguimiento del curso de la enfermedad durante o después del tratamiento.
- 35 Habiéndose descrito la invención, los ejemplos siguientes se presentan a título de ilustración y no de limitación.

Ejemplos

Las abreviaturas siguientes se refieren respectivamente a las definiciones que se presentan a continuación:

- 40 **kDa** (kilodalton), **mg** (microgramo), **mL** (microlitro), **min** (minuto), **M** (molar), **sec** (segundo), **BSA** (albúmina sérica bovina), **CCC** (carcinoma de células claras), **ELISA** (ensayo de inmunoadsorción enzimática), **DO** (densidad óptica).

Ejemplo 1: Síntesis de péptidos

- 45 Los péptidos se sintetizaron mediante procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida conocidos por los expertos en la materia. La pureza de los péptidos fue al menos 80 %. Los péptidos se disolvieron en solución madre en 1 mg/mL de tampón y se almacenaron en alícuotas de 200 mL a -20 °C. Los péptidos se almacenaron en tampón carbonato, pH 9,6.

Ejemplo 2: Inmunoensayo ELISA usando péptidos según la invención

- 50 El método según la invención se ejemplifica en forma de un ensayo ELISA inverso como se describe en el Ejemplo 2 en el que los péptidos según la invención se adsorben sobre la superficie de una placa de pocillos y se investiga la presencia de anticuerpos endógenos en el suero de pacientes como se indica a continuación:

Placas

- 60 Se usaron placas DINEX 3010 Immolux (Bioconcept, Suiza). Las placas se revistieron con los péptidos en una concentración de 10 mg/mL (100 mL/pocillo) en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6, 2 pocillos por péptido, y se dejaron incubar durante la noche a 4 °C. 80 pocillos se revistieron con los péptidos y 1 fila se revistió con una mezcla de IgG humana combinada de sueros humanos normales (Southern Biotech) a 1:1000 en tampón carbonato para las pruebas de los controles positivos y otra fila se dejó vacía (sin revestimiento) para medir la unión inespecífica (ruido de fondo) (control negativo).

Procedimiento

Los pocillos revestidos se lavaron a continuación 3 veces con 250 mL/pocillo de PBST (0,05 % de Tween-20 en solución salina de tampón fosfato 0,15 M, pH 7,4) para retirar la solución de revestimiento. Los pocillos se incubaron a continuación durante 1 hora a 37 °C con diluyentes de BSA/solución de bloqueo (1 % de BSA en PBST, 0,1 g/L de metiolato) (300 mL/pocillo). A continuación, la solución bloqueo se retira y la placa se lava 3 veces con PBST. Se añaden sueros humanos diluidos a 1:70 en los diluyentes de BSA/solución bloqueo (100 mL/pocillo). La placa se reviste a continuación con un plástico adhesivo y se incuba durante 2 h a 37 °C. A continuación, la solución se retira y la placa se lava 3 veces con PBST (250 mL/pocillo). Se añade anticuerpo antihumano marcado con rábano picante en una dilución de 1:1000 en los diluyentes de BSA/solución bloqueo (100 mL/pocillo) y se incuba 1 h a 37 °C. A continuación, se añade una solución de sustrato al pocillo (100 mL/pocillo), en el que se obtiene la coloración después de aproximadamente 2 min de incubación y el pocillo se incuba adicionalmente durante 5 min a temperatura ambiente (indistintamente sustrato de ABTS bicomponente o sustrato de TMB). La reacción se detiene (extinción) mediante la adición de H₂SO₄ a 2 M (100 mL/pocillo) e incubación durante 2 min. La absorbancia a 450 nm se lee usando un espectrofotómetro de placas de microtitulación. El valor de corte de la señal se estableció en < 0,1 DO.

Reactivos

Se usó el kit de micropocillos HRP Protein Detector, antihumano, 54-62-10, KPL, Inc. EE. UU.

Péptidos

Los péptidos usados como antígenos en el presente ensayo ELISA inverso fueron los preparados según el Ejemplo 1.

Tratamiento de datos

La extracción de datos (detección de patrones en los datos) se realizó mediante los programas Matlab® de Mathworks Corp, Minitab® y SPSS® de IBM Corp.

Análisis estadístico

A continuación, se realizó el análisis estadístico mediante tres métodos diferentes en paralelo: Análisis de componentes principales (PCA), análisis de discriminantes lineales (LDA), análisis de conglomerados jerárquicos y modelo de regresión (Pepe, 2003, "The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction", Oxford University Press). Para el análisis de componentes principales, los datos se agruparon por clase (pacientes, afecciones benignas y personas presumiblemente sanas). A continuación, se llevó a cabo un PCA para los tres grupos de muestras.

