

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 490**

51 Int. Cl.:
G01N 31/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08728418 .8**
96 Fecha de presentación: **28.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2111550**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2009**

54 Título: **Métodos de detección de autoanticuerpos para diagnosticar y caracterizar trastornos**

30 Prioridad:
26.01.2007 US 897641 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.04.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH
FOUNDATION, INC.
OFFICE OF THE TECHNOLOGY TRANSFER MED
CENTER THREE 201 E. JEFFERSON ST., STE 2
LOUISVILLE, KY 40202, US**

72 Inventor/es:
**TAYLOR, Douglas D. y
GERCEL-TAYLOR, Cicek**

74 Agente/Representante:
Arizti Acha, Monica

ES 2 378 490 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de detección de autoanticuerpos para diagnosticar y caracterizar trastornos

CAMPO TÉCNICO

5 La materia dada a conocer en este documento se refiere al diagnóstico y a la caracterización de trastornos en un sujeto mediante la detección de autoanticuerpos. En particular, la materia dada a conocer en este documento se refiere a la utilización de antígenos, incluyendo en algunas realizaciones antígenos aislados de exosomas producidos por células, para detectar autoanticuerpos en sujetos para diagnosticar o caracterizar cáncer y/o esterilidad y otros trastornos en el sujeto.

ANTECEDENTES

10 Muchos trastornos pueden tratarse y/o prevenirse más eficazmente si se diagnostican en un estadio temprano. Esto es particularmente cierto para el cáncer. Por ejemplo, el cáncer de ovarios en estadio I puede curarse en el 90% de los casos, mientras que la supervivencia a cinco años para pacientes con enfermedad avanzada (estadios III y IV) es inferior al 21%. Por tanto, las perspectivas de mejora en la supervivencia del cáncer residen en el diagnóstico temprano. De manera similar, otros trastornos podrían diagnosticarse posiblemente más temprano y/o determinarse mejor el pronóstico para tratamientos si estuviesen disponibles pruebas de diagnóstico temprano más sensibles. Como otro ejemplo particular, es de notoria dificultad diagnosticar y definir trastornos de esterilidad antes de que aparezcan dificultades notificadas con el inicio o mantenimiento hasta el final de un embarazo viable. Ensayos de diagnóstico más sensibles y específicos podrían proporcionar un mejor diagnóstico de los trastornos de esterilidad y el pronóstico de los tratamientos de la esterilidad.

20 Los ensayos de diagnóstico actuales para muchos trastornos, incluyendo cáncer por ejemplo, se basan en antígenos y dependen de la detección de proteínas circulantes asociadas con el trastorno. Estos ensayos dependen de la expresión, síntesis y liberación de proteínas específicas por células (por ejemplo, células tumorales) o bien mediante diseminación o secreción activa o bien como consecuencia de muerte celular (o bien necrosis o bien apoptosis). Estas proteínas antigénicas deben "escapar" del sitio primario de la enfermedad, saturar la capacidad de procesamiento de antígenos de los componentes inmunitarios del individuo, obtener acceso a la circulación y alcanzar una concentración en estado estacionario suficiente para detectarse por inmunoensayos basados en enzimas o radiomarcadores. Estos acontecimientos se producen habitualmente bastante después del establecimiento inicial de la enfermedad (por ejemplo, un acontecimiento de transformación neoplásica y desarrollo de focos tumorales).

30 Por tanto, los ensayos basados en antígenos actuales no pueden detectar realmente estadios tempranos de un trastorno de interés. Para mejorar significativamente los ensayos de diagnóstico para trastornos de interés, hay una necesidad no satisfecha de un nuevo enfoque para la detección de trastornos que sea más sensible a la presencia de marcadores de enfermedad temprana en el establecimiento del trastorno.

35 En Taylor D. D. *et al.*, "Identification of Antigenic Components recognised by membrane bound antibodies from ovarian cancer patients", *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 6, n.º 4, 1 de diciembre de 1984, págs. 179-184, los autores describen el uso de inmunoglobulinas, elegidas de fragmentos de membrana derivados de fluido de ascitis para identificar antígenos con los que reaccionan a partir de pacientes con cáncer de ovarios. Se encontró que las inmunoglobulinas se unen a antígenos de tumores de ovarios pero no de ovarios normales.

40 En Draghia Soren, *et al.*, "Epitomics: serum screening for the early detection of cancer on microarrays using complex panels of tumour antigens", *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol 5, n.º 5, septiembre de 2005, págs. 735-743, los autores describen la producción y el uso de un panel de epítomos/antígenos que reaccionan con autoanticuerpos frente a proteínas tumorales en la búsqueda de pacientes con cáncer de ovarios.

45 En Taylor D.D. *et al.*, "Shed membrane fragment-associated markers for endometrial and ovarian cancers", *Gynecologic Oncology*, vol 84, n.º 3, marzo de 2002, págs. 443-448, los autores evalúan fragmentos de membrana derivados de tumores circulantes y proteínas asociadas con los mismos como marcadores para diagnosticar o monitorizar la evolución de cánceres de ovarios y endometrial.

En Taylor D.D. *et al.*, "Tumour-derived exosomas and their role in cancer associated T-cell signalling defects". *British Journal of Cancer*, vol 92, n.º 2, 31 de enero de 2005, págs. 305-311, los autores describen la actividad de exosomas derivados de tumores y su efecto sobre linfocitos T.

SUMARIO

50 La materia dada a conocer en este documento proporciona en algunas realizaciones un método para diagnosticar un trastorno asociado con la producción de autoanticuerpos en un sujeto. El método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto y poner en contacto un antígeno con la muestra. El antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos aislado de un exosoma. El método comprende además detectar autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno y

comparar un nivel de inmunorreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno con un nivel de referencia para diagnosticar el trastorno en el sujeto.

5 La materia dada a conocer en este documento proporciona adicionalmente todavía en algunas realizaciones un método para caracterizar un trastorno asociado con la producción de autoanticuerpos en un sujeto. El método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto y poner en contacto un antígeno con la muestra. El antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos aislado de un exosoma. El método comprende además detectar los autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno y cuantificar un nivel de inmunorreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno para caracterizar de ese modo el trastorno en el sujeto.

10 En algunas realizaciones de los métodos para diagnosticar o caracterizar trastornos, el trastorno es un cáncer o un trastorno de esterilidad. En algunas realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento, el trastorno es un cáncer epitelial o un adenocarcinoma. Además, en algunas realizaciones, el antígeno comprende un péptido de antígeno de cáncer seleccionado del grupo que consiste en p53, p63, p73, mdm-2, procatepsina-D, B23, C23, PLAP, cerB/HER2, NY-ESO-1, SCP1, SSX-1, SSX-2, SSX-4, HSP10, HSP27, HSP60, HSP90, GRP78, HoxA7, HoxB7, EpCAM, c-ras, mesotelina, survivina, una mucina, EGF cinasa, c-myc, nucleofosmina y TAG 72. En algunas realizaciones del método, el trastorno es un trastorno de esterilidad seleccionado del grupo que consiste en insuficiencia ovárica prematura (IOP), síndrome de ovario poliquístico (SOP), endometriosis, preeclampsia, nacimiento prematuro, restricción del crecimiento intrauterino y pérdida del embarazo recurrente.

20 En algunas realizaciones de los métodos, la muestra biológica comprende leche, sangre, suero, plasma, ascitis, fluido quístico, fluido pleural, lágrimas, orina, saliva, tejido o combinaciones de los mismos. Además, en algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero.

25 En algunas realizaciones de los métodos dados a conocer en este documento, el exosoma se aísla de una célula, que puede ser en algunas realizaciones una célula cultivada. En alguna realización, la célula es una célula cancerosa, tal como por ejemplo, una célula de cáncer de ovarios, una célula de cáncer cervical, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer endometrial, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de pulmón, una célula de melanoma, una célula de cáncer pancreático, o una célula de coriocarcinoma. En algunas realizaciones particulares, la célula es una célula UL-1, una UL-2, una célula UL-3 o una célula UL-6. En algunas realizaciones particulares, la célula es una célula de placenta.

30 En algunas realizaciones de los métodos dados a conocer en este documento, la detección comprende una técnica seleccionada del grupo que consiste en ELISA, RIA, inmunoensayo múltiplex, inmunoprecipitación e inmunotransferencia de tipo Western.

35 La materia dada a conocer en este documento proporciona adicionalmente todavía en algunas realizaciones el uso de un kit para detectar autoanticuerpos en una muestra. El kit comprende un antígeno de péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos y un recipiente para contener el antígeno. El antígeno se aísla de un exosoma en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, el antígeno está unido a un soporte. En algunas realizaciones, el soporte es una placa de microtitulación, una membrana (nitrocelulosa, PVDF o material similar), una perla de poliestireno, un tubo de ensayo o una tira reactiva. En algunas realizaciones, el kit comprende una preparación de anticuerpos que se une a un autoanticuerpo. Además, en algunas realizaciones, la preparación de anticuerpos comprende un marcador detectable. Todavía adicionalmente, en algunas realizaciones el marcador detectable comprende un radiomarcador, una enzima, biotina, un colorante, un marcador de etiqueta fluorescente, un hapteno o un marcador luminiscente.

40 Por consiguiente, es un objeto de la materia dada a conocer en este documento proporcionar métodos de detección de autoanticuerpos para diagnosticar y caracterizar trastornos. Este objeto se logra en su totalidad o en parte mediante la materia dada a conocer en este documento.

45 Habiéndose establecido anteriormente en el presente documento un objeto de la materia dada a conocer en este documento, y que se logra en su totalidad o en parte mediante la materia dada a conocer en este documento, otros objetos y ventajas resultarán evidentes para los expertos habituales en la técnica tras un estudio de la siguiente descripción de la materia, las figuras y los ejemplos no limitativos dados a conocer en este documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 La figura 1 es un gráfico que muestra la correlación de inmunoglobulinas reactivas con tumores en pacientes con cáncer con el estadio de la enfermedad, en comparación con controles que no tienen tumores normales.

Las figuras 2A y 2B son fotografías que muestran la inmunorreactividad de inmunoglobulinas presentes en los sueros de pacientes con cáncer de ovarios representativos (2A = estadio II y 2B = estadio IV) con antígenos celulares derivados de epitelio de ovarios normal (NO) y 3 líneas celulares de tumor de ovarios (UL1, UL3 y UL6). Los recuadros designan zonas de interés.

55 Las figuras 3A-3D son una serie de fotografías que muestran análisis electroforéticos bidimensionales de diferencias de patrón de reconocimiento en pacientes que responden a cisplatino. Las figuras 3A-3D presentan una parte de las

transferencias bidimensionales usando antígenos de UL-6 como dianas y sueros de pacientes con adenocarcinoma quístico en estadio IIIc del ovario. Los pacientes A y B (figuras 3A y 3B, respectivamente) respondieron a cisplatino, mientras que los pacientes C y D (figuras 3C y 3D, respectivamente) no respondieron.

5 Las figuras 4A y 4B son gráficos que muestran perfiles de alineamientos de proteínas de 2 pacientes con cáncer de ovarios. Las proteínas celulares inmunoprecipitadas a partir de la línea celular de tumor de ovarios UL-1 se separaron mediante RP-HPLC y las proteínas se unieron a membranas MAGNAGRAPH. Se identificaron proteínas inmunorreactivas incubando los pocillos con sueros de pacientes con cáncer de ovarios, definidos como píxeles determinados mediante densitometría.

10 La figura 5 es una ilustración de un patrón de inmunorreactividad mediante autoanticuerpos reactivos con tumores derivados de pacientes.

La figura 6 es un gráfico que muestra el porcentaje de sueros de mujeres voluntarias normales (control), mujeres con enfermedad ovárica benigna y mujeres con cáncer de ovarios invasivo que presentan autoanticuerpos reactivos con antígenos (enumerados en la tabla 1) en un alineamiento de proteínas.

15 La figura 7 es una serie de fotografías que muestran microalineamientos de proteínas sin procesar que demuestran IgG reactiva en mujeres con cáncer de ovarios en estadio temprano frente a tardío.

La figura 8A es una serie de fotografías que muestran la reactividad de antisueros de pacientes con cáncer cervical con antígenos celulares.

La figura 8B es un gráfico que muestra la reactividad de antígenos derivados de líneas celulares de cáncer cervical con sueros de pacientes.

20 La figura 9 es una serie de fotografías y un gráfico que muestran el efecto del ácido retinoico sobre la reactividad de antígenos solubles liberados de células de cáncer cervical.

La figura 10 es una serie de fotografías y un gráfico que muestran el efecto del ácido retinoico sobre la reactividad de antígenos asociados con células liberados de células de cáncer cervical.

25 La figura 11 es una serie de gráficos que muestran la inmunorreactividad de sueros de diferentes pacientes con diversos estadios de cáncer, enfermedad benigna o controles normales frente a diferentes antígenos de péptidos inmunorreactivos con autoanticuerpos.

La figura 12 es una serie de gráficos que muestran la inmunorreactividad de sueros de sujetos control y pacientes con diversos tipos de cánceres diferentes frente a diferentes antígenos de péptidos inmunorreactivos con autoanticuerpos.

30 La figura 13 es una serie de fotografías que muestran diferencias en epítomos antigénicos en antígenos recombinantes en lugar de antígenos derivados de exosomas naturales contra sueros de diferentes pacientes con cáncer.

La figura 14 es un gráfico que muestra los resultados del ELISA de la inmunorreactividad de sueros de pacientes, a los que se les diagnostica endometriosis en estadio I, II o III frente a controles normales, contra antígenos celulares derivados de compartimentos subcelulares del endometrio. Los antígenos se aislaron de las fracciones de membrana, nuclear y citosólica de células endometriales y se acoplaron a pocillos de placas de microtitulación.

35 La figura 15 es una serie de fotografías que muestran inmunotransferencias de tipo Western de antígenos celulares de endometrio y ovario reconocidos por la respuesta humoral autorreactiva.

40 Las figuras 16A-16C son una serie de fotografías que muestran partes de reconocimiento inmunitario representativo de antígenos de membranas endometriales separados mediante electroforesis bidimensional por sueros de pacientes con endometriosis en estadio II y III. Se aislaron proteínas de Hec-1A, línea celular de tumor endometrial. Se cargaron proteínas de membrana solubilizadas (100 mg) en una tira de isoelectroenfoque PH 3-10 y tras procesar la tira se aplicó a la parte superior de un gel de acrilamida SDS-PAGE al 10-20%. Tras la SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas a nitrocelulosa y se sometieron a inmunotransferencia.

La figura 17 es una serie de fotografías que muestran patrones de reactividad serológica de sueros obtenidos de mujeres a las que se les diagnostica trastornos de esterilidad contra antígenos celulares derivados del endometrio.

45 La figura 18 es una serie de fotografías que muestran inmunotransferencias de tipo Western que demuestran la presencia de autoanticuerpos producidos durante el embarazo en partos con final normal y pérdida del embarazo recurrente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 Los detalles de una o más realizaciones de la materia dada a conocer en este documento se exponen en la descripción adjunta a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la materia dada a conocer en este documento resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, los ejemplos y las reivindicaciones. Todas las publicaciones,

publicaciones de patentes, patentes y otras referencias citadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá.

Siguiendo la convención de leyes de patentes de larga tradición, los términos “un”, “una” y “el/la” significan “uno o más” cuando se usan en esta solicitud, incluyendo en las reivindicaciones.

5 A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción y etcétera usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones debe entenderse que están modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la materia dada a conocer en este documento.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente”, cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje pretende abarcar variaciones de en algunas realizaciones $\pm 20\%$, en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0,5\%$ y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar el método dado a conocer.

15 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la materia dada a conocer en este documento. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los dados a conocer en el presente documento en la práctica o las pruebas de la materia dada a conocer en este documento, se describen ahora métodos, dispositivos y materiales representativos.

20 Se ha determinado que ciertos trastornos se caracterizan por la producción de autoanticuerpos en el sujeto aquejado. Es decir, el sistema inmunitario del sujeto se estimula para producir anticuerpos contra antígenos propios (en contraposición a antígenos foráneos, tales como antígenos únicos en un microorganismo invasor). Los antígenos con los que los autoanticuerpos inmunorreaccionan pueden tener en algunos casos epítomos alterados debido a cambios en la secuencia primaria o procesamiento postraduccional (por ejemplo, tal como puede producirse en cáncer), pero también pueden ser inmunológicamente idénticos al antígeno normal. En cualquier caso, se ha descubierto que la producción de autoanticuerpos puede correlacionarse con la presencia de un trastorno y puede incluso proporcionar información para caracterizar el trastorno. La materia dada a conocer en este documento proporciona métodos novedosos para detectar y/o cuantificar los niveles de autoanticuerpos en sujetos, lo que puede correlacionarse con la presencia de un trastorno en el sujeto y/o la caracterización del trastorno. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la materia dada a conocer en este documento, se proporcionan métodos para diagnosticar y/o caracterizar un cáncer o trastorno de esterilidad en un sujeto que está asociado con la producción de autoanticuerpos.

I. Métodos para detectar y cuantificar los niveles de autoanticuerpos

35 La materia dada a conocer en este documento proporciona métodos para detectar y/o cuantificar los niveles de autoanticuerpos en un sujeto, lo que se utiliza en algunas realizaciones para diagnosticar y/o caracterizar trastornos en sujetos que están asociados con la producción de autoanticuerpos.

40 En algunas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto y entonces poner en contacto un antígeno con la muestra. El antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos. El método comprende entonces detectar y/o cuantificar un nivel de los autoanticuerpos en la muestra que son inmunorreactivos con el antígeno. En algunas realizaciones, la muestra biológica puede comprender, por ejemplo, leche, sangre, suero, plasma, ascitis, fluido quístico, fluido pleural, saliva, lágrimas, orina, tejido o combinaciones de los mismos.

45 Además, se proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado con la producción de autoanticuerpos en un sujeto basándose en la detección de autoanticuerpos en el sujeto. El método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto; poner en contacto un antígeno con la muestra, en el que el antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos; detectar los autoanticuerpos en la muestra inmunoreactiva con el antígeno; y comparar un nivel de inmunoreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno con un nivel de referencia para diagnosticar el trastorno en el sujeto.

50 Los términos “diagnosticar” y “diagnóstico” tal como se usan en el presente documento se refieren a métodos mediante los cuales el experto puede estimar e incluso determinar si un sujeto padece o no un estado o trastorno dado. El experto a menudo hace un diagnóstico basándose en uno o más indicadores de diagnóstico, tales como por ejemplo un autoanticuerpo, cuya cantidad (incluyendo presencia o ausencia) es indicativa de la presencia, gravedad o ausencia del estado.

55 Junto con el diagnóstico, el pronóstico clínico es también un área de gran preocupación e interés. Es importante conocer la gravedad del trastorno (por ejemplo, la agresividad de las células cancerosas y la probabilidad de recidiva tumoral) con el fin de planear la terapia más eficaz. La medición de autoanticuerpos puede ser útil con el fin de separar los

sujetos con buen pronóstico que no necesitarán terapia adicional de aquéllos que es más probable que puedan beneficiarse de tratamientos más intensos.

Como tal, "hacer un diagnóstico" o "diagnosticar", tal como se usa en el presente documento, incluye además de hacer un pronóstico, que puede proporcionar la predicción de un desenlace clínico (con o sin tratamiento médico), seleccionar un tratamiento apropiado (o si el tratamiento sería eficaz), o monitorizar un tratamiento actual y posiblemente cambiar el tratamiento, basándose en la medición de un autoanticuerpo de diagnóstico.

Además, en algunas realizaciones de la materia dada a conocer en este documento, puede hacerse una determinación múltiple de los autoanticuerpos a lo largo del tiempo para facilitar el diagnóstico/pronóstico. Puede usarse un cambio temporal en los niveles de autoanticuerpos para predecir un desenlace clínico, monitorizar la evolución del trastorno y/o la eficacia de terapias apropiadas dirigidas contra el trastorno. En una realización de este tipo, por ejemplo, podría esperarse observar una disminución en la cantidad de autoanticuerpos (y posiblemente uno o más biomarcador(es) adicional(es), si se monitoriza(n)) en una muestra biológica a lo largo del tiempo durante el transcurso de la terapia eficaz.

Correlacionar un nivel, tal como un nivel aumentado, de autoanticuerpos con un nivel de referencia o "nivel normal" para diagnosticar y/o caracterizar un trastorno se refiere a una comparación de los niveles de autoanticuerpos (presencia y/o ausencia cuantitativa) con los niveles esperados (incluyendo pero sin limitarse a que no se detecten autoanticuerpos) en un sujeto libre del trastorno. Un cambio, tal como un aumento, con respecto a niveles normales se refiere a un resultado que cambia, por ejemplo aumenta, en más del margen de error inherente en la técnica de medición cuando se compara la muestra con una muestra libre de enfermedad similar en condiciones por lo demás comparables. En algunas realizaciones, un nivel aumentado de autoanticuerpos detectados en el sujeto de prueba está en aproximadamente un 10% o más por encima de una presencia "normal" de referencia. En algunas realizaciones, un nivel aumentado de autoanticuerpos detectados en el sujeto de prueba en aproximadamente un 20% o más, en algunas realizaciones un nivel aumentado de autoanticuerpos detectados en el sujeto de prueba en aproximadamente un 25% o más, y en algunas realizaciones un nivel aumentado de autoanticuerpos detectados en el sujeto de prueba en aproximadamente un 50% o más es una presencia aumentada de autoanticuerpos, que puede correlacionarse con la presencia del trastorno en el sujeto.

Además, en algunas realizaciones de la materia dada a conocer en este documento, se proporciona un método para caracterizar un trastorno asociado con la producción de autoanticuerpos en un sujeto. "Caracterizar", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a detectar la presencia de un trastorno o determinar la gravedad de un trastorno, tal como por ejemplo determinar un estadio del cáncer. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto; poner en contacto un antígeno con la muestra, en el que el antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos; detectar los autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno; y cuantificar un nivel de inmunoreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno para caracterizar de ese modo el trastorno en el sujeto.

Los términos "inmunorreaccionar" e "inmunorreactivo", tal como se usan en el presente documento y con respecto a la unión a anticuerpos, se refieren a la unión específica por las regiones variables de anticuerpos a epítopos específicos de antígenos.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína", que se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a un polímero de los 20 aminoácidos de proteínas, o análogos de aminoácidos, independientemente de su tamaño o función. Aunque "proteína" se usa a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y "péptido" se usa a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se solapa y varía. El término "péptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas, a menos que se indique otra cosa. Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan de manera intercambiable en el presente documento cuando se refieren a un producto génico. Por tanto, los polipéptidos a modo de ejemplo incluyen productos génicos, proteínas que se producen de manera natural, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores.

En algunas realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento, detectar los autoanticuerpos en la muestra puede incluir unir los autoanticuerpos a un antígeno y entonces detectar o bien el acontecimiento de unión o bien la presencia del autoanticuerpo aislado a partir de la muestra biológica. Las técnicas a modo de ejemplo para detectar los autoanticuerpos incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo múltiple, inmunoprecipitación e inmunotransferencia (incluyendo, por ejemplo, inmunotransferencia de tipo Western y transferencia puntual).

Se han descrito diversos métodos de inmunodetección útiles en la bibliografía científica, tal como Nakamura *et al.* (En: Handbook of Experimental Immunology (4ª ed.), Weir *et al.* (eds). Vol. 1, capítulo 27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987; incorporado en el presente documento como referencia). Los inmunoensayos, en su sentido más sencillo y directo, son ensayos de unión. Los inmunoensayos a modo de ejemplo incluyen los diversos tipos de ELISA, RIA e inmunoensayos múltiple. La detección inmunohistoquímica usando secciones de tejido también es particularmente útil. Sin embargo, se apreciará fácilmente que la detección no se limita a tales técnicas, y también pueden usarse

inmunotransferencia de tipo Western, transferencia puntual, análisis de FACS, reacciones de precipitina y similares conjuntamente con la materia dada a conocer en este documento.

En general, con respecto a los presentes métodos, los métodos de unión inmunitaria incluyen obtener una muestra que se sospecha que contiene un anticuerpo y poner en contacto la muestra con un antígeno (por ejemplo un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos) según la presente materia en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos.

Poner en contacto la muestra biológica elegida con el antígeno en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos primarios) es generalmente una cuestión de añadir la composición a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo suficientemente largo como para que los anticuerpos formen inmunocomplejos con los antígenos presentados. Tras este tiempo, la mezcla de antígenos-anticuerpos puede lavarse para eliminar cualquier especie de anticuerpo no unida específicamente, lo que permite que se detecten sólo los anticuerpos unidos específicamente dentro de los inmunocomplejos primarios.

En general, la detección de la formación de inmunocomplejos puede lograrse a través de la aplicación de numerosos enfoques. Estos métodos se basan generalmente en la detección de una etiqueta o un marcador, tal como cualquier etiqueta o marcador radiactivo, fluorescente, biológico o enzimático de uso convencional en la técnica. Los números de patentes estadounidenses que se refieren al uso de tales marcadores incluyen 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; 4.302.534; 4.366.241; 4.637.988; 4.786.594; 5.108.896; 5.229.302; 5.629.164 y 5.691.154 incorporadas cada una en el presente documento como referencia. Por supuesto, pueden encontrarse ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como un segundo anticuerpo o una disposición de unión a ligando de biotina/avidina, tal como se conoce en la técnica.

En algunas realizaciones, los inmunocomplejos primarios pueden detectarse mediante un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión por el antígeno o el anticuerpo presentado en la muestra (o bien de manera específica o bien de manera no específica (por ejemplo, reactividad frente a la región Fc de los autoanticuerpos)). En estos casos, el segundo ligando de unión puede estar unido a un marcador detectable. El segundo ligando de unión es por sí mismo a menudo un anticuerpo, que por tanto puede denominarse anticuerpo "secundario". Los inmunocomplejos primarios se ponen en contacto con el ligando de unión secundario marcado, o anticuerpo, en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos secundarios. Los inmunocomplejos secundarios se lavan entonces generalmente para eliminar cualquier ligando o anticuerpo secundario marcado no unido, y entonces se detecta el marcador restante en los inmunocomplejos secundarios.

Otros métodos incluyen la detección de inmunocomplejos primarios mediante un enfoque de dos etapas. Se usa un segundo ligando de unión, tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión por el antígeno o autoanticuerpo, para formar inmunocomplejos secundarios, tal como se describió anteriormente. El segundo ligando de unión contiene una enzima que puede procesar un sustrato para dar un producto detectable y, por tanto, amplificar la señal a lo largo del tiempo. Tras lavar, los inmunocomplejos secundarios se ponen en contacto con el sustrato, permitiendo la detección.

También puede usarse inmunodetección competitiva para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos para los antígenos de prueba. En esta técnica, se incuba en primer lugar un anticuerpo marcado en disolución con el antígeno. Se mide la señal emitida por el marcador. A esto le sigue la puesta en contacto de este complejo de antígeno/anticuerpo con una muestra que contiene o se sospecha que contiene los anticuerpos de interés. Si la muestra tiene anticuerpos específicos para el antígeno, se unirán al antígeno y desplazarán de manera competitiva el anticuerpo marcado. Esto puede detectarse como una caída en la intensidad de la señal del marcador.

En algunas, pero no todas, las realizaciones de la materia dada a conocer en este documento, los antígenos utilizados para capturar los autoanticuerpos a partir de la muestra biológica se aíslan de exosomas. El término "aislado", tal como se usa en el presente documento cuando se aplica a un polipéptido, indica que el polipéptido está esencialmente libre de otros componentes celulares o exosómicos con los que está asociado en el estado natural.

Los exosomas son vesículas de origen endosómico que se secretan en el medio extracelular tras la fusión de cuerpos multivesiculares endosómicos tardíos con la membrana plasmática. Se ha mostrado que células de diversos tipos de tejidos secretan exosomas, tales como células dendríticas, linfocitos B, células tumorales y mastocitos, por ejemplo. Exosomas de diferentes orígenes presentan conjuntos diferenciados de proteínas y restos lipídicos. Contienen notablemente proteínas implicadas en la presentación de antígenos e inmunomodulación, lo que sugiere que los exosomas desempeñan un papel en las comunicaciones célula-célula conduciendo a la modulación de las respuestas inmunitarias. De hecho, exosomas de células dendríticas (CD) pulsados con péptidos derivados de antígenos tumorales producen respuestas antitumorales en un modelo animal usando el mismo tumor. Sin embargo, se ha mostrado que exosomas derivados de células cancerosas que comprenden antígenos cancerígenos comprenden polipéptidos inmunosupresores, lo que hace que exosomas derivados de tumores no modificados sean indeseables y potencialmente inseguros para su uso directamente en vacunas.

Los exosomas de la materia dada a conocer en este documento son muy adecuados para producir antígenos que pueden inmunorreaccionar con autoanticuerpos para capturar los autoanticuerpos de muestras biológicas a partir de sujetos porque se producen por células, en vez de sintetizarse artificialmente, y por tanto proporcionan antígenos que

son "naturales". Es decir, los antígenos producidos por las células y encontrados en el exosoma pueden ser péptidos de longitud completa que se procesan (por ejemplo, se glicosilan) y se pliegan por la célula en un grado similar que los antígenos con los que se encuentran las células inmunitarias en un sujeto. Como tales, los antígenos del exosoma pueden utilizarse en ensayos para detectar autoanticuerpos que pueden estar presentes en sujetos con trastornos tales como, por ejemplo, cánceres y trastornos de esterilidad. En algunas realizaciones, por tanto, el uno o más antígenos pueden comprender cada uno un antígeno de célula cancerosa y/o un antígeno de trastorno de esterilidad.

Pueden aislarse exosomas utilizados para proporcionar los antígenos usados en los métodos dados a conocer en este documento a partir de células que producen exosomas. En algunas realizaciones, la célula es una célula cultivada, es decir, una célula propagada *ex vivo* en medios de cultivo. La célula cultivada, aunque no necesariamente, puede immortalizarse para facilitar una propagación continua. En algunas realizaciones, la célula es una célula cancerosa, tal como por ejemplo una célula cancerosa originalmente aislada a partir de un tumor y luego propagada en cultivo, tal como se conoce generalmente en la técnica. En algunas realizaciones, la célula cancerosa puede ser una célula de cáncer epitelial o un adenocarcinoma. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula cancerosa puede ser una célula de cáncer de ovarios, una célula de cáncer cervical, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer endometrial, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de pulmón, una célula de melanoma, una célula de cáncer pancreático o una célula de coriocarcinoma. En algunas realizaciones, la célula es una célula de cultivo primario, tal como por ejemplo una célula de placenta aislada a partir de un sujeto.

En realizaciones particulares, la célula es una línea celular cultivada seleccionada del grupo que incluye pero no se limita a una célula UL-1, una célula UL-2, una célula UL-3 y UL-6. Todas estas líneas celulares de tumor de ovarios humanas primarias se establecieron en los laboratorios de los inventores, a partir de mujeres con adenocarcinoma quístico en estadio IIIc del ovario (designadas UL-1, UL-2, UL-3 y UL-6). UL-2 y UL-3 se derivaron de cáncer de ovarios hereditario, mientras que UL-1 y UL-6 se derivaron de cánceres espontáneos. Las células UL-1 se derivaron de una mujer de 63 años de edad, las células UL-2 se derivaron de una mujer de 34 años de edad, las células UL-3 se derivaron de una mujer de 42 años de edad y las células UL-6 se derivaron de una paciente femenina de 72 años de edad. Estas líneas celulares son tumorigénicas en ratones desnudos y dan lugar a tumores en ratones desnudos que concuerdan con adenocarcinomas quísticos. Estas líneas celulares son todas positivas para EpCAM, PLAP, FasL, PD-L1 y CMH de clase II.