Ejemplo 3: Pruebas clínicas en conjuntos de muestras de cáncer de mama y ovario en seres humanos

Las muestras fueron muestras de sangre de donantes sanas y de personas que padecían indistintamente cáncer de mama u ovario. **Cáncer de ovario**

Se construyó un conjunto de muestras de suero de pacientes que tenían carcinoma de células claras y controles como se indica a continuación:

Tabla 3

Tipo	Número
Carcinoma de células claras (cáncer de ovario)	13
Controles	10
Total:	23

Esas muestras se ensayaron según un método de la invención como se describe en el Ejemplo 2. Los péptidos ajenos a los controles se añadieron para probar la selectividad del ensayo. Se aplicó ANOVA de una vía a los resultados. El mismo análisis fue repetido por un laboratorio independiente y los resultados se presentan en la Figura 1 para 4 muestras de control frente a 4 de carcinoma de ovario. Unos cuantos casos que se suponía que eran muestras de cáncer de ovario se revelaron como controles en el ensayo según la invención. Después de investigaciones adicionales en los datos y registros de las muestras, parecía que estas muestras, de hecho, pertenecían a pacientes con cáncer de ovario en remisión. Por lo tanto, esto demostró que la exactitud del ensayo era, de hecho, correcta a la hora de clasificar estas muestras como muestras de sujetos sin cáncer.

Se construyó un conjunto adicional de muestras de suero de pacientes que tenían carcinoma de células claras (cáncer de ovario) y controles como se indica a continuación:

Tabla 4

Tipo	Número
Carcinoma de células claras (cáncer de ovario)	13
Controles	10
Total:	23
Carcinoma de células claras (cáncer de ovario)	11
Cáncer de mama (CBV)	2
Afección benigna de ovario (BOV)	10
Afección benigna de mama (BBV)	5
Mujeres sanas de control (GVABB)	5
Total:	33

Los resultados se analizaron estadísticamente como se describe en Zhou y col., 2002, Statistical Methods in diagnostic medicines, Wiley, NY, para determinar la especificidad y sensibilidad del ensayo. La consistencia del ensayo y el método según

la invención se puede resumir como se indica a continuación:

Tabla 5

	Número de muestras positivas	Número de muestras negativas	Total de muestras
FALSOS	6 (FP)	0 (FN)	6
REALES	12 (PR)	15 (NR)	27
Total	18	15	33

Entre los falsos positivos, se detectaron como positivos 2 cánceres de mama y 2 afecciones benignas de mama. Suponiendo positivo real (PR), negativo real (NR), falso positivo (FP), falso negativo (FN), la especificidad y sensibilidad del ensayo según la invención se calculan como se indica a continuación:

- Especificidad = $NR/(NR+FP)$ y
- Especificidad = $PR/(PR+FN)$,

lo que conduce a 71,4 % de especificidad, 100 % de sensibilidad. Por lo tanto, un ensayo según la invención presenta valores de selectividad y sensibilidad muy elevados para la detección de tumores malignos de ovario y fue capaz de discriminar entre pacientes con cáncer de ovario y pacientes con cáncer de ovario en remisión.

Cáncer de mama

Se construyó un conjunto de muestras de suero de pacientes que tenían cáncer de mama (CBV), quistes de mama (BBV), quiste benigno de ovario (BOV) y controles como se indica en la Tabla 7 a continuación:

Tabla 6

Tipo	Número
Cáncer de mama (CBV) - "paciente"	66
Afección benigna de mama (BBV) - "sana"	54
Afección benigna de ovario (BOV) - "sana"	50
Mujeres sanas de control (GVABB) - "sanas"	20
Total:	190

Entre las pacientes, 29 % son menores de 50 años y 71 % tienen 50 años o más. Esas muestras se ensayaron según un método de la invención como se describe en el Ejemplo 2. Los péptidos ajenos a los controles (referencias 1-5) se añadieron para probar la selectividad del ensayo. Cada medición se realizó por triplicado. La reproducibilidad de los datos se evaluó analizando la desviación estándar y el coeficiente de variación para todas las mediciones por triplicado.

Prácticamente todos los coeficientes de variación medidos están por debajo de 10 % y la mayoría están por debajo de 5 %, lo que indica una reproducibilidad buena. Se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) a los datos, los valores de p obtenidos mediante la prueba de Wilcoxon (*Pepe, 2003*, arriba) y los valores del área bajo la curva (AUC para una curva de rendimiento diagnóstico (ROC)) se mencionan para cada péptido usado en el ensayo en la Tabla 7 a continuación. Cuanto menor es el valor de p , mejor rendimiento del péptido correspondiente. Cuanto mayor es el AUC por encima de 0,54, más exacto es el ensayo.

Tabla 7

Péptido	Valor de p	AUC
SEQ ID NO: 1	9,4e-7	0,72
SEQ ID NO: 2	6,0e-5	0,68
SEQ ID NO: 3	6,5e-12	0,8
SEQ ID NO: 4	1,4e-9	0,77
SEQ ID NO: 5	4,4e-13	0,82
SEQ ID NO: 6	0,51	0,63
SEQ ID NO: 7	1,1e-5	0,69
SEQ ID NO: 8	0,27	0,55
SEQ ID NO: 9	0,071	0,58
SEQ ID NO: 10	0,0036	0,63
SEQ ID NO: 11	1,9e-5	0,69
SEQ ID NO: 12	4,2e-6	0,7
Referencia 1	0,64	0,52
Referencia 2	0,77	0,51
Referencia 3	0,95	0,5

Los resultados se analizaron adicionalmente usando el análisis de discriminantes lineales (LDA). Los datos de las pacientes se dividieron en dos partes iguales, una que consistía en un conjunto de aprendizaje (usado para entrenar al algoritmo de clasificación) y la otra que era un conjunto de prueba (usado para evaluar el rendimiento del clasificador). Los resultados se presentan en la Fig. 2. La puntuación obtenida con el procedimiento de LDA se usó para clasificar las muestras del conjunto de prueba. Las puntuaciones se indican para casos frente a controles (2A), por subgrupos (2B) y en forma de una curva característica de rendimiento diagnóstico (ROC) (2C). El área bajo la curva (AUC) obtenida fue 0,92, un valor excelente.