En algunas realizaciones, los antígenos pueden aislarse para su uso en los métodos dados a conocer en el presente documento recogiendo un medio en el que se cultivan las células y eliminando selectivamente los exosomas del medio, tal como por ejemplo mediante centrifugación. Los antígenos pueden aislarse entonces adicionalmente a partir de los antígenos si se desea mediante métodos rutinarios de aislamiento y purificación de proteínas, tal como se conoce generalmente en la técnica.

Además, con respecto a los métodos de diagnóstico de la materia dada a conocer en este documento, un sujeto preferido es un sujeto vertebrado. Un vertebrado preferido es de sangre caliente; un vertebrado de sangre caliente preferido es un mamífero. Un mamífero preferido es lo más preferiblemente un ser humano. Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como animales. Por tanto, se proporcionan usos terapéuticos veterinarios según la materia dada a conocer en este documento.

Como tal, la materia dada a conocer en este documento proporciona el tratamiento de mamíferos tales como seres humanos, así como aquellos mamíferos de importancia debido a que están en peligro, tales como tigres siberianos; de importancia económica, tales como animales criados en granjas para su consumo por seres humanos; y/o animales de importancia social para los seres humanos, tales como animales mantenidos como mascotas o en zoológicos. Los ejemplos de tales animales incluyen pero no se limitan a: carnívoros tales como gatos y perros; animales porcinos tales como cerdos, puercos y jabalíes; rumiantes y/o ungulados tales como ganado, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos; y caballos. También se proporciona el tratamiento de pájaros, incluyendo el tratamiento de aquellas clases de pájaros que están en peligro y/o se mantienen en zoológicos, así como aves, y más particularmente aves domesticadas, es decir, aves de corral, tales como pavos, pollos, patos, gansos, gallinas de Guinea y similares, ya que son también de importancia económica para los seres humanos. Por tanto, también se proporciona el tratamiento de ganado, incluyendo, pero sin limitarse a, animales porcinos domesticados, rumiantes, ungulados, caballos (incluyendo caballos de carrera), aves de corral y similares.

II. Métodos para diagnosticar cánceres

La materia dada a conocer en este documento proporciona además métodos para diagnosticar y caracterizar cánceres en sujetos. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. En 1999, hubo unas 563.100 muertes por cáncer estimadas y cada año se diagnostican aproximadamente 1.222.000 nuevos casos de cáncer. Entre estos, los cánceres de tumores sólidos tales como cánceres de pulmón, de mama, de próstata y colorrectal son los más comunes. El diagnóstico y la clasificación del cáncer dependen de la interpretación subjetiva de la información tanto clínica como histopatológica a simple vista con el objetivo de clasificar los tumores en categorías generalmente aceptadas basándose en el tejido de origen del tumor. Sin embargo, la información clínica puede ser incompleta o engañosa.

Los ensayos de diagnóstico actuales para el cáncer se basan lo más comúnmente en antígenos. Estos ensayos dependen de la expresión, síntesis y liberación de proteínas específicas por células tumorales o bien mediante diseminación o secreción activa o bien como consecuencia de muerte celular (o bien necrosis o bien apoptosis). Estas proteínas antigénicas deben “escapar” del sitio primario, saturar la capacidad de procesamiento de antígenos de los componentes inmunitarios del individuo, obtener acceso a la circulación y alcanzar una concentración de estado estacionario suficiente para detectarse por inmunoensayos basados en enzimas o radiomarcadores. Estos acontecimientos se producen bastante después del acontecimiento de transformación neoplásica inicial y el desarrollo de focos tumorales.

Anteriormente, las mejoras para detectar cánceres se han centrado principalmente en la sensibilidad potenciada y la capacidad de alto rendimiento; sin embargo, estos ensayos de diagnóstico presentan varias limitaciones fundamentales. No aparecen antígenos circulantes hasta bastante después del establecimiento del tumor, los antígenos actuales no son específicos para el cáncer y ningún antígeno se expresa en el 100% de los casos de cáncer.

Recientemente, se ha investigado el análisis de patrones proteómicos de sueros de pacientes como método de detección temprana (Liotta *et al.*, *Gynecol Oncol* 88: S25-S28, 2003.). Desafortunadamente, este enfoque basado en espectrometría de masas (EM) tiene varias desventajas. Además de la aparición retrasada de antígenos circulantes asociada con sistemas de ensayo basados en antígenos, el análisis proteómico por EM tiene sensibilidad media con rendimientos decrecientes con proteínas de peso molecular superior, no identifica estas proteínas marcadoras y necesita el uso de dispositivos analíticos sofisticados, tanto espectrometría de masas SELDI-TOF como herramientas bioinformáticas. Además de diferencias en las proteínas asociadas al cáncer, los patrones proteómicos séricos pueden presentar variabilidad individual y los resultados de esta “obtención de la huella de diagnóstico por EM” dependen de la comparación con un “conjunto de entrenamiento” de sueros y la posterior interpretación de los patrones resultantes. Por tanto, hay problemas de viabilidad, reproducibilidad y normalización que es necesario abordar antes de que los análisis proteómicos por EM puedan aplicarse clínicamente.

La evaluación de la inmunocompetencia de los pacientes con cáncer se ha utilizado para determinar si el tumor ha comprometido la inmunidad del huésped, para identificar parámetros inmunitarios específicos que tienen valor de pronóstico y para proporcionar un nivel de referencia para la evaluación de la inmunoterapia (Hellstrom *et al.*, en: DeVita VT, Hellman S, y Rosenberg SA, eds. *Biologic therapy of cancer*. Nueva York: Lippincott, 1991: 35-52.). Aunque las funciones de las células inmunitarias están alteradas en muchos pacientes con cáncer, incluyendo por ejemplo cánceres de ovario, tal como se define por la incapacidad para erradicar el tumor, los estudios sugieren que el reconocimiento inmunitario de antígenos tumorales permanece intacto. Pueden detectarse autoanticuerpos reactivos con tumores de manera temprana en el desarrollo y evolución de los tumores. Los estudios han indicado la presencia de inmunoglobulinas reactivas con tumores en pacientes con cáncer, incluyendo aquéllos con melanoma (Merimsky *et al.*, *Tumour Biol* 15:188-202, 1994), cánceres de pulmón (Niklinska *et al.*, *Folia Histochem Cytobiol* 39:51-56, 2001; Brichory *et al.*, *Cancer Res* 61:7908-7912, 2001), de mama (Conroy *et al.*, *Lancet* 345:126,1995; Barbouche *et al.*, *Europ J Clin Chem Clin Biochem* 32: 511-514, 1994), de cabeza y cuello (Vlock *et al.*, *Cancer Res* 49: 1361-1365, 1989) y de ovarios (Kutteh *et al.*, *J Soc Gynecol Invest* 3:216-222, 1996; Taylor *et al.*, *Am J Reprod Immunol* 6:179-184, 1984; Vogl *et al.*, *Brit J Cancer* 83:1338-1343, 2000). Los mecanismos que subyacen a la inducción de una respuesta humoral parecen ser polifacéticos en pacientes con cáncer, incluyendo mutaciones puntuales que dan como resultado una secuencia de aminoácidos alterada (Jung y Schluesener, *J Exp Med* 173: 273-276, 1991; Winter *et al.*, *Cancer Res* 52: 4168-4174, 1992; Lubin *et al.*, *Cancer Res* 53:5872-5876, 1993), sobreexpresión que resulta de la amplificación o el aumento de la estabilidad de las proteínas (Peoples *et al.*, *Proc Natl Amer Sci USA* 92: 432-436, 1995; Labrecque *et al.*, *Cancer Res* 53:3468-3471, 1993), modificaciones postraduccionales alteradas (Kotera *et al.*, *Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin muc-1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients*, *Cancer Research*. 54(11):2856-60, 1994; Andersson E. Henderikx P. Krambovitis E. Hoogenboom HR. Borrebaeck CA. A tandem repeat of MUC1 core protein induces a weak in vitro immune response in human B cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 47(5):249-56, 1999; Chinni *et al.*, *Clin Cancer Res* 3: 1557-1564, 1997), o errores en el procesamiento. La aparición extracelular de proteínas intracelulares da como resultado comúnmente la generación de autoanticuerpos. Se han encontrado autoanticuerpos contra antígenos celulares aberrantes, tales como c-myb, c-myc, p53, y p21 ras en una proporción significativa de pacientes con cáncer, incluso en ausencia de antígeno circulante detectable (Canevari *et al.*, *Annals Oncol* 7:227-232, 1996; Yamamoto *et al.*, *Oncology* 56:129-133, 1999; Abu-Shakra *et al.*, *Annals Rheum Dis* 60:433-440, 2001.). La detección de anticuerpos frente a estas proteínas intracelulares en el momento del diagnóstico parece estar asociada con un mal pronóstico. En estudios previos que analizan la inducción de anticuerpos autólogos contra p53, las respuestas autoinmunitarias asociadas con la sobreexpresión de proteínas tienden a dirigirse a los extremos amino y carboxilo terminales. En cambio, los autoanticuerpos contra una proteína relacionada, p73, parecen dirigirse a los puntos calientes mutacionales interiores. En estudios con animales experimentales usando tumores espontáneos o bien inducidos químicamente o bien transplantables, puede demostrarse la existencia de IgG reactiva frente a tumores circulantes antes de la aparición de un tumor palpable o un antígeno tumoral circulante.

Los presentes inventores y colaboradores desarrollaron previamente una “tipificación autóloga” para identificar la presencia de IgG reactiva con tumores y para definir patrones de reconocimiento antigénico de pacientes con cáncer como herramienta de diagnóstico (Taylor y Doellgast, *Analytical Biochemistry*, 98:53-59, 1979.). Sin embargo, hasta hace poco, la identificación molecular de los antígenos específicos que producen esta respuesta humoral seguía siendo esquiva.

Una modificación reciente de la "tipificación autóloga" está usándose actualmente para analizar antígenos tumorales. La modificación, denominada SEREX, es la identificación de dianas de reconocimiento inmunitario usando análisis serológico de bibliotecas de expresión de ADNc recombinante de tumores humanos (Old, J Exp Med 187:1163-1167, 1998). Esta técnica tiene varias limitaciones, incluyendo alta reactividad cruzada con componentes bacterianos o de fagos, la coexpresión de ADNc derivado de tejido normal (incluyendo células linfoides) presentes dentro del tumor original y, puesto que el ADNc se expresa en un sistema bacteriano, hay una ausencia de modificaciones postraduccionales vinculadas al cáncer y procesamiento que se produce dentro de la célula tumoral, lo que puede dar como resultado la pérdida de inmunoreactividad de estas dianas proteicas "diseñadas por ingeniería genética".

Se han usado técnicas de análisis serológico para definir nuevos antígenos diana para el diagnóstico del cáncer, pero hay deficiencias que limitan su utilidad. Dianas antigénicas actuales usadas para detectar autoanticuerpos son proteínas de tipo natural recombinantes (por ejemplo, la detección de autoanticuerpos anti-p53 ha usado exclusivamente proteína p53 de tipo natural). El uso de proteínas de tipo natural elimina la detección de autoanticuerpos contra puntos calientes mutacionales. En el caso de p53, la mayoría de los estudios sugieren que los autoanticuerpos se unen a los extremos amino o carboxilo terminales. La incapacidad de p53 de tipo natural recombinante con autoanticuerpos dirigidos contra sitios mutados puede explicar la frecuencia inferior de autoanticuerpos contra p53 frente a la frecuencia de mutaciones de p53 en cáncer de ovarios.

La materia dada a conocer en este documento proporciona un enfoque novedoso para el diagnóstico de cánceres que aborda las limitaciones de técnicas anteriores comentadas anteriormente. La aplicación novedosa de respuestas humorales reactivas con tumores de pacientes con cáncer en alineamientos de proteínas dada a conocer en el presente documento, usando antígenos proteicos derivados de células tumorales "naturales" (por ejemplo, derivados de exosomas de células cancerosas), proporciona un enfoque rápido e innovador para identificar la aparición de alteraciones (por ejemplo, mutaciones, truncamientos y modificaciones postraduccionales) vinculadas con el comienzo y la evolución del cáncer en sujetos. Pacientes con enfermedades malignas desarrollan fenómenos de tipo autoinmunitario como resultado de la generación de autoanticuerpos contra diversos autoantígenos, incluyendo oncoproteínas, genes supresores de tumores, antígenos asociados con proliferación y antígenos de cáncer de testículos. Las aberraciones en proteínas específicas que comparten pacientes con el mismo tipo de tumor representan rutas neoplásicas esenciales y estas alteraciones compartidas pueden utilizarse para el diagnóstico y la caracterización de cánceres, incluyendo la determinación del estadio y el tipo de tumor.

Como tal, la materia dada a conocer en este documento proporciona en algunas realizaciones un método de diagnóstico de un cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto; poner en contacto un antígeno con la muestra, en el que el antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos; detectar los autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno; y comparar un nivel de inmunoreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno con un nivel de referencia para diagnosticar el cáncer en el sujeto.

Además, en algunas realizaciones de la materia dada a conocer en este documento, se proporciona un método para caracterizar un cáncer asociado con la producción de autoanticuerpos en un sujeto. Por ejemplo, el cáncer puede caracterizarse adicionalmente detectando y/o cuantificando autoanticuerpos en una muestra a partir del sujeto, tal como determinando un estadio del cáncer basándose en una medición cuantitativa del nivel de autoanticuerpos particulares presentes en la muestra. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto; poner en contacto un antígeno con la muestra, en el que el antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos; detectar los autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno; y cuantificar un nivel de inmunoreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno para caracterizar de ese modo el cáncer en el sujeto. Los ejemplos proporcionan detalles adicionales de realizaciones a modo de ejemplo para caracterizar el estadio del cáncer presente en un sujeto.

En algunas realizaciones de los métodos para diagnosticar y/o caracterizar cáncer en un sujeto, el péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos puede aislarse a partir de un exosoma.

El término "cáncer" tal como se usa en el presente documento se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasma o tumores malignos encontrados en animales, incluyendo leucemias, carcinomas y sarcomas. Ejemplos de cáncer son cáncer del cerebro, de vejiga, de mama, de cuello uterino, de colon, de cabeza y cuello, de riñón, de pulmón, de pulmón de células no pequeñas, melanoma, mesotelioma, de ovarios, de próstata, sarcoma, de estómago, de útero y meduloblastoma.

Por "leucemia" quiere decirse enfermedades malignas ampliamente progresivas de los órganos que forman la sangre y se caracteriza generalmente por una proliferación y un desarrollo alterados de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. Las enfermedades de leucemia incluyen, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T adultas, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basofílica, leucemia de blastocitos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia

de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas.

5 El término “carcinoma” se refiere a un nuevo crecimiento maligno constituido por células epiteliales que tienden a infiltrarse en los tejidos circundantes y dan lugar a metástasis. Los carcinomas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenoquístico, carcinoma quístico adenoide, carcinoma adenomatoso, carcinoma de corteza suprarrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, carcinoma
10 broncoalveolar, carcinoma bronquial, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloide, carcinoma de comedo, carcinoma de corpus, carcinoma cribiforme, carcinoma en coraza, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma ductal, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma espinoso, carcinoma epitelial adenoide, carcinoma exofítico, carcinoma ex ulcere, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes,
15 carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de células granulosas, carcinoma de la matriz pilosa, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipemefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma *in situ*, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, carcinoma medular, carcinoma melanocítico, carcinoma molle, carcinoma mucinoso, carcinoma mucíparo, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucoso, carcinoma mixomatodes, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células en avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide,
20 carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de riñón de células renales, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoso, carcinoma de Schneiderian, carcinoma escirroso, carcinoma de escroto, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma de células pequeñas, carcinoma solanoide, carcinoma de células esféricas, carcinoma de células fusiformes, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma en collar, carcinoma telangiectásico, carcinoma telangiectoides, carcinoma de células transicionales, carcinoma tuberoso, carcinoma verrucoso y carcinoma vellosos.

30 El término “sarcoma” se refiere generalmente a un tumor que está constituido por una sustancia como el tejido conjuntivo embrionario y está compuesto generalmente por células estrechamente empaquetadas incrustadas en una sustancia fibrilar u homogénea. Los sarcomas incluyen, por ejemplo, condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma de partes blandas alveolar, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioide, sarcoma cloroma, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estromal, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial,
35 sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiple idiopático, sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma por mesenquimoma maligno, sarcoma parostal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectásico.

40 El término “melanoma” pretende significar un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los melanomas incluyen, por ejemplo, melanoma acral lentiginoso, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma léntigo maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal y melanoma de propagación superficial.

45 Los cánceres adicionales incluyen, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoide pancreático maligno, carcinoide maligno, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del sistema genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer cervical, cáncer endometrial y cáncer de corteza suprarrenal.

50 En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer epitelial o un adenocarcinoma. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el trastorno puede ser cáncer de ovarios o cáncer cervical que se origina a partir de tejidos epiteliales. Como otro ejemplo, en algunas realizaciones, el trastorno puede ser un adenocarcinoma seleccionado del grupo que incluye pero no se limita a cáncer de ovarios, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.

55 En algunas realizaciones, pueden seleccionarse uno o más antígenos para su uso en la detección de autoanticuerpos que se han correlacionado con cáncer (y en algunas realizaciones, un estadio de cáncer particular). Se enumeran en la tabla a continuación ejemplos no limitativos de antígenos con los que inmunorreaccionan autoanticuerpos asociados con cánceres y que pueden usarse con los presentes métodos.

60 Como ejemplo, pueden utilizarse péptidos de antígenos cancerígenos tales como miembros de la familia de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP) (por ejemplo, survivina). La survivina se expresa en mayoría de adenocarcinomas

pancreáticos (Sarela *et al.* Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 18 de marzo de 2002; 86(6):886-92).

5 Los antígenos adicionales útiles con los presentes métodos incluyen mucinas (por ejemplo, CA125 (MUC-16), TAG-72 y MUC-1). Se produce un aumento de la producción de mucina en muchos adenocarcinomas, incluyendo cáncer del páncreas, pulmón, mama, ovarios, colon y otros. El antígeno asociado a tumores MUC-1 se sobreexpresa y subglucosila en adenocarcinomas humanos de orígenes diversos, tales como mama, ovarios y colon (Henderikx *et al.* Human single-chain Fv antibodies to MUC-1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1 de octubre de 1998; 58(19):4324-32). Además, la glicoproteína asociada a tumores TAG-72 se expresa en la mayoría de los adenocarcinomas humanos pero se expresa rara vez en la mayoría de los tejidos normales (Yoon *et al.* Construction, affinity maturation, and biological characterization of an anti-tumor-associated glycoprotein-72 humanized antibody. *J Biol Chem*. 17 de marzo de 2006; 281(11):6985-92).

10 Otros antígenos útiles con los presentes métodos incluyen antígenos de cáncer de testículos (por ejemplo, NY-ESO-1, SSX-1, SSX-2, SSX-4 y SCP-1). Como ejemplo, se ha demostrado que la expresión de antígenos de cáncer de testículos en neoplasmas serosos de ovarios puede correlacionarse directamente con su grado de malignidad, por ejemplo.

15 Los antígenos adicionales útiles con los presentes métodos incluyen proteínas de choque térmico (por ejemplo, HSP27, HSP60, HSP90 y GRP78). Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de HSP es superior en adenocarcinomas de pulmón. Además, tanto HSP70 como HSP90 pueden tener relación con la génesis y el pronóstico de carcinoma endometrial. Véase también, por ejemplo, Croute *et al.* Expression of stress-related genes in a cadmium-resistant A549 human cell line. *Journal of Toxicology & Environmental Health Part A*. 68(9):703-18, 2005; Liang *et al.* Mislocalization of membrane proteins associated with multidrug resistance in cisplatin-resistant cancer cell lines. *Cancer Research*. 63(18):5909-16, 2003; Lee. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Research*. 67(8):3496-9, 2007; y Lee *et al.* GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Research*. 66(16):7849-53, 2006.

20 Otro ejemplo de antígenos útiles con los presentes métodos incluyen mesotelina, que es un antígeno de diferenciación presente en células mesoteliales normales y sobreexpresado en varios tumores humanos, incluyendo mesotelioma y adenocarcinoma de ovarios y pancreático (Hassan *et al.* Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 15 de junio de 2004; 10(12 Pt 1):3937-42; Baruch *et al.* Immunocytochemical study of the expression of mesothelin in fine-needle aspiration biopsy specimens of pancreatic adenocarcinoma. *Diagnostic Cytopathology*. 35(3):143-7, 2007; Pu *et al.* Utility of WT-1, p63, MOC31, mesothelin, and cytokeratin (K903 y CK5/6) immunostains in differentiating adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant mesothelioma in effusions. *Diagnostic Cytopathology*. 36(1): 20-5, 2008; Argani *et al.* Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clinical Cancer Research*. 7(12):3862-8, 2001; y Dennis *et al.* Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm. *Clinical Cancer Research*. 11(10):3766-72, 2005).

Género de Ag	Marcador antigénico	AKA	Ubicación celular normal
Familia de genes supresores de tumores	p53 p63	NY-CO-13	núcleo
			núcleo
	p73		núcleo
Proteínas de unión a ácido nucleico	B23	nucleofosmina	nucleolo
	C23	nucleolina	nucleolo
Proteína antiapoptótica	Survivina		citoplasma
Familia oncogénica	c-myc		
	c-ras		citoplasma
	c-erb2	HER-2, neu	membrana plasmática
	mdm2		núcleo
Proteínas de secuencia homeótica	Hox-A7		núcleo
	Hox-B7		citoplasma
Ag de cáncer de testículos	SCP-1		núcleo
	SSX-1	complejo de proteína sinovial 1	núcleo

	SSX-2	complejo sinovial	núcleo
	proteína 2		
	SSX-4	proteína de complejo sinovial 4	núcleo
	NY-ESO-1		citoplasma
	proteína 2		
Familia de choque térmico	HSP 27		citoplasma
Proteínas	HSP-60		citoplasma y núcleo
	HSP-90		citoplasma
	GRP-78		citoplasma
Precursor enzimático de la familia de enzimas prolisosómicas	proCatepsina D		citoplasma
	PLAP		membrana plasmática
Molécula de adhesión	EpCAM		membrana plasmática
Mucinas	TAG-72		citoplasma y membrana plasmática
	CA125		Membrana plasmática
	Muc-1		membrana plasmática
	Muc-16	Mel-CAM	membrana plasmática
Proteína relacionada con adhesión (glicoproteína)	Mesotelina		membrana plasmática
Familia de cinasas	EGF cinasa		citoplasma

III. Métodos para diagnosticar trastornos de esterilidad

- 5 La materia dada a conocer en este documento proporciona además métodos para diagnosticar y caracterizar trastornos de esterilidad en sujetos. Los trastornos de esterilidad son un estado médico común, que afecta aproximadamente a 7,3 millones de estadounidenses cada año. Se estima que aproximadamente del 10% al 15% de las parejas casadas que intentan concebir no pueden hacerlo tras un año. Los trastornos de esterilidad incluyen esterilidad femenina, que es un término que los profesionales sanitarios usan para mujeres que no pueden quedarse embarazadas tras al menos un año de intentos o para las que se quedan embarazadas pero no pueden llevar el embarazo hasta el final. La mayoría de los casos de esterilidad femenina resultan de problemas con la ovulación. Algunos trastornos de esterilidad que afectan a la fecundidad y fertilidad incluyen insuficiencia ovárica prematura (IOP), en la que los ovarios dejan de funcionar antes de la menopausia natural, síndrome de ovario poliquístico (SOP), en el que los ovarios no pueden liberar un óvulo regularmente o no pueden liberar un óvulo viable, sano y patologías reproductivas resultantes de endometriosis. Otros trastornos de esterilidad incluyen endometriosis, preeclampsia, nacimiento prematuro, restricción del crecimiento intrauterino y pérdida del embarazo recurrente.
- 10
- 15 En la actualidad, los profesionales sanitarios diagnostican la esterilidad realizando un estudio que consiste en la evaluación del estado de ovulación y un examen para identificar patologías del útero o las trompas de Falopio u otros factores causantes. En muchos casos, se logra el diagnóstico clínico mediante la eliminación de etiologías subyacentes comunes y tras dos ciclos menstruales. La insuficiencia reproductiva, incluyendo aborto espontáneo recurrente y otros trastornos de esterilidad, pueden resultar de múltiples causas.
- 20 Están implicados mecanismos autoinmunitarios en trastornos de esterilidad, tales como endometriosis e insuficiencia ovárica, y pueden ser responsables de la fisiopatología de preeclampsia o abortos espontáneos. Se han detectado autoanticuerpos antiováricos en el 33-61% de los pacientes con esterilidad inexplicada, lo que sugiere que esta patología puede representar un estadio temprano de insuficiencia ovárica autoinmunitaria. Como en otras patologías autoinmunitarias (tales como diabetes mellitus tipo 1 y tiroiditis), pueden aparecer anticuerpos antiováricos meses o

años antes del comienzo de los síntomas clínicos, por tanto pueden predecir la insuficiencia ovárica futura en mujeres con esterilidad inexplicada.

La endometriosis es una enfermedad que afecta al 10% de las mujeres en edad reproductiva y se caracteriza por el crecimiento regulado por hormonas de tejido endometrial fuera del útero. Se sabe que la endometriosis es una causa de trastornos de esterilidad femenina en el 30-50% de las mujeres afectadas. Se ha sugerido que pueden estar implicados mecanismos autoinmunitarios, y se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra diferentes autoantígenos candidatos en estos pacientes. Aunque el mecanismo de esterilidad en la endometriosis no se entiende bien, se ha mostrado que la endometriosis está asociada con autoanticuerpos y/o otras enfermedades autoinmunitarias en hasta dos tercios de los pacientes. Se ha notificado la presencia de anticuerpos anti-endometriales en el 100% y anticuerpos anti-ováricos en el 62% de las pacientes con endometriosis.

La implicación de la autoinmunidad también se ha estudiado en IOP estimándose la proporción global de formas autoinmunitarias de IOP entre el 20-70%. El ovario humano puede ser la diana de un ataque autoinmunitario en diversas circunstancias, incluyendo varias enfermedades autoinmunitarias sistémicas o específicas de órgano. Clínicamente, la consiguiente disfunción ovárica a menudo da como resultado IOP, aunque otras patologías que implican a los ovarios, tales como esterilidad inexplicada, SOP y endometriosis se han asociado con la autoinmunidad anti-ovárica. El diagnóstico de un mecanismo autoinmunitario en estas patologías ha dependido de la detección de autoanticuerpos anti-ováricos, aunque recientemente también se ha prestado especial atención al componente celular de la respuesta autoinmunitaria. Sin embargo, poco se sabe sobre las dianas moleculares de los efectores autoinmunitarios, y muy pocos autoantígenos se han identificado formalmente.

La detección de autoanticuerpos dirigidos contra diversas dianas ováricas apoya la hipótesis de una etiología autoinmunitaria de IOP. Los informes iniciales sobre anticuerpos anti-ováricos incluían principalmente pacientes con IOP y una enfermedad autoinmunitaria suprarrenal asociada. Estos pacientes tenían anticuerpos que reconocían varios tipos de células productoras de esteroides de la corteza suprarrenal, los testículos, la placenta y los ovarios y se denominaron anticuerpos contra células esteroides (SCA). La prevalencia de SCA dependía de las características clínicas: pueden detectarse en aproximadamente el 60% de los pacientes con APS-I y el 25-40% de los pacientes con APS-II, aunque la prevalencia más alta (78-100%) se ha mostrado en pacientes con IOP. También se ha mostrado que el 33-43% de las mujeres con ciclos menstruales normales con poliendoocrinopatía y SCA desarrollarían insuficiencia ovárica en el plazo de 8-15 años.

Otra causa común de insuficiencia reproductiva es SOP que se caracteriza por un estado anovulatorio hiperandrogénico crónico asociado con varios síntomas clínicos y que afecta al 5-10% de las mujeres en edad reproductiva. Aunque SOP, así como ovarios poliquísticos sin el síndrome, están relacionados con desregulación hormonal, se han demostrado alteraciones autoinmunitarias. Se han notificado las características histopatológicas de la ooforitis autoinmunitaria con un aspecto quístico asociado con anticuerpos séricos anti-ováricos. Varios investigadores han abordado la prevalencia de autoanticuerpos específicos de órgano y no específicos de órgano y han demostrado la existencia de anticuerpos anti-ováricos en el 50-60% de los pacientes con SOP. Tung notificó la producción de autoanticuerpos frente a ovocitos en un modulo murino dando como resultado insuficiencia ovárica. La disfunción autoinmunitaria en pacientes clínicamente asintomáticos también puede conducir a abortos espontáneos recurrentes. Algunas de las pacientes que abortan de manera recurrente tienen, de hecho, uno o más tipos de autoanticuerpos anómalos. Anticuerpos antifosfolípidos, anticuerpos anti-ADN y anticuerpos antinucleares se han implicado en abortos recurrentes. Se piensa que un mecanismo en el aborto espontáneo es la trombosis de la vasculatura de la placenta e infarto de placenta, provocado por la reacción de autoanticuerpos contra β 2-glicoproteína I, protrombina y/o anexina V. Otra posible causa en la unión directa de autoanticuerpos a células citotrofoblásticas, alterando la invasión trofoblástica en la decidua materna y la implantación impidiendo la diferenciación a sincitiotrofoblasto.

Se ha mostrado que el sistema inmunitario desempeña un papel significativo en la patogénesis de insuficiencia ovárica prematura, síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, pérdida del embarazo recurrente y otros trastornos de esterilidad. La materia dada a conocer en este documento proporciona el uso de marcadores de inmunorreactividad (por ejemplo, autoanticuerpos asociados con un trastorno de esterilidad) como ayuda de diagnóstico para trastornos de esterilidad, incluyendo pero sin limitarse a IOP, SOP, endometriosis, preeclampsia, nacimiento prematuro, restricción del crecimiento intrauterino y pérdida del embarazo recurrente. Además, la evaluación de la autoinmunidad contra componentes específicos del sistema reproductor, tal como se proporciona mediante la materia dada a conocer en este documento, es una herramienta de pronóstico para los tratamientos de la esterilidad.

Como tal, en algunas realizaciones de la materia dada a conocer en este documento, se proporciona un método de diagnóstico de un trastorno de esterilidad en un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto; poner en contacto un antígeno con la muestra, en el que el antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos; detectar los autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno; y comparar un nivel de inmunorreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno con un nivel de referencia para diagnosticar el trastorno de esterilidad en el sujeto.

Además, en algunas realizaciones de la materia dada a conocer en este documento, se proporciona un método para caracterizar un trastorno de esterilidad asociado con la producción de autoanticuerpos en un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende autoanticuerpos a partir de un

sujeto; poner en contacto un antígeno con la muestra, en el que el antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos; detectar los autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno; y cuantificar un nivel de inmunorreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno para caracterizar de ese modo el trastorno de esterilidad en el sujeto.