Un resumen numérico de los resultados obtenidos para los diferentes umbrales calculados (1 a 21) se presenta en la Tabla 8 a continuación. Los umbrales se eligieron uniformemente dentro del intervalo de puntuaciones posibles (en el intervalo -5 a +5); las columnas FP, PR, NR y FN contiene los números correspondientes de falsos positivos, positivos reales, negativos reales y falsos negativos para el umbral dado; la suma de estos cuatro números es siempre 95 (el número total de muestras en el conjunto de prueba). La especificidad y sensibilidad dadas por $NR/(NR+FP)$ y $PR/(PR+FN)$ miden la exactitud del umbral con respecto al total de muestras positivas y negativas en el conjunto de prueba. El valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) indican la proporción de pacientes con resultado positivo (o negativo, respectivamente) que son diagnosticadas correctamente y se calculan como $PR/(PR+FP)$ y $NR/(NR+FN)$.

Tabla 8

	Umbral	FP	PR	NR	FN	Espec.	Sens.	VPP	VPN
1	-5,35	62	33	0	0	0,00	1,00	0,35	-
2	-4,99	61	33	1	0	0,02	1,00	0,35	1,00
3	-4,28	60	33	2	0	0,03	1,00	0,35	1,00
4	-3,58	59	33	3	0	0,05	1,00	0,36	1,00
5	-2,52	57	33	5	0	0,08	1,00	0,37	1,00

(continuación)

	Umbral	FP	PR	NR	FN	Espec.	Sens.	VPP	VPN
6	-2,16	52	33	10	0	0,16	1,00	0,39	1,00
7	-1,81	47	33	15	0	0,24	1,00	0,41	1,00
8	-1,46	43	33	19	0	0,31	1,00	0,43	1,00
9	-1,10	39	33	23	0	0,37	1,00	0,46	1,00
10	-0,75	32	33	30	0	0,48	1,00	0,51	1,00
11	-0,40	24	32	38	1	0,61	0,97	0,57	0,97
12	-0,04	21	30	41	3	0,66	0,91	0,59	0,93
13	0,31	11	29	51	4	0,82	0,88	0,72	0,93
14	0,66	8	29	54	4	0,87	0,88	0,78	0,93
15	1,02	5	24	57	9	0,92	0,73	0,83	0,86
16	1,37	2	18	60	15	0,97	0,55	0,90	0,80
17	1,72	2	11	60	22	0,97	0,33	0,85	0,73
18	2,08	1	4	61	29	0,98	0,12	0,80	0,68
19	2,43	1	1	61	32	0,98	0,03	0,50	0,66
20	3,14	0	1	62	32	1,00	0,03	1,00	0,66
21	5,26	0	0	62	33	1,00	0,00	-	0,65

- 5 En resumen, el valor medido para cada péptido se multiplica por un determinado peso, la suma de todos estos valores ponderados da la puntuación resultante. Como ilustración de este modelo, la “muestra A” de cáncer de mama tiene una puntuación de 1,29. La Tabla 9 siguiente muestra los pesos obtenidos a partir del modelo de LDA seleccionado como se describió anteriormente para 8 péptidos según la invención y las mediciones correspondientes de esos péptidos para esta muestra A. La aplicación de los pesos a las ocho mediciones genera los resultados siguientes:

Tabla 9

SEQ ID NO:	1	2	3	4	5	6	9	10
Medición	0,59	0,49	0,23	0,50	0,32	0,34	0,60	0,38
Pesos	-1,71	13,11	0,94	-5,89	1,05	-11,86	5,83	-3,37
Combinación	-1,00	6,47	0,22	-2,94	0,33	-3,98	3,47	-1,26

La suma de los valores combinados, de hecho, genera una puntuación de 1,29 (exceptuando errores de redondeo).

Los resultados para todas las muestras de ovario y los controles se analizaron estadísticamente como se describe en Zhou y col., 2002, Statistical Methods in diagnostic medicines, Wiley, NY, para determinar la especificidad y sensibilidad del ensayo. La consistencia del ensayo y el método según la invención se puede resumir como se indica a continuación: 87,3 % de especificidad, 80,3 % de sensibilidad, 74,7 % de valor de predicción positivo, 90,5 % de valor de predicción negativo.

Por lo tanto, un ensayo según la invención presenta valores de selectividad y sensibilidad muy elevados para la detección del cáncer de mama.