- 5 Por ejemplo, en algunas realizaciones el trastorno de esterilidad es un trastorno seleccionado del grupo que incluye pero no se limita a insuficiencia ovárica prematura (IOP), síndrome de ovario poliquístico (SOP), endometriosis, preeclampsia, nacimiento prematuro, restricción del crecimiento intrauterino y pérdida del embarazo recurrente (aborto espontáneo). Además, en algunas realizaciones, los autoanticuerpos detectados son inmunorreactivos frente a antígenos derivados del ovario, el endometrio, la placenta o combinaciones de los mismos.
- 10 En algunas realizaciones de los métodos para diagnosticar y/o caracterizar trastornos de esterilidad en un sujeto, el péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos puede aislarse a partir de un exosoma. En algunas realizaciones, el péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos es un antígeno de péptido seleccionado del grupo que consiste en: antígenos nucleares con pesos moleculares de aproximadamente 50 kD y 80 kD y antígenos de membrana con pesos moleculares de aproximadamente 10 kD, 30 kD, 45 kD, 90 kD y 125 kD. El reconocimiento de proteínas de membrana se comparte por todas las esterilidades; sin embargo, el reconocimiento de proteínas nucleares parece ser único para la endometriosis.
- 15

IV. Kits para detectar autoanticuerpos

- 20 En realizaciones adicionales, la materia dada a conocer en este documento proporciona el uso de kits inmunológicos en la detección de autoanticuerpos en muestras biológicas para diagnosticar o caracterizar un trastorno. Tales kits comprenden uno o más antígenos dados a conocer en el presente documento que pueden inmunorreaccionar con los sometidos a prueba para detectar autoanticuerpos. En algunas realizaciones, los antígenos se aíslan a partir de exosomas, tal como se da a conocer en el presente documento. Más específicamente, los kits de inmunodetección comprenderán por tanto, en recipiente(s) adecuado(s), uno o más antígenos de péptidos inmunorreactivos con autoanticuerpos. En algunas realizaciones, los kits comprenden además anticuerpos que se unen a los antígenos y/o anticuerpos que se unen a otros anticuerpos (por ejemplo, autoanticuerpos de interés) mediante, por ejemplo, partes Fc.
- 25

En ciertas realizaciones, el antígeno puede proporcionarse unido a un soporte sólido, tal como por ejemplo una matriz de columna o pocillo de una placa de microtitulación, una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa, PVDF o material similar), perlas o tiras reactivas. Alternativamente, el soporte puede proporcionarse como un elemento separado del kit.

- 30 Los reactivos de inmunodetección del kit pueden incluir marcadores detectables que están asociados con, o unidos a, el anticuerpo de detección dado o al propio antígeno. También se contemplan marcadores detectables que están asociados con o unidos a un ligando de unión secundario. Tales marcadores detectables incluyen colorantes, haptenos, moléculas quimioluminiscentes o fluorescentes (rodamina, fluoresceína, proteína fluorescente verde, luciferasa), biotina, radiomarcadores (^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{14}C , ^{131}I) o enzimas (fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano).

- 35 Los kits pueden comprender además patrones adecuados de cantidades predeterminadas, incluyendo tanto anticuerpos como antígenos. Estos pueden usarse para preparar una curva patrón para un ensayo de detección.

Los kits de la materia dada a conocer en este documento, independientemente del tipo, pueden comprender generalmente uno o más recipientes en los que los agentes biológicos se colocan y alicotan adecuadamente. Los componentes de los kits pueden envasarse o bien en medios acuosos o bien en forma liofilizada.

- 40 Las composiciones de la materia dada a conocer en este documento pueden envasarse ventajosamente en un kit que comprende el/los reactivo(s) activo(s), un recipiente adecuado e incluso instrucciones para el uso del kit. El/los reactivo(s) del kit pueden proporcionarse como una disolución líquida, unido(s) a un soporte sólido o como un polvo seco. Cuando el reactivo se proporciona en una disolución líquida, la disolución líquida puede ser una disolución acuosa. Cuando el reactivo proporcionado está unido a un soporte sólido, el soporte sólido puede ser medios de cromatografía, una placa de ensayo que tiene una pluralidad de pocillos o un portaobjetos de microscopio. Cuando el reactivo proporcionado es un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado, que puede proporcionarse.
- 45

- El recipiente de los kits puede incluir generalmente al menos un pocillo de una placa de microtitulación, portaobjetos, vial, tubo de ensayo, matraz, frasco o incluso una jeringuilla u otro recipiente, en el que el antígeno puede colocarse y, si se desea, alicotarse adecuadamente. Cuando se proporciona un segundo o tercer ligando de unión o componente adicional, el kit puede contener también generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que este ligando o componente puede colocarse.
- 50

Los kits de la presente materia pueden incluir también normalmente un mecanismo para contener el/los antígeno(s) y cualquier otro recipiente de reactivos en confinamiento estrecho para su venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por soplado o inyección en los que están contenidos los recipientes deseados.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se han incluido para ilustrar modos de la materia dada a conocer en este documento. En vista de la presente descripción y el nivel general de la experiencia en la técnica, los expertos apreciarán que los siguientes ejemplos pretenden ser a modo de ejemplo sólo y que pueden emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance de la materia dada a conocer en este documento.

EJEMPLO 1

ASOCIACIÓN DE ANTICUERPOS REACTIVOS CON CÁNCER

Se ha demostrado la presencia ubicua de anticuerpos autorreactivos en todos los pacientes con cáncer sometidos a prueba. Se analizó la aparición de autoanticuerpos reactivos con tumores en pacientes con cáncer de ovarios (n=28) y mujeres voluntarias de igual edad que no tenían tumor (n=32). La presencia y reactividad de IgG dentro de los sueros de pacientes con cáncer de ovarios con antígenos celulares derivados de tumores de ovarios se cuantificó mediante ELISA.

Se diluyeron 1:25 antígenos celulares derivados de tumores procedentes de células de tumor de ovarios UL-1, en crecimiento en fase logarítmica, en un tampón de acoplamiento que consistía en carbonato de sodio 100 mM y NaCl 0,5 M, pH 8,3. Se añadieron alícuotas a los pocillos de una placa de microtitulación Immulon4 de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C. Se bloquearon las placas con leche en polvo desnatada al 5% y entonces se incubaron con 200 µl de sueros, diluidos 1/200, de pacientes con cáncer de ovarios y controles normales de igual edad, durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas y se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (diluido 1/5000) y se determinó la presencia de anticuerpo unido incubando los pocillos con una disolución de tampón citrato 50 mM que contenía OPD (0,4 mg/ml), midiendo la absorbancia a 490 nm.

Todas las pacientes con cáncer de ovarios presentaban un nivel de autoanticuerpos, que reconocían proteínas derivadas de tumor de ovarios, significativamente mayor que sus homólogas que no tenían cáncer (p<0,0001). El nivel de unión de IgG observado en sueros de la población control representa un nivel de fondo. No se observó solapamiento en la unión de IgG a antígenos tumorales entre los grupos control y de pacientes con cáncer.

Puesto que las pacientes con cáncer presentaban un nivel potenciado de anticuerpos reactivos con tumor y el nivel de estos autoanticuerpos presentaba una variabilidad significativa, se hicieron comparaciones estadísticas entre la absorbancia relativa para esta IgG reactiva con tumores y el estadio de la enfermedad. Los datos en el nivel de inmunoglobulinas reactivas con proteínas celulares procedentes de la línea celular de tumor de ovarios UL-1 se separaron por estadio de la enfermedad (figura 1). Se observó que el nivel de IgG reactiva aumentaba con el estadio de la enfermedad. Los sueros de pacientes con cáncer en estadio I (n=8) presentaban un aumento significativo por encima del fondo de sueros normales (n=32, p<0,001) o sueros de mujeres con enfermedad ovárica benigna (n=8, p<0,01). No se observó diferencia significativa para la inmunorreactividad detectada en sueros de tumores de ovarios y cáncer de ovarios en estadio I de bajo potencial maligno. El nivel de inmunorreactividad presente en pacientes en estadio II (n=10) era significativamente mayor que el nivel observado en pacientes en estadio I (p<0,001) y significativamente menor que el detectado en los sueros de pacientes en estadio III (n=8, p<0,01). El nivel de inmunorreactividad presente en pacientes en estadio III era significativamente menor que el nivel observado en pacientes en estadio IV (n=8, p<0,001). Por tanto, las pacientes con cáncer de ovarios presentan anticuerpos reactivos con tumores que se correlacionan con el estadio de la enfermedad.

EJEMPLO 2

RECONOCIMIENTO DE DIANAS ANTIGÉNICAS ESPECÍFICAS POR IgG REACTIVA CON TUMORES

Puesto que pudieron demostrarse diferencias cuantitativas en la reactividad de autoanticuerpos obtenidos a partir de los sueros de pacientes con cáncer de ovarios frente a antígenos de tumor de ovarios basándose en el estadio de la enfermedad, se investigaron entonces las diferencias cualitativas usando inmunotransferencia de tipo Western y densitometría. Usando antígenos de proteínas celulares de 3 líneas celulares de tumor de ovarios (UL-1, UL-3, UL-6) en crecimiento en fase logarítmica, se evaluó la presencia de componentes reactivos con la respuesta inmunitaria humoral de pacientes con cáncer de ovarios mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 2, inmunotransferencias representativas). Se realizó la inmunotransferencia de tipo Western usando sueros de pacientes (diluidos 1:100) como fuente de anticuerpos primarios. Se visualizó la unión de anticuerpos derivados del paciente a antígenos derivados de células tumorales usando anticuerpo anti-IgG humana conjugado por peroxidasa, seguido por ECL. Se cuantificó la inmunorreactividad mediante densitometría. Se analizaron las diferencias en los antígenos reconocidos y la intensidad de ese reconocimiento.

Se analizaron diez (10) sueros en estadio I, diez (10) sueros en estadio II, diez (10) sueros en estadio III y doce (12) sueros en estadio IV. Para todas las pacientes con cáncer de ovarios, estas inmunotransferencias de tipo Western identificaron múltiples bandas que oscilaban en peso molecular entre 10 y 140 kD, aunque el número y la intensidad de la interacción inmunitaria era variable entre pacientes. Las intensidades variables de la señal en la inmunotransferencia se correlacionaban con el estadio de la enfermedad (píxeles totales por carril, coeficiente de correlación r=0,906).

Aunque, en general, los pacientes con cáncer en estadio tardío reconocían más bandas a mayor intensidad, se observaron patrones de reconocimiento diferencial específicos de estadio en la IgG a partir de pacientes con cáncer de ovarios en estas inmunotransferencias de tipo Western. Además de diferencias cuantitativas relacionadas con el estadio, los pacientes en estadio temprano presentaban un reconocimiento intenso, único de varios antígenos con pesos moleculares mayores de 100 kD (mostrado mediante el recuadro en el panel A), mientras que los pacientes en estadio tardío presentaban un reconocimiento único de antígenos con pesos moleculares menores de 40 kD (mostrado mediante el recuadro en el panel B). Como control, también se sometió a prueba la reactividad de sueros normales contra estas proteínas, así como la reactividad de los sueros de las pacientes con cáncer contra epitelio de ovarios normal. Los sueros de mujeres control normales (que no tenían tumor) no pudieron reconocer proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western, mientras que los sueros de pacientes con cáncer presentan reactividad con sólo unas cuantas bandas en epitelio de ovarios normal.

Puesto que se reconocen algunos antígenos por sueros en estadio temprano y continúan reconociéndose por sueros de pacientes avanzados, esto demuestra que estas proteínas antigénicas se expresan de manera temprana y que su expresión se mantiene a lo largo de toda la evolución del tumor. Algunas proteínas parecen reconocerse sólo de manera tardía en la evolución del tumor, lo que demuestra su aparición y/o alteración posterior. Sin embargo, puesto que éstas comparten el reconocimiento entre pacientes, representan por tanto una alteración común en estas pacientes. Algunas proteínas antigénicas parecen reconocerse preferentemente de manera temprana, lo que demuestra la aparición de una proteína alterada esencial a partir del desarrollo tumoral temprano. La identificación de estas proteínas alteradas específicas de estadio proporciona una percepción adicional de las alteraciones esenciales para cada estadio de evolución y desarrollo tumoral.

El trabajo de otros investigadores usando o bien inmunotransferencia de tipo Western o bien ELISA basado en antígenos derivados de tumores ha detectado anticuerpos reactivos en todos los pacientes sometidos a prueba: sin embargo, la evaluación del reconocimiento de proteínas antigénicas específicas no ha identificado un mismo componente en el 100% de los pacientes, reconociéndose la mayoría de las proteínas individuales en sólo el 10-40% de los pacientes. Este reconocimiento limitado puede deberse a que la mayoría de los estudios sobre autoanticuerpos reactivos con tumores usan proteínas recombinantes (en muchos casos, proteínas de tipo natural), que carecen de modificaciones postraduccionales vinculadas al cáncer que pueden modificar epítomos antigénicos, lo que puede subestimar el nivel real de inmunorreactividad. Las respuestas de autoanticuerpos frente a antígenos ampliamente expresados en tejidos cancerosos y normales parecen poder atribuirse a mutaciones específicas de tumor o modificaciones postraduccionales. Aunque pueden detectarse autoanticuerpos reactivos con tumores en todos los cánceres, IgG reactiva con tumores que reconoce estos antígenos específicos a partir de voluntarios que no tienen cáncer es un acontecimiento raro (<1%) y en el sistema de ensayo dado a conocer en este documento, no se detecta.

EJEMPLO 3

MARCADORES QUE IDENTIFICAN LA RECEPTIVIDAD TERAPÉUTICA

Puesto que se observaron diferencias en los patrones de reactividad entre pacientes con enfermedad avanzada, se examinó la correlación entre tales diferencias y la quimiorresistencia. La separación de los componentes celulares mediante electroforesis bidimensional seguida por inmunotransferencia de tipo Western permitió la evaluación de algunas de estas diferencias. Usando sueros de pacientes que no podían responder inicialmente a la terapia con cisplatino y pacientes que presentaban una respuesta inicial que permanecía libre de enfermedad durante >12 meses, se identificó el reconocimiento de una agrupación de 3 puntos asociados con resistencia a cisplatino (figura 3). La utilización de estos antígenos celulares como parte del alineamiento de diagnóstico dado a conocer en el presente documento puede permitir la identificación temprana de tumores resistentes.

EJEMPLO 4

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS RECONOCIDAS *IN VIVO*

Puesto que las respuestas humorales de los pacientes se dirigían contra proteínas vinculadas a estadios específicos asociadas con tumores de ovarios, se inició la identificación de estos antígenos inmunorreactivos mediante el desarrollo de un alineamiento de proteínas. Para minimizar el número de proteínas totales analizadas, se aislaron proteínas inmunorreactivas mediante inmunoprecipitación.

Se aisló IgG a partir de sueros de 3 mujeres con cáncer de ovarios avanzado, usando una columna HITRAP PROTEIN G-SEPHAROSE® de 1 ml (GE Healthcare). Se eluyó la fracción de IgG unida con tampón de elución IMMUNPURE® (GE Healthcare), monitorizando a 280 nm. Se agruparon las fracciones que contenían IgG y se concentraron, y entonces se acoplaron a columnas HITRAP NHS™ (GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante. Se solubilizaron las proteínas celulares de células de tumor de ovarios UL-1 y se clarificaron. Se incubaron alícuotas de la IgG del paciente inmovilizada con las preparaciones de proteínas celulares, durante la noche a 4°C y entonces se eluyeron los complejos unidos. Se fraccionaron estas proteínas celulares inmunopurificadas mediante cromatografía RP-HPLC en una columna C8 de 4,6x250 mm (300 µ). Se secaron las fracciones resultantes mediante centrifuga Speed-Vac y se usaron para desarrollar un alineamiento de proteínas. Se cargó manualmente la disolución de proteínas (2,5 µl) sobre un único punto. Se colocó una muestra de Ig conjugada con peroxidasa sobre cada membrana como

control positivo y para la orientación del alineamiento (indicado como carril C en las figuras 4A y 4B). Se incubaron sueros de pacientes con cáncer de ovarios en estadio avanzado (diluidos 1:100) con las membranas durante la noche a 4°C y entonces se incubaron las membranas con anticuerpo anti-IgG humana conjugado peroxidasa, visualizando mediante ECL. Se obtuvieron imágenes de la película resultante y se analizaron usando software de análisis de Kodak para el reconocimiento y la cuantificación de puntos.

Cada paciente con cáncer de ovarios reconocía múltiples proteínas; sin embargo, todos los pacientes reconocían alguna proteína. Usando este sistema de alineamiento, los sueros control (pacientes sin cáncer) (n=10) no pudieron reconocer ninguna diana proteica. Para identificar las proteínas específicas responsables de esta inmunorreactividad observada con autoanticuerpos de pacientes, se sometieron las partes de las proteínas correspondientes a las reconocidas por las respuestas inmunitarias humorales de pacientes con cáncer de ovarios a espectrometría de masas de desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) tras digestión con tripsina. Se fraccionaron los péptidos resultantes mediante HPLC en una columna microcapilar de sílice fundida (75x200 µm, Polymicro Technologies, Inc.) y se eluyeron directamente en la fuente de ionización por electrospray de un espectrómetro de masas cuadrupolo triple (TSQ 70, Finnigan MAT) usando un gradiente lineal de acetonitrilo del 0 al 80% en ácido acético 0,1 M (sistema de suministro de disolvente 140 B). Se adquirieron los espectros de masas para cada pico y se compararon los fragmentos de peso molecular resultantes para cada proteína con bases de datos de otras proteínas conocidas para determinar la identidad. También se analizaron picos comunes adicionales (11, 19, 44 y 49); sin embargo, estas fracciones consistían en múltiples proteínas y no pudo continuarse la secuenciación directamente.

La presente metodología puede identificar un grupo de antígenos reconocidos sólo por pacientes con cáncer de ovarios (figura 5). Los datos dados a conocer en el presente documento indican la presencia de componentes reactivos que se correlacionan con la presencia de enfermedad, el estadio y la quimiorresistencia. Varios grupos han propuesto que se expresan proteínas de manera temprana en el desarrollo del cáncer y que muchas de éstas se ha mostrado que generan autoanticuerpos. Disis *et al.* (Global role of the immune system in identifying cancer initiation and limiting disease progression. *Journal of Clinical Oncology*. 23(35):8923-5, diciembre de 2005) demostraron que los pacientes con cáncer montan respuestas de anticuerpos séricos frente a antígenos asociados a tumores en un estadio temprano de la enfermedad. Se han notificado autoanticuerpos contra p53 en pacientes con cánceres de ovarios, colorrectal y oral en estadio temprano. Los presentes hallazgos indican una diferencia significativa en la inmunorreactividad frente al estadio, e incluso el reconocimiento en el estadio temprano es distinto con respecto a la enfermedad ovárica benigna y normal. Estas diferencias representan diferencias cuantitativas (intensidad de unión o título) en vez de diferencias cualitativas; sin embargo, el diseño del alineamiento de diagnóstico dado a conocer en este documento permite tanto la identificación de la presencia de autoanticuerpos como la cuantificación de su unión (intensidad). Por tanto, las diferencias cuantitativas en la unión de anticuerpos reactivos con tumores (intensidad), que ya se ha demostrado que existen, proporcionan una diferenciación adecuada del estado y estadio del cáncer para su diagnóstico.

EJEMPLO 5

5 EVALUACIÓN DE UN ALINEAMIENTO DE PROTEÍNAS CON DIANA PROTEICA ESTABLECIDA

Usando anticuerpos comerciales contra proteínas autoantigénicas identificadas anteriormente por los presentes inventores (tabla 1), se aislaron proteínas a partir de células de cáncer de ovarios UL-1 solubilizadas mediante inmunoprecipitación. Se usaron estas proteínas aisladas para establecer un alineamiento de proteínas para definir la eficacia del presente enfoque. Se usaron estas proteínas celulares inmunopurificadas para desarrollar un alineamiento de proteínas, que consistía en 12 puntos en un tamaño total de 1,5x2 cm. Cada una de las 12 disoluciones de proteínas (2,5 µl) se cargó manualmente sobre puntos individuales. Se colocó IgG conjugada con peroxidasa sobre cada membrana como control positivo y para la orientación del alineamiento.

Se incubaron sueros de mujeres control normales (n=20), mujeres con enfermedad ovárica benigna (n=20) y mujeres con cáncer de ovarios invasivo (n=20) a una dilución 1:100 con las membranas durante la noche a 4°C. Entonces se incubaron las membranas con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa y se visualizaron mediante ECL. Se obtuvieron imágenes de la película resultante y se analizaron usando software de análisis de Kodak para el reconocimiento y la cuantificación de puntos. La absorbancia de más de 900 píxeles se estableció como positiva y se comparó el porcentaje de sueros positivos para la inmunorreactividad.

Los sueros de todas las mujeres con cáncer de ovarios invasivo reconocieron al menos 2/12 antígenos sometidos a prueba; sin embargo, los sueros de los controles y las mujeres con enfermedad benigna también presentaban reconocimiento significativo de al menos un antígeno. En cambio, el reconocimiento de cuatro o más de estos antígenos se limita a sueros de mujeres con cáncer de ovarios invasivo. El establecimiento del reconocimiento de 4 o más antígenos como punto de corte produjo un ensayo con la capacidad para diferenciar entre pacientes con cáncer de ovarios invasivo y enfermedad ovárica benigna con una sensibilidad = 100%, una especificidad = 76% y un valor predictivo positivo = 100%. Véase la figura 6.

Tabla 1. Antígenos celulares aislados de células de cáncer de ovarios usados para el alineamiento y el porcentaje de pacientes con cáncer de ovarios con autoanticuerpos contra cada proteína en los ensayos.

Diana de proteína antigénica	Pacientes con IgG autorreactiva(%)
Familia de genes de secuencia homeótica	
Hox A7	11/36 (30,6%)
Hox B7	9/36 (25,0%)
Familia de genes supresores de tumores	
p53	23/36 (63,9%)
p63	10/36 (27,8%)
p73	7/36 (19,4%)
Oncogenes	
myc	14/36 (38,9%)
ras	12/36 (33,3%)
Familia de genes relacionados con factores de crecimiento	
c-erb2/HER/neu	13/36 (36,1%)
A114 (EGFR cinasa)	8/36 (22,2%)
Otras	
Fosfatasa alcalina de tipo placentario	19/36 (52,8%)
NY-ESO-1	17/36 (47,2%)
EpCAM	27/36 (75,0%)

5 Para definir parámetros adicionales, más allá de la diferenciación de masas ováricas benignas y malignas, se examinaron proteínas derivadas de tumores adicionales.

10 La figura 7 presenta una imagen de un alineamiento de 36 proteínas. Basándose en estos resultados, este formato de alineamiento puede diferenciar el reconocimiento de antígenos asociado con cáncer de ovarios en estadio temprano frente a tardío. Los datos presentados en la figura 7 se basan en antígenos a partir de una única línea celular de cáncer de ovarios (UL-1). Ciertos antígenos de otras líneas de células tumorales pueden presentar una reactividad más intensa. Los antígenos óptimos a partir de las diferentes líneas de tumores de ovarios, que presentan una reactividad cruzada máxima entre todos los pacientes con cáncer de ovarios, pueden determinarse específicamente para su uso en el diagnóstico de enfermedades en estadio temprano.

EJEMPLO 6

EVALUACIÓN DE UN ALINEAMIENTO DE PROTEÍNAS AISLADAS A PARTIR DE DIFERENTES CÁNCERES

15 La tabla a continuación indica la distribución de un alineamiento, indicando los 20 antígenos aislados a partir de 4 cánceres de ovarios diferentes (dando como resultado un total de 80 Ag) que se evaluaron para determinar su capacidad para detectar autoanticuerpos en pacientes con cáncer en comparación con los controles. Las cuatro líneas celulares de cáncer de ovarios utilizadas fueron A = UL-1, B = UL-2, C = UL-3 y D = UL-6, que se dan a conocer en detalle en la descripción detallada.

Tabla 2: Distribución del alineamiento de antígenos para detectar autoanticuerpos

HRP	hulgG	hulgG	hulgG	hulgG	hulgG	hulgG	hulgG	BSA	blanco
p53-A	p53-B	p53-C	p53-D	p63-A	p63-B	p63-C	p63-D	p63-C	p63-D
p73-A	p73-B	p73-C	p73-D	B23-A	B23-B	B23-C	B23-D	B23-C	B23-D
C23-A	C23-B	C23-C	C23-D	CA125-A	CA125-B	CA125-C	CA125-D	CA125-C	CA125-D
MUC1-A	MUC1-B	MUC1-C	MUC1-D	MUC16-A	MUC16-B	MUC16-C	MUC16-D	MUC16-C	MUC16-D
cerb//HER-A	cerb//HER-B	cerb//HER-C	cerb//HER-D	NY-ESO1-A	NY-ESO1-B	NY-ESO1-C	NY-ESO1-D	NY-ESO1-C	NY-ESO1-D
SCP1-A	SCP1-B	SCP1-C	SCP1-D	SSX1-A	SSX1-B	SSX1-C	SSX1-D	SSX1-C	SSX1-D
SSX2-A	SSX2-B	SSX2-C	SSX2-D	SSX4-A	SSX4-B	SSX4-C	SSX4-D	SSX4-C	SSX4-D
HSP27-A	HSP27-B	HSP27-C	HSP27-D	HSP60-A	HSP60-B	HSP60-C	HSP60-D	HSP60-C	HSP60-D
GRP78-A	GRP78-B	GRP78-C	GRP78-D	HSP90-A	HSP90-B	HSP90-C	HSP90-D	HSP90-C	HSP90-D
HoxA7-A	HoxA7-B	HoxA7-C	HoxA7-D	HoxB7-A	HoxB7-B	HoxB7-C	HoxB7-D	HoxB7-C	HoxB7-D
PLAP-A	PLAP-B	PLAP-C	PLAP-D	EpCAM-A	EpCAM-B	EpCAM-C	EpCAM-D	EpCAM-C	EpCAM-D
ras-A	ras-B	ras-C	ras-D	myc-A	myc-B	myc-C	myc-D	myc-C	myc-D
procathD-A	procathD-B	procathD-C	procathD-D	mesotelina A	mesotelina B	mesotelina C	mesotelina D	mesotelina C	mesotelina D
survivina-A	survivina-B	survivina-C	survivina-D	EGFK-A	EGFK-B	EGFK-C	EGFK-D	EGFK-C	EGFK-D
mdm2-A	mdm2-B	mdm2-C	mdm2-D	TAG72-A	TAG72-B	TAG72-C	TAG72-D	TAG72-C	TAG72-D

Para cáncer cervical, se evaluó el suero de cada uno de los siguientes dieciséis sujetos para detectar la presencia de anticuerpos en respuesta a proteínas aisladas de las líneas celulares de cáncer cervical. Esto incluía doce sujetos con cáncer cervical (adenocarcinoma, de células escamosas y adenocarcinoma), y cuatro controles (sujetos sin cáncer cervical). También se evaluó la reactividad tras tratarse los cultivos de células con ácido retinoico.

5 Se detectó la mayor reactividad en las fracciones solubles de todas las líneas celulares (ME180, SiHa, CaSki y C33A) y era estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (figuras 8A y 8B). Se detectó la menor reactividad en la fracción de membrana de todas las líneas celulares. Se cuantificó la reactividad en píxeles. Globalmente, CaSki (HPV 16 y 18) demostró la mayor reactividad y cuando se comparó con las otras líneas celulares tenía la mayor reactividad en las fracciones exosómica y soluble ($p < 0,05$). C33A, la línea celular sin HPV, demostró la mayor reactividad en la fracción de membrana. Me180 (HPV-39) demostró la menor cantidad de reactividad.

Se detectó un reconocimiento similar de antígenos en cada línea celular. Hubo un reconocimiento diferencial de antígenos entre diferentes líneas celulares. Los sueros control no demostraron ninguna reactividad.

15 En los sueros que se trataron con ácido retinoico, hubo una disminución de la reactividad de los antígenos solubles asociados a células ($p < 0,05$) en todas las líneas celulares (figura 9). Se notó un aumento de reactividad con los antígenos asociados a células. Esto se detectó en la fracción de membrana de todas las líneas celulares ($p < 0,05$), la fracción nuclear en las líneas celulares C33A y SiHa ($p < 0,05$), y la fracción citosólica de la línea celular SiHa ($p < 0,05$) (figura 10).

EJEMPLO 7

EVALUACIÓN DE ENSAYO DE DIAGNÓSTICO EN MÚLTIPLES CÁNCERES DIFERENTES

20 Métodos para el ejemplo 7

Reconocimiento de dianas antigénicas específicas por IgG reactiva con tumores. Dado que pudieron demostrarse diferencias cuantitativas en la reactividad de autoanticuerpos obtenidos a partir de los sueros de pacientes con cáncer de ovarios frente a antígenos de tumor de ovarios basándose en el estadio de la enfermedad, entonces se investigaron diferencias cualitativas usando inmunotransferencia de ELISA para cuantificar el nivel de inmunoreactividad con antígenos específicos. Se aislaron exosomas de los medios acondicionados de 3 líneas celulares de tumor de ovarios (UL-1, UL-3, UL-6) en crecimiento en fase logarítmica.

30 Preparación de antígenos reactivos específicos. Se aislaron proteínas reactivas para dianas de ensayo a partir de exosomas purificados mediante cromatografía de inmovilización. Se obtuvieron anticuerpos comerciales para cada proteína de interés. Se inmovilizaron estos anticuerpos sobre columnas HITRAP NHS™ de 1 ml (GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante. Tras la centrifugación de exosomas a 100.000xg, se solubilizó el sedimento en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), que contenía SDS al 0,3%, ortovanadato de sodio 2 mM, DTT 200 mM, fluoruro de sodio 1 mM, pirofosfato de sodio 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM en hielo. Se sometió el lisado a sonicación y se centrifugó a 10.000xg durante 15 minutos. Se clarificaron las proteínas solubilizadas mediante incubación con proteína G-agarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 1 hora. Se aplicó este material de proteína solubilizada clarificada a la columna de inmovilización y se incubó durante la noche a 4°C. Se lavó el material unido 3 veces con PBS que contenía Triton X-100 al 1% y se liberaron las proteínas antigénicas específicas mediante glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8, se neutralizaron con Tris 1 M. Se aplicó esta preparación de antígeno a columnas MACROSPHERE GPC™ 150/60 (4,6x500) (Grace, Deerfield, IL) equilibradas en TBS y se procesaron de manera isocrática. Se evaluaron alícuotas de los eluatos mediante inmunotransferencia de tipo Western para confirmar la fracción molecular apropiada. Se separó adicionalmente la fracción de antígeno apropiada mediante cromatografía RP-HPLC en una columna 4,6x250 mm C8 (300 Å). Se secó el pico de proteína mediante centrifugación a vacío y se resuspendió en TBS y se cuantificó mediante ensayo de proteínas.