5 LISTADO SE SECUENCIAS

<110> AYANDA BIOSYSTEMS S.A:

10 <120> KITS PARA DETECTAR CÁNCER DE MAMA U OVARIO EN UNA MUESTRA DE FLUIDO CORPORAL Y USO DE LOS MISMOS

<130> P1313PC00

15 <150> CH01553/10
<151> 2010-09-24
<160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido p2

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
<223> Xaa es una cisteína o puede estar ausente

35 <220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
<223> Xaa puede ser una cisteína o puede estar ausente

40 <400> 1

	Glu	Gly	Gly	Thr	Met	Pro	Asp	Asn	Arg	Gln	Pro	Arg	Asn	Arg	Xaa
	1				5					10					15

45 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Péptido p8

<220>

55 <221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
<223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

<220>

60 <221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
<223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

<400> 2

Ile Leu Ser Arg Lys Pro Lys Pro Asp Ser Asp Val Thr Gln Xaa

1

5

10

15

5 <210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido p11

<220>
<221> MISC_FEATURE

15 <222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

<400> 3

20

Xaa Ser Val Met Asn Thr Gly Gln Arg Arg Asp Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 4
<211> 14
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido p13

30 <220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)
35 <223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

<400> 4

Val Ala Tyr His Ala Arg Pro Asp Ser Asp Gln Arg Phe Xaa
1 5 10

40 <210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Péptido p16

<220>
50 <221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
<223> Xaa es una cisteína o está ausente

55 <220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

5 <400> 5

Asp Asn Glu Leu Ser Asp Leu Lys Glu Asp Lys Pro Arg Lys Xaa
1 5 10 15

<210> 6

10 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido p21

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (25)..(25)

<223> Xaa puede ser una cisteína o puede estar ausente

<400> 6

Pro Val Cys Tyr Thr Pro Ala Trp Ile Gln Asp Leu Lys Ile Asn Arg
1 5 10 15

Gln Leu Asp Ser Met Ile Gln Leu Xaa
20 25

25

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido p24

35 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

40

<400> 7

Lys Ala Gly Arg Cys Arg Ile Ile Gly Xaa
1 5 10

45 <210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Péptido p25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

5

<400> 8

Met	Val	Ala	Val	Pro	Gly	Pro	Thr	Val	Ala	Pro	Arg	Xaa
1				5					10			

10 <210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido p34

<220>

<221> MISC_FEATURE

20

<222> (11)..(11)

<223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

<400> 9

25

Leu	Arg	Cys	Ser	Arg	Cys	Asn	Ile	Phe	Gly	Xaa
1				5					10	

<210> 10

<211> 11

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido p35

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

40 <223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

<400> 10

Ala	Ala	Arg	Val	Gly	Val	Lys	Ala	Cys	Leu	Xaa
1				5					10	

45

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Péptido p36

<220>

55 <221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es una cisteína o está ausente

<220>
<221> MISC_FEATURE

5 <222> (11)..(11)
<223> Xaa puede ser una cisteína o está ausente

<400> 11

Leu Arg Cys Ser Arg Cys Asn Ile Phe Gly Xaa
1 5 10

10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido p37

20 <220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)
<223> Xaa puede ser una cisteína o estar ausente

25

<400> 12

His Ile Phe Cys Ser Asn Ile Phe Gly Leu Xaa
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo que difiere en secuencia de la secuencia de aminoácidos seleccionada anteriormente en una delección o inserción y donde dicho péptido o variante se une a uno o más autoanticuerpos circulantes asociados al cáncer de mama u ovario de un sujeto mamífero.
2. Un péptido aislado según la reivindicación 1 que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.
3. Un inmunoensayo para la detección de un cáncer de mama u ovario que comprende al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
4. Un método para detectar un cáncer de mama u ovario a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero;
 - (b) poner dicha muestra de fluido biológico en contacto con una matriz sólida a la que está unido al menos un péptido, donde la puesta en contacto es en condiciones adecuadas para unir un anticuerpo presente en dicha muestra de fluido biológico a dicho al menos un péptido mediante interacciones antígeno-anticuerpo y donde dicho al menos un péptido tiene una secuencia de aminoácidos de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2;
 - (c) retirar la muestra de fluido biológico para retirar de la matriz sólida todos los anticuerpos no unidos de la superficie de dicha matriz sólida;
 - (d) detectar la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo unido a dicha matriz sólida, donde la presencia de dicho complejo es indicativa de que la muestra de fluido biológico contiene uno o más anticuerpos endógenos asociados al cáncer de mama u ovario.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que una combinación de péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 está unida a dicha matriz sólida.
6. Un método según las reivindicaciones 4 o 5 para detectar un cáncer de mama a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero donde dicha muestra de fluido biológico se pone en contacto con dicha matriz sólida en la etapa b), en la que una combinación de péptidos o de variantes de los mismos se une a dicha matriz sólida y en la que la combinación comprende: a) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo que difiere en secuencia de la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 en una delección o inserción; y b) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 5 o de SEQ ID NO: 10 o una variante del mismo que difiere en secuencia de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 10 en una delección o inserción; donde dicho péptido o variante se une a uno o más autoanticuerpos circulantes asociados al cáncer de mama u ovario de un sujeto mamífero.
7. Un método según las reivindicaciones 4 o 5 para detectar un cáncer de ovario a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero donde dicha muestra de fluido biológico se pone en contacto con dicha matriz sólida en la etapa b), en la que una combinación de péptidos o de variantes de los mismos se une a dicha matriz sólida y en la que la combinación comprende: a) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo que difiere en secuencia de la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 en una delección o inserción; y b) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 4 o una variante del mismo que difiere en secuencia de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 en una delección o inserción; donde dicho péptido o variante se une a uno o más autoanticuerpos circulantes asociados al cáncer de mama u ovario de un sujeto mamífero.
8. Un kit para detectar un biomarcador para un cáncer de mama u ovario en una muestra de fluido biológico, comprendiendo el kit al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o una combinación de los mismos para acoplarlo, o ya acoplado, a una matriz de soporte sólido.
9. Un kit según la reivindicación 8, donde la matriz sólida comprende pocillos de microtitulación.
10. Uso de un kit según las reivindicaciones 8 o 9 para detectar un cáncer de mama u ovario a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto mamífero.
11. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en un ensayo para la detección de un cáncer de mama u ovario.
12. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para el revestimiento de una matriz sólida para realizar un inmunoensayo.