45 Reactividad de autoanticuerpos definida mediante ELISA. Para definir el nivel de reactividad de autoanticuerpos derivados de pacientes frente a exosomas derivados de tumores, se realizó un ensayo ELISA. Se diluyeron 1:25 proteínas aisladas de cada preparación de inmovilización en un tampón de acoplamiento que consistía en carbonato de sodio 100 mM y NaCl 0,5 M, pH 8,3. Se añadieron alícuotas (2 µg/pocillo) a pocillos de una placa de microtitulación IMMULON 4™ de 96 pocillos (Chantilly, VA) y se incubaron durante la noche a 37°C. Se bloquearon las placas con leche desnatada en polvo al 5% en PBS durante 1 hora y posteriormente se lavaron tres veces con PBS más Tween-20 al 0,2% y leche desnatada en polvo al 5%. Entonces se incubaron las placas con 200 µl de sueros, diluidos 1/100, de pacientes y controles normales, durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas y se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (diluido 1/5000) durante 1 hora. Tras el lavado, se determinó la presencia de anticuerpo unido incubando los pocillos con una disolución de tampón citrato 50 mM que contenía diclorhidrato de o-fenilendiamina (0,4 mg/ml) (OPD, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y midiendo la absorbancia a 490 nm.

Resultados para el ejemplo 7

55 Usando antígenos purificados mediante inmovilización, se construyeron placas de microtitulación para cada ensayo. Se incubaron sueros de mujeres control normales (n=10), mujeres con enfermedad ovárica benigna (n=10) y mujeres con cáncer de ovarios (n=10 para cada estadio I-IV) a una dilución 1:100 con los pocillos por duplicado durante la noche

a 4°C. Se lavaron los pocillos con TBS tres veces y después se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 490 nm. Se determinó y se trazó la absorbancia media de cada paciente.

5 La inmunorreactividad tanto para controles normales como para mujeres con enfermedad benigna estaba en el nivel inicial y se consideró negativa para todos los antígenos sometidos a prueba (figura 11). Cada punto en las gráficas en la figura 11 representa la media para cada paciente. En todos los casos, las medias para el grupo entero fueron estadísticamente diferentes del control y los casos benignos.

10 Para evaluar la utilidad de los métodos dados a conocer en el presente documento como diagnóstico para cáncer en general, se repitió este estudio, excepto porque se usaron sueros de mujeres con cánceres avanzados de páncreas, pulmón, mama y colon. Todas las pacientes con cáncer sometidas a prueba parecían generar autoanticuerpos que reconocían antígenos de nucleofosmina, catepsina D, p53 y SSX. Sólo las mujeres con cáncer de ovarios reconocían fosfatasa alcalina de tipo placentario (PLAP). Las pacientes con cáncer de pulmón y colon reconocieron más fuertemente survivina (figura 12).

EJEMPLO 8

15 DEFINIR EPÍTOPOS ANTIGÉNICOS EN PROTEÍNAS RECOMBINANTES FRENTE A NATURALES

Se separaron una parte (20 ug) de cada antígeno natural específico y su equivalente recombinante mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Tras la electroforesis, se visualizaron las bandas mediante tinción con azul de Coomassie y se escindió cada banda. Se equilibraron los geles con tampón de procesamiento de SDS. Se aplicaron los fragmentos de gel que contenían las proteínas específicas al pocillo de un gel de acrilamida al 20%. Se cortaron los fragmentos de gel en fragmentos más pequeños y se insertaron en el pocillo de muestra del gel de apilamiento para la SDS-PAGE. Se añadieron cien ul de la disolución de electrodo a los fragmentos de gel secos. Tras la incubación durante 1 h, se recubrieron 20 ul de tampón de muestra de SDS diluido que contenía 10 ul de proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) (0,1 ug/ml) en agua desionizada sobre la disolución de muestra. Se realizó la electroforesis hasta que la muestra y la proteasa se apilaron en el gel superior, y se interrumpió durante 1 h para digerir la proteína. Entonces se continuó la electroforesis y se sometieron los digestos separados a electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. Entonces se incubaron las membranas con suero de paciente, diluido 1:100, durante la noche. Tras lavar 3X con TBS, se incubaron las membranas durante 1 hora con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario. Se visualizaron los inmunocomplejos unidos mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)

35 Para p53, pacientes tanto 1 como 3 reconocieron una banda de péptido intermedio en la proteína derivada de tumor, que no se observó en los péptidos de la proteína recombinante (figura 13). Para GRP78, todos los pacientes reconocieron 3-5 bandas de péptido adicionales en la proteína derivada de tumor, que no se observaron en los péptidos de la proteína recombinante (figura 13). Para nucleofosmina, todos los pacientes mostraron una reactividad más intensa con la proteína derivada de tumor frente a la proteína recombinante (figura 13). El paciente 2 reconoció 3 bandas adicionales en la nucleofosmina derivada de tumor y el paciente 3 reconoció 1 banda de menor peso molecular en comparación con la proteína recombinante. Estos resultados demuestran que las proteínas derivadas de tumor naturales derivadas de exosomas muestran epítopos antigénicos adicionales en comparación con proteínas recombinantes.

40 EJEMPLO 9

ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO PARA DETECTAR TRASTORNOS DE ESTERILIDAD

45 Para cuantificar el nivel de inmunorreactividad mediante anticuerpos derivados de pacientes con trastorno de esterilidad, se cuantificó mediante ELISA la presencia y reactividad de IgG dentro de los sueros de pacientes con endometriosis frente a antígenos celulares derivados de membrana endometrial, núcleo y citosol. Se diluyeron 1:25 proteínas aisladas de cada fracción subcelular en un tampón de acoplamiento que consistía en carbonato de sodio 100 mM y NaCl 0,5 M, pH 8,3. Se añadieron alícuotas a pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos IMMULON 4™ (Chantilly, VA) y se incubaron durante la noche a 37°C. Se bloquearon las placas con leche desnatada en polvo al 5% en PBS durante 1 hora y posteriormente se lavaron tres veces con PBS más Tween-20 al 0,2% y leche desnatada en polvo al 5%. Entonces se incubaron las placas con 200 μl de sueros, diluidos 1/100, de pacientes y controles normales, durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas y se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (diluido 1/5000) durante 1 hora. Tras el lavado, se determinó la presencia de anticuerpo unido incubando los pocillos con una disolución de tampón citrato 50 mM que contenía diclorhidrato de o-fenilendiamina (0,4 mg/ml) (OPD, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y midiendo la absorbancia a 490 nm.

55 Se obtuvieron muestras de suero de mujeres que tenían entre 21-34 años de edad y con diagnóstico de esterilidad, resultante de endometriosis, insuficiencia ovárica prematura (IOP) y pérdida del embarazo recurrente. Los sujetos control eran mujeres de edad correspondiente sin síntomas de dolor, sin anomalías pélvicas y sin cirugía pélvica previa. Se determinó el estadio de la endometriosis según la clasificación de la sociedad americana de medicina reproductiva revisada (rASRM). Se obtuvieron las muestras de las divisiones de esterilidad y endocrinología reproductiva del sistema

5 sanitario de Greenville y de la Universidad de Louisville. Se obtuvieron veinticinco muestras de controles, 25 pacientes cada uno de mujeres con endometriosis en estadio II y endometriosis en estadio III, 18 pacientes que experimentaban pérdida del embarazo recurrente, y 11 pacientes con insuficiencia ovárica prematura. Se recogieron las muestras con un consentimiento informado revisado por el comité para estudios en seres humanos en el GHS y la Universidad de Louisville. Se obtuvieron muestras de sangre venosa en tubos heparinizados y se aisló el suero tras la coagulación. Se almacenaron los sueros a -70°C hasta su uso.

10 Aunque se observó variabilidad, todos los pacientes con trastornos de esterilidad sometidos a prueba mostraron un nivel significativo de autoanticuerpos, al contrario que pacientes control normales ($p < 0,0001$). Dado que los pacientes mostraron un nivel potenciado de autoanticuerpos y el nivel de estos autoanticuerpos mostró una variabilidad significativa, se realizaron comparaciones estadísticas entre la absorbancia relativa para estas IgG y estadio de la enfermedad. Se observó que el nivel de IgG reactiva aumentaba con el estadio de la enfermedad, con sueros de pacientes en estadio II que mostraban un aumento significativo por encima de sueros normales ($p < 0,001$) (figura 14). El nivel de inmunorreactividad presente en el estadio III era significativamente superior al detectado en los sueros de pacientes en estadio II ($p < 0,01$) para todas las fuentes de antígeno.

15 Para caracterizar la reactividad de estos autoanticuerpos con antígenos del endometrio, se analizaron adicionalmente muestras de suero de controles normales y mujeres con endometriosis (estadios II y III) mediante inmunotransferencia tipo Western. Se presentan inmunotransferencias representativas de los grupos de pacientes en la en la figura 15. Los pacientes control (sin endometriosis) no lograron mostrar un reconocimiento significativo de ninguno de los antígenos celulares.

20 Los pacientes con endometriosis en estadio II mostraron una reactividad intensa con antígenos celulares tanto del endometrio como del ovario. En estos tejidos, la reacción más fuerte se observó con antígenos de las fracciones de membrana del endometrio, seguido por antígenos de membrana del ovario. Los sueros de pacientes con endometriosis en estadio III mostraron un patrón de reactividad similar; sin embargo, se observó mayor intensidad con antígenos de membrana de todas las fuentes. Dentro de los antígenos de membrana endometrial, todos los pacientes con endometriosis reconocieron proteínas a 80 y 140 kD, mientras que los pacientes con enfermedad en estadio III reconocieron bandas adicionales a 10, 28, y 40 kD. El reconocimiento común de la proteína de membrana de 140 kD se compartió con antígenos de membrana de ovario. En general, los pacientes con endometriosis también mostraron un fuerte reconocimiento compartido de proteínas de 90 y 100 kD, mientras que los pacientes con enfermedad en estadio III también reconocieron bandas adicionales a 50 y 78 kD. Se observó poca reactividad con antígenos derivados del citosol.

25 Debido a la intensidad de la reactividad, se analizó adicionalmente la unión de anticuerpos separando los antígenos de membrana endometrial mediante electroforesis en dos dimensiones (figuras 16A y 16B). Este enfoque permitió la separación adicional de los antígenos de membrana. El nivel aumentado de reactividad observado en pacientes con endometriosis en estadio III, frente a estadio II, parece resultar tanto del aumento de reactividad con los mismos componentes como del reconocimiento de componentes adicionales.

30 Basándose en los hallazgos de este estudio, una evaluación de autoanticuerpos endometriales frente a proteínas celulares específicas y/o supresión de la activación de NK puede servir como indicadores de diagnóstico de endometriosis. La presencia de autoanticuerpos reactivos con antígenos de membrana endometrial específicos parece ser única para el desarrollo de endometriosis y está correlacionada con el estadio de la enfermedad. La evaluación de la activación de NK por sí sola puede no ser específica para el uso de un marcador de diagnóstico, pero junto con la presencia de autoanticuerpos pueden proporcionar la especificidad y sensibilidad para un diagnóstico definitivo de endometriosis.

35 Para evaluar este enfoque para diferenciar entre etiologías de esterilidad, el molde de alineamiento de proteínas consistió en 34 puntos con 4 puntos de anchura y 80 puntos de longitud en un tamaño total de 4x8 cm. Este molde se usó como guía para disponer en puntos disolución sobre membranas MAGNAGRAPH (MSI). Para disponer en puntos proteínas de captura sobre las membranas, se colocó el molde sobre una caja de iluminación y se colocó la membrana MAGNAGRAPH sobre el molde. Se aislaron exosomas de los cultivos de células endometriales Hec-1A. Se solubilizaron los exosomas aislados y después se precipitaron usando SSA al 0,25%. Entonces se resuspendieron las proteínas exosómicas precipitadas en TBS y se sometieron a sonicación. Entonces se fraccionó esta disolución de proteína usando una columna de HPLC en fase inversa C18, eluyendo con un gradiente del 0-100% de acetonitrilo. Se concentraron los 32 picos de proteína resultantes y se eliminó el disolvente mediante centrifugación a vacío. Se resuspendió cada proteína en TBS y se determinó la concentración de proteína. Se cargó manualmente cada disolución de proteína (0,25 μl) sobre un único punto. Se diluyó cada disolución de proteína hasta una concentración inicial de 100 $\mu\text{g/ml}$ en azul de bromofenol (para su seguimiento). Para cada proteína, se prepararon puntos de 2 ng. Se bloquearon las membranas con BSA al 5% en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, NaCl 0,15 M (TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las membranas 3 veces con TBS más Tween-20 al 0,1% y 2 veces con TBS. Entonces se almacenaron las membranas en bolsas selladas y se refrigeraron hasta su uso.

40 Para pruebas de diagnóstico, se realizó el ensayo con suero. Se sometieron a prueba diluciones (1:100) de sueros de pacientes conocidos y controles normales fértiles, no embarazadas, usando los alineamientos de proteínas dados a conocer en el presente documento para definir la dilución óptima de los sueros, en combinación con diluciones de

- 5 proteína diana, para identificar pacientes con esterilidad específica de etiología. Se lavaron las membranas del alineamiento con TBS-Tween-20 antes de su uso y se prepararon diluciones en serie de 10 veces de suero de pacientes en TBS. Se incubarán los sueros diluidos con las membranas durante la noche a 4°C. Se lavaron las membranas 3 veces con TBS más Tween-20 al 0,1%. Entonces se incubó la membrana con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa, se lavó 3 veces con TBS, y se visualizó mediante ECL. Se obtuvieron imágenes de la película resultante con una cámara Kodak D290 y se analizaron usando software de análisis Kodak para el reconocimiento y la cuantificación de puntos (figura 17). Se observaron patrones distintos de inmunorreactividad. Basándose en este reconocimiento diferencial de antígenos de proteína endometrial, pueden distinguirse pacientes y diagnosticarse con trastornos de esterilidad resultante de endometriosis frente a los resultantes de insuficiencia ovárica prematura.
- 10 En un enfoque similar, también se examinaron mujeres que experimentaban pérdidas del embarazo recurrentes para determinar la presencia de autoanticuerpos frente a antígenos derivados de placenta, usando inmunotransferencia tipo Western (figura 18). El embarazo da como resultado la producción de autoanticuerpos, que resultan del desplazamiento normal de una respuesta inmunitaria de Th1 a Th2. Sin embargo, mujeres que experimentaban pérdida del embarazo recurrente mostraron tanto aumento de inmunorreactividad global como reconocimiento de componentes únicos. Los
- 15 pacientes asintomáticos, que posteriormente experimentan una pérdida del embarazo recurrente, reconocen antígenos adicionales, a pesos moleculares inferiores a 45.000 Daltones y superiores a 130.000 Daltones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Shakra et al., Cancer and autoimmunity: autoimmune and rheumatic features in patients with malignancies. *Annals Rheum Dis* 60:433-440, 2001.
- 20 Barbouche et al., Prognostic significance of autoantibodies to laminin in the sera of breast cancer patients. *Europ J Clin Chem Clin Biochem* 32: 511-514,1994.
- Brichory et al., Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res* 61:7908-7912, 2001.
- 25 Canevari et al., Revised anti-cancer serological response: Biological significance and clinical implications. *Annals Oncol* 7:227-232, 1996.
- Chinni et al., Cathepsin D and glucose-regulated protein 78 recognized by the humoral response of ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 3: 1557-1564, 1997.
- Conroy et al., Autoantibodies to 90kD heat-shock protein in sera of breast cancer patients. *Lancet* 345:126, 1995.
- 30 Hellstrom et al., Principles of tumor immunity: Tumor antigens. In: DeVita VT, Hellman S, and Rosenberg SA, eds. *Biologic therapy of cancer*. New York: Lippincott, 1991: 35-52.
- Jung and Schluesener, *J Exp Med* 173: 273-276, 1991.
- Kotera Y et al., Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin muc-1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients.
- 35 Kutteh et al., Immunologic characterization of tumor markers in human ovarian cancer cell lines. *J Soc Gynecol Invest* 3:216-222, 1996.
- Labrecque et al., Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients. *Cancer Res* 53:3468-3471, 1993.
- Liotta et al., Proteomic patterns in sera serve as biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 88: S25-S28, 2003.
- Lubin et al., Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: Distribution on primary structure and exposure on protein surface. *Cancer Res* 53:5872-5876, 1993.
- 40 Merimsky et al., Antigens and antibodies in malignant melanoma. *Tumour Biol* 15:188-202, 1994.
- Nakamura et al. *Handbook of Experimental Immunology* (4th Ed.), Weir et al. (eds). Vol. 1, Chapter 27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
- Niklinska et al., Strong association between p53 protein accumulation, serum antibodies, and gene mutation in nonsmall cell lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 39:51-56, 2001.
- 45 Old LJ, Chen YT: New paths in human cancer serology. *J Exp Med* 187:1163-1167, 1998.
- Peoples et al., Breast and ovarian cancer specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proc Natl Amer Sci USA* 92: 432-436, 1995.
- Taylor and Doellgast, Quantitation of peroxidase-antibody binding to membrane fragments using column chromatography. *Analytical Biochemistry*, 98:53-59, 1979.