13. Un kit según la reivindicación 8 o 9, que comprende a) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo que difiere en secuencia de la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 en una delección o inserción; y b) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 5 o de SEQ ID NO: 10 o una variante del mismo, que difiere en secuencia de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 10 en una delección o inserción; donde dicho péptido o variante se une a uno o más autoanticuerpos circulantes asociados al cáncer de mama u ovario de un sujeto mamífero.

14. Un kit según la reivindicación 8 o 9, que comprende a) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 o una variante del mismo que difiere en secuencia de la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12 en una delección o inserción; y b) al menos un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 4 o una variante del mismo que difiere en secuencia de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 en una delección o inserción; donde dicho péptido o variante se une a uno o más autoanticuerpos circulantes asociados al cáncer de mama u ovario de un sujeto mamífero.

A

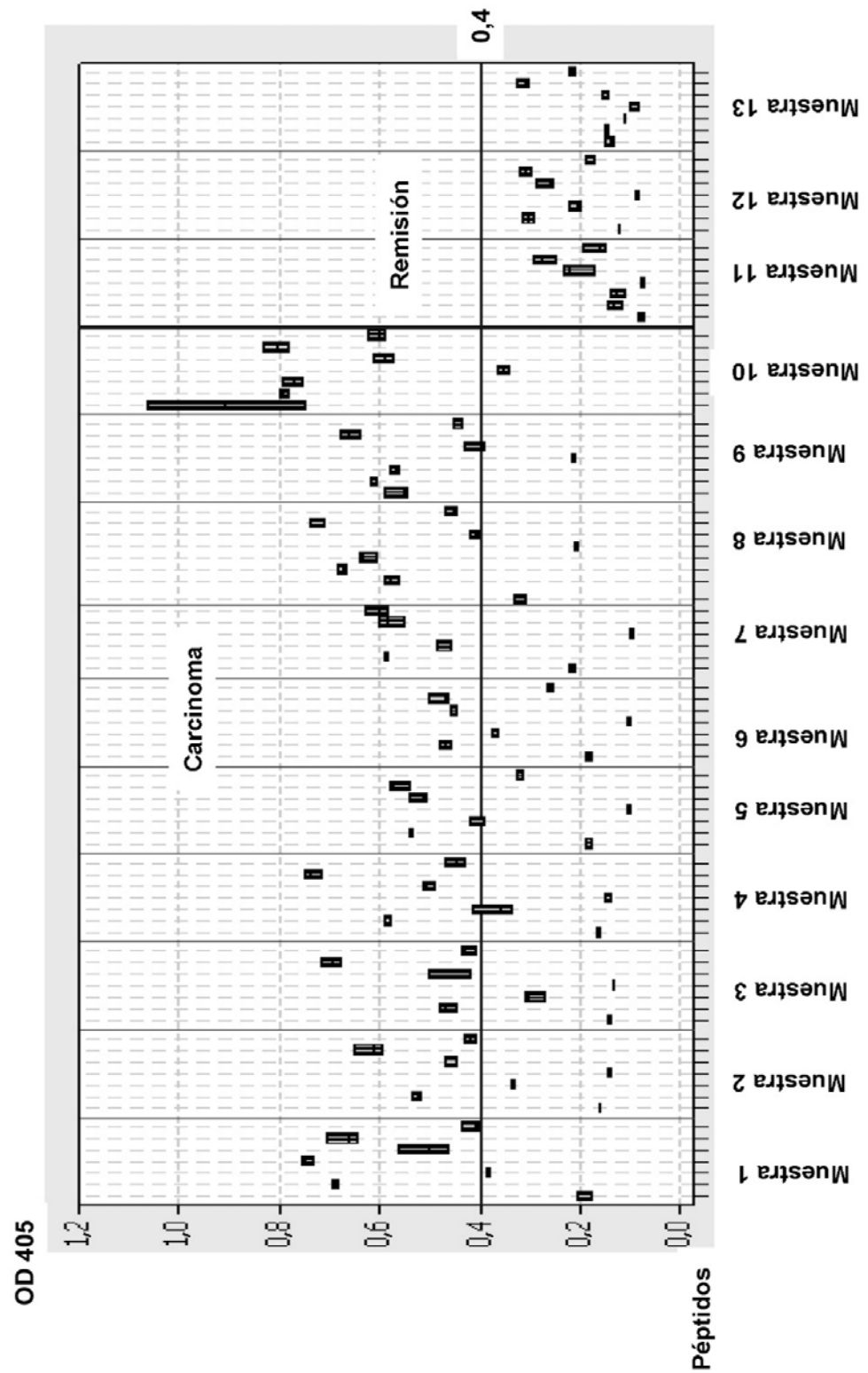


Figura 1

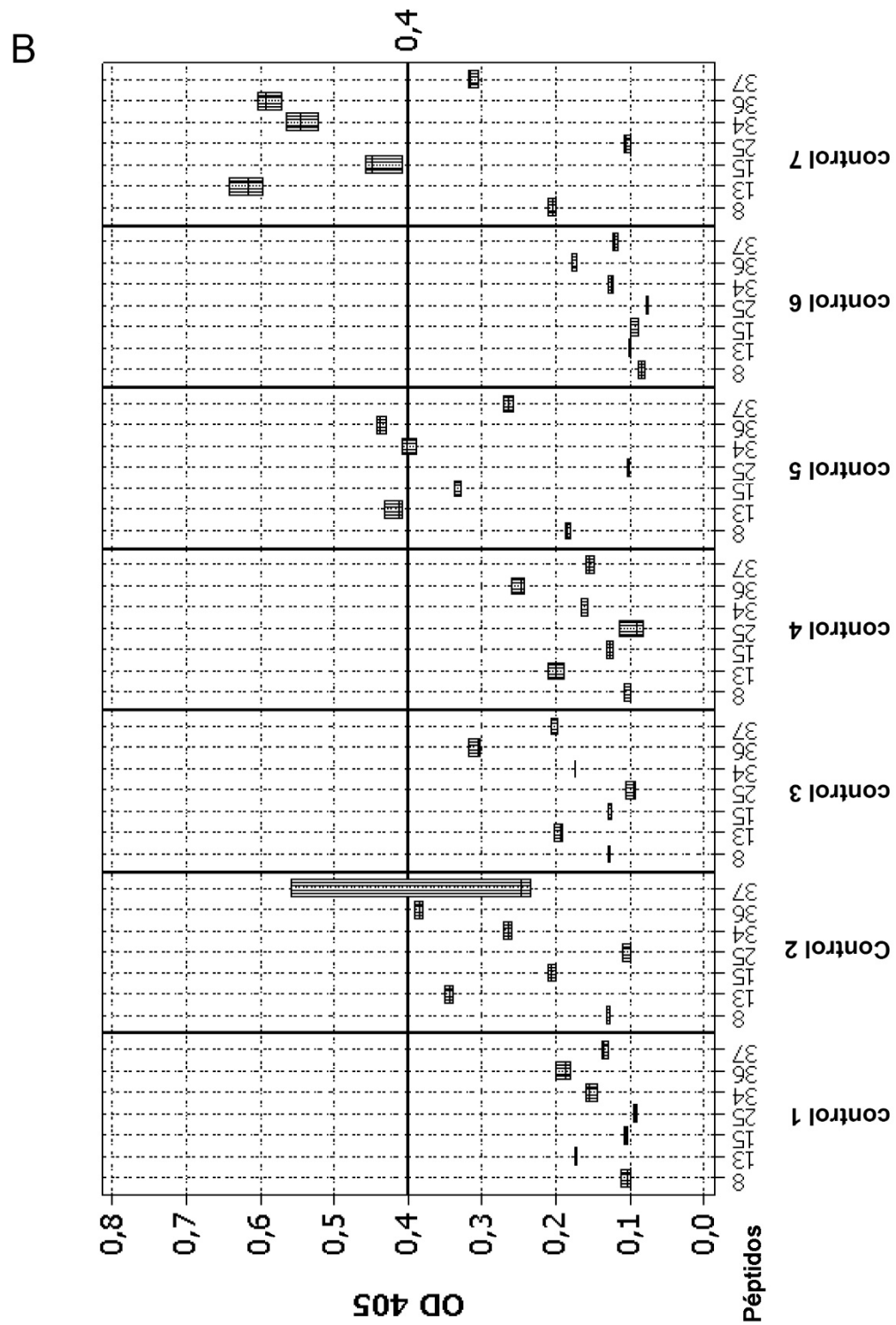


Figura 1

C

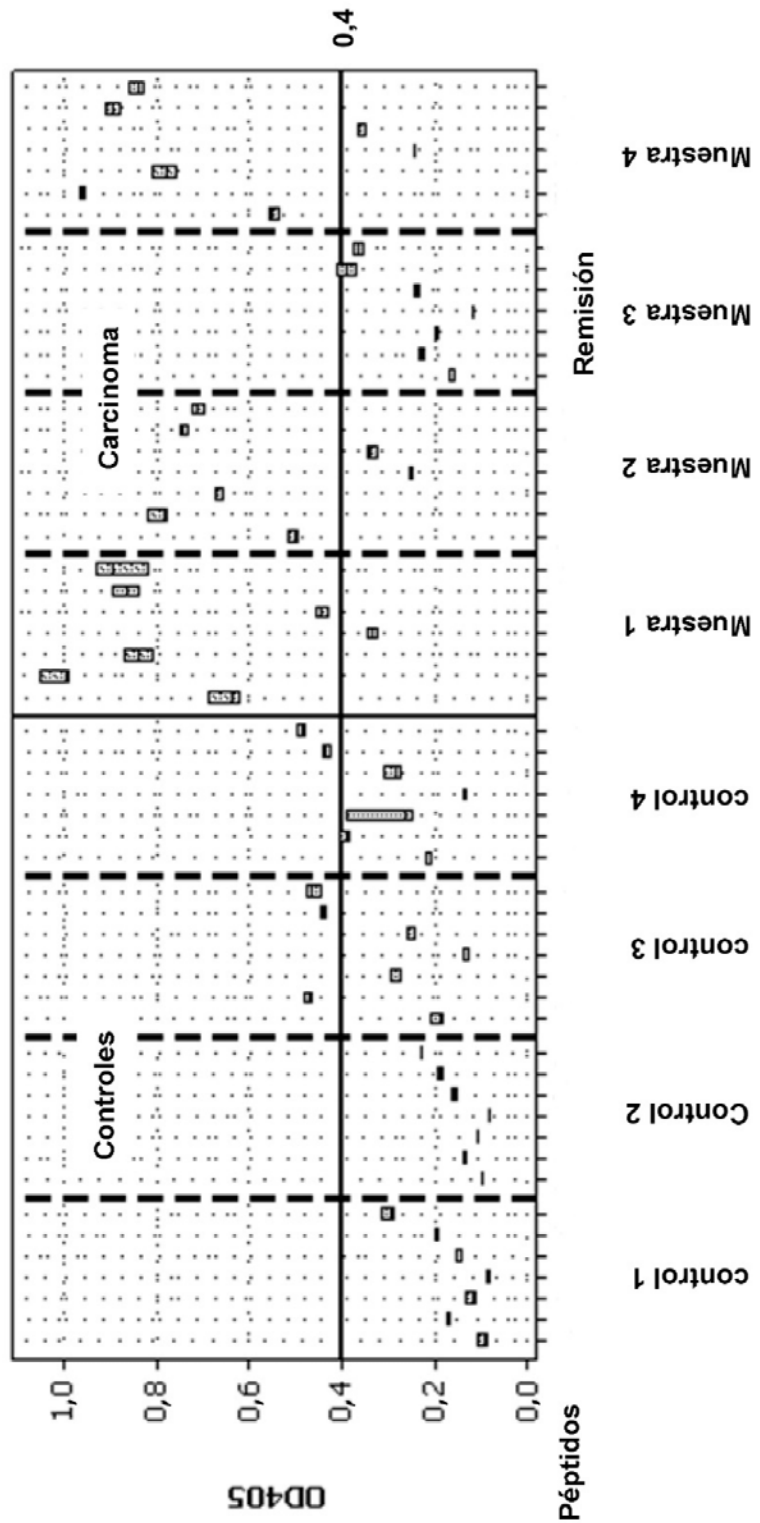
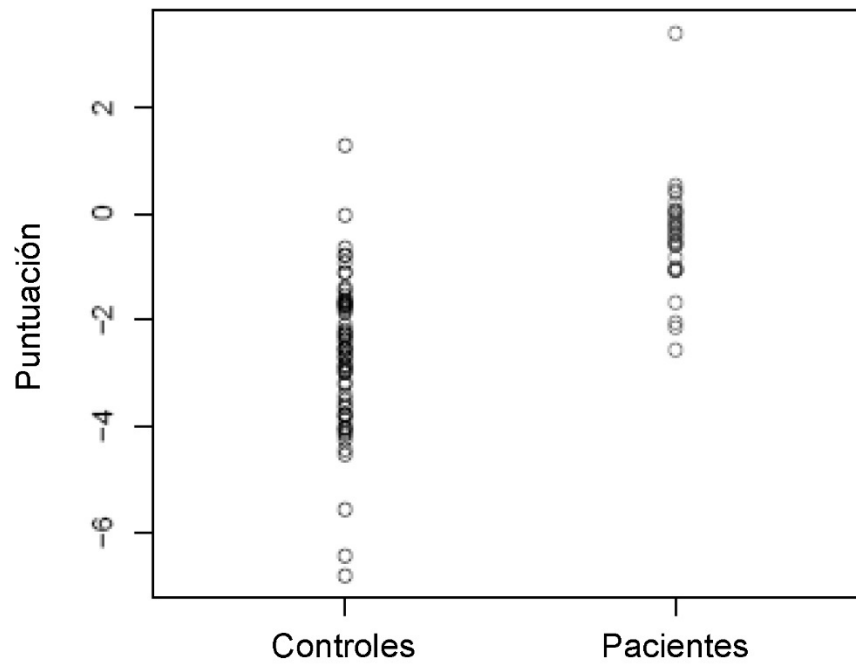


Figura 1

A



B

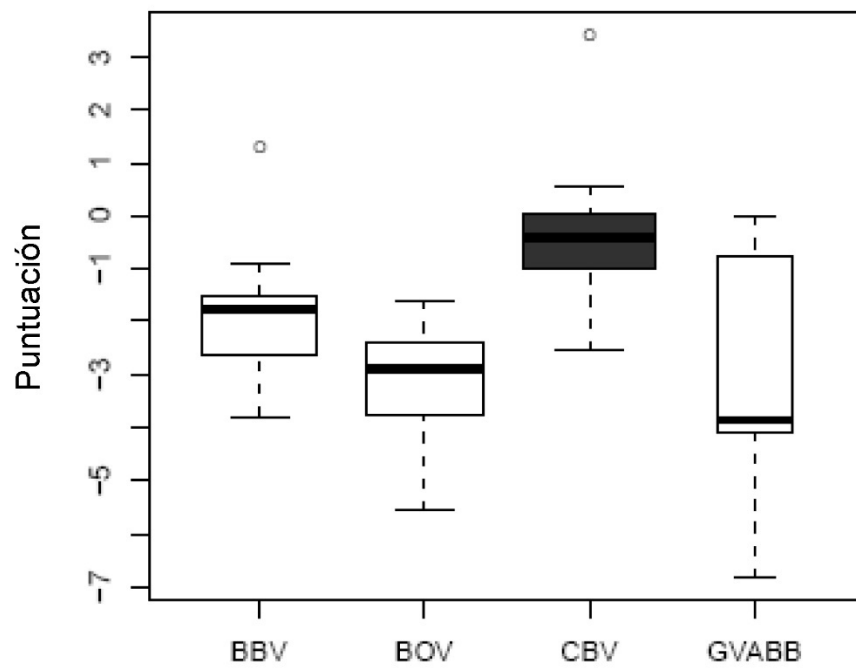


Figura 2

C

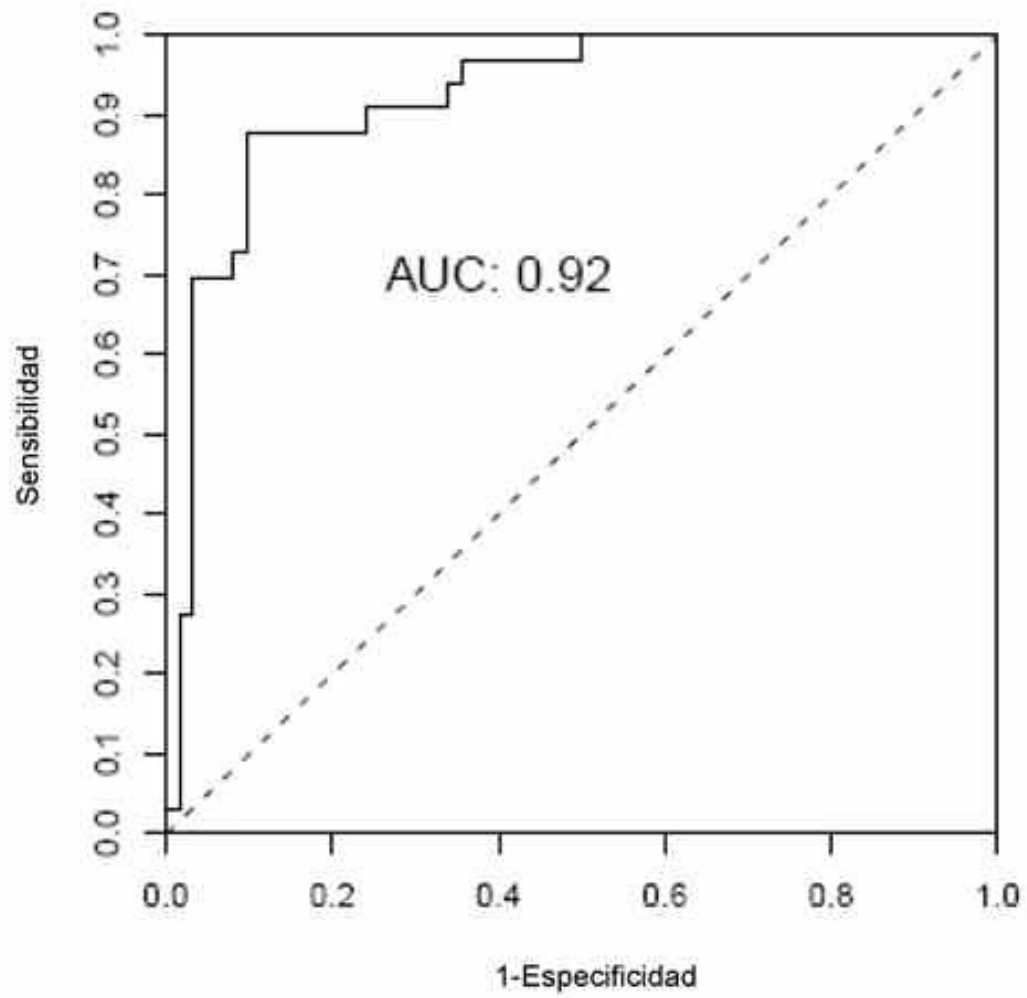


Figura 2