Taylor et al., Identification of antigenic components recognized by "membrane bound" antibodies from ovarian cancer patients. Am J Reprod Immunol 6:179-184, 1984.

Patente estadounidense n.º 3.817.837.

Patente estadounidense n.º 3.850.752.

5 Patente estadounidense n.º 3.939.350.

Patente estadounidense n.º 3.996.345.

Patente estadounidense n.º 4.275.149.

Patente estadounidense n.º 4.277.437

Patente estadounidense n.º 4.302.534.

10 Patente estadounidense n.º 4.366.241.

Patente estadounidense n.º 4.637.988.

Patente estadounidense n.º 4.786.594.

Patente estadounidense n.º 5.108.896.

Patente estadounidense n.º 5.229.302.

15 Patente estadounidense n.º 5.629.164.

Patente estadounidense n.º 5.691.154.

Vlock et al, Incidence of serum antibody reactivity to autologous head and neck cancer cell lines and augmentation of antibody reactivity following acid dissociation and ultrafiltration. Cancer Res 49:1361-1365, 1989.

20 Vogl et al., Autoimmunity against p53 predicts invasive cancer with poor survival in patients with ovarian mass. Brit J Cancer 83:1338-1343, 2000.

Winter et al., Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. Cancer Res 52: 4168-4174, 1992

Yamamoto et al., Infrequent presence of anti-c-myc antibodies and absence of c-myc oncoprotein in sera from lung cancer patients. Oncology 56:129-133, 1999.

25 Se entenderá que pueden cambiarse diversos detalles de la materia dada a conocer en este documento sin apartarse del alcance de la materia dada a conocer en este documento. Además, la descripción anterior es únicamente con fines de ilustración, y no con fines de limitación.

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar un trastorno asociado con la producción de autoanticuerpos en un sujeto, que comprende:
proporcionar una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto;
- 5 poner en contacto un antígeno con la muestra, en el que el antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos aislado de un exosoma;
- detectar autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno; y
- comparar un nivel de inmunorreactividad de autoanticuerpos frente al antígeno con un nivel de referencia para diagnosticar el trastorno en el sujeto.
- 10 2. Método para caracterizar un trastorno asociado con producción de autoanticuerpos en un sujeto, que comprende:
proporcionar una muestra biológica que comprende autoanticuerpos a partir de un sujeto;
- poner en contacto un antígeno con la muestra, en el que el antígeno comprende un péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos aislado de un exosoma;
- detectar los autoanticuerpos en la muestra inmunorreactivos con el antígeno; y
- 15 cuantificar un nivel de inmunorreactividad de autoanticuerpos con el antígeno para caracterizar de ese modo el trastorno en el sujeto.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el trastorno es un cáncer y la caracterización del trastorno comprende determinar un estadio del cáncer.
- 20 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que los autoanticuerpos están asociados con un cáncer o un trastorno de esterilidad.
5. Método según la reivindicación 3, en el que el cáncer es un cáncer epitelial o un adenocarcinoma.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el antígeno comprende un péptido de antígeno de cáncer seleccionado del grupo que consiste en un péptido de la familia de supresores de tumores, un péptido de unión a ácido nucleico, un péptido anti-apoptótico, un péptido de la familia de oncogenes, un péptido de secuencia homeótica, un péptido de antígeno de cáncer de testículos, un péptido de la familia de proteínas de choque térmico, un precursor enzimático del péptido de la familia de enzimas prolisosómicas, PLAP, un péptido de la familia de moléculas de adhesión, un péptido relacionado con adhesión y un péptido de la familia de cinasas.
- 25 7. Método según la reivindicación 4, en el que el trastorno de esterilidad se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia ovárica prematura (IOP), síndrome de ovario poliquístico (SOP), endometriosis, preeclampsia, nacimiento prematuro, restricción del crecimiento intrauterino y pérdida del embarazo recurrente.
- 30 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la muestra biológica comprende leche, sangre, suero, plasma, ascitis, fluido quístico, lágrimas, orina, saliva, tejido o combinaciones de los mismos.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el sujeto es un mamífero.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el exosoma se aísla de una célula.
- 35 11. Método según la reivindicación 10, en el que la célula es una célula cultivada.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la célula es una célula cancerosa.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la célula cancerosa es una célula de cáncer de ovarios, una célula de cáncer cervical, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer endometrial, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de pulmón, una célula de melanoma, una célula de cáncer pancreático o una célula de coriocarcinoma.
- 40 14. Método según la reivindicación 10, en el que la célula es una célula de placenta.
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la detección comprende una técnica seleccionada del grupo que consiste en ELISA, RIA, inmunoensayo múltiplex, inmunoprecipitación e inmunotransferencia de tipo Western.

16. Uso de un kit para detectar autoanticuerpos en una muestra para diagnosticar o caracterizar un trastorno, en el que el kit comprende un antígeno de péptido inmunorreactivo con autoanticuerpos y un recipiente para contener el antígeno, y en el que el antígeno se aísla de un exosoma.

17. Método según la reivindicación 16, en el que el antígeno está unido a un soporte.

5 18. Uso según la reivindicación 16 ó 17, que comprende una preparación de anticuerpos que se une a un autoanticuerpo.

19. Uso según la reivindicación 18, en el que la preparación de anticuerpos comprende un marcador detectable.

20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que los autoanticuerpos están asociados con un cáncer o un trastorno de esterilidad.

10

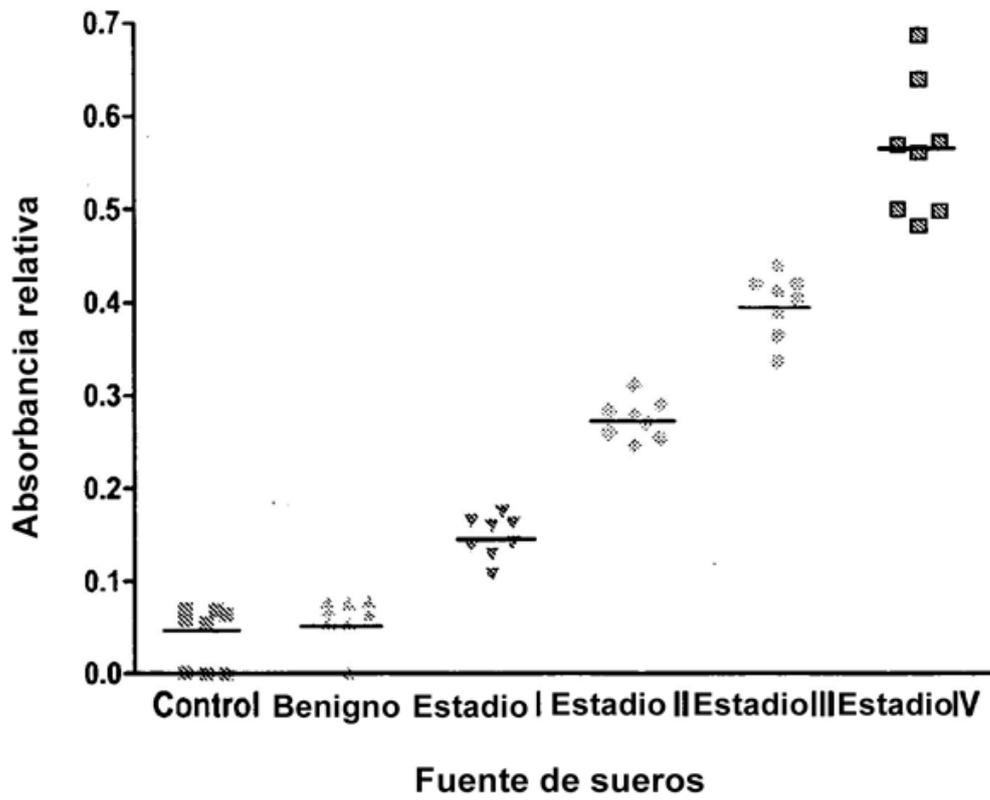


FIGURA 1

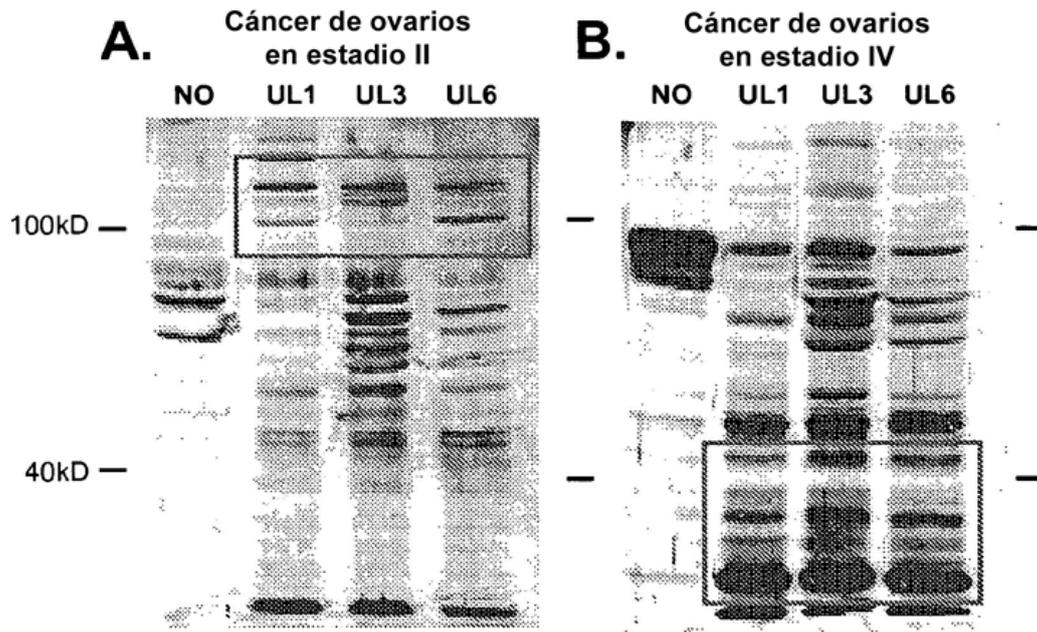


FIGURA 2

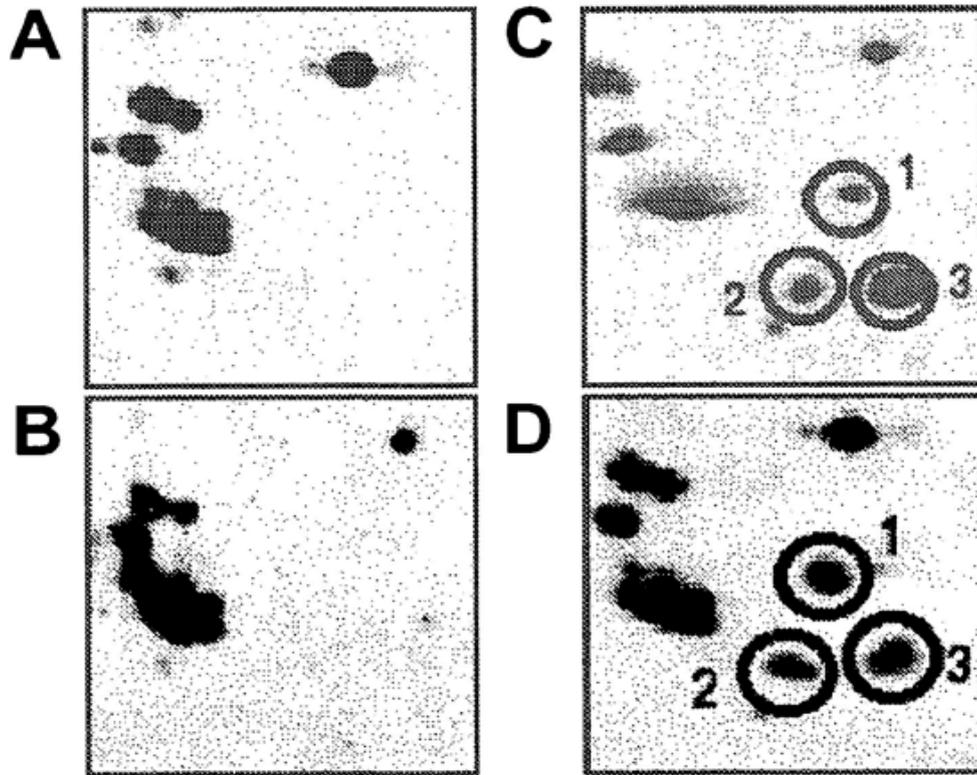


FIGURA 3

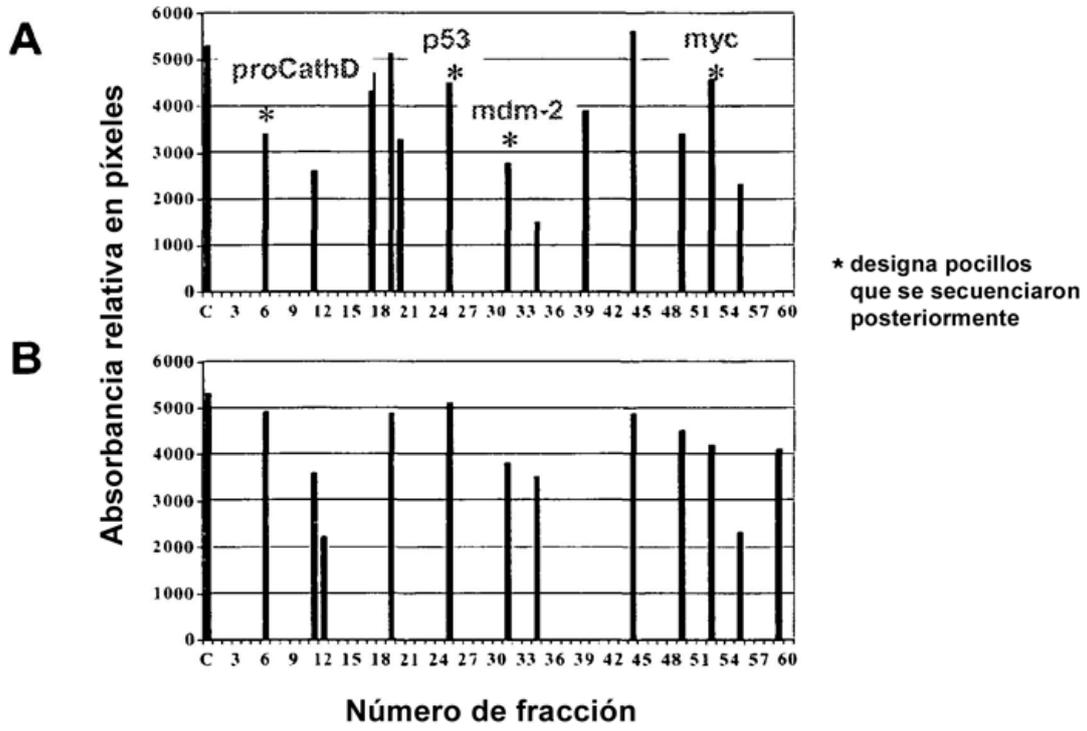


FIGURA 4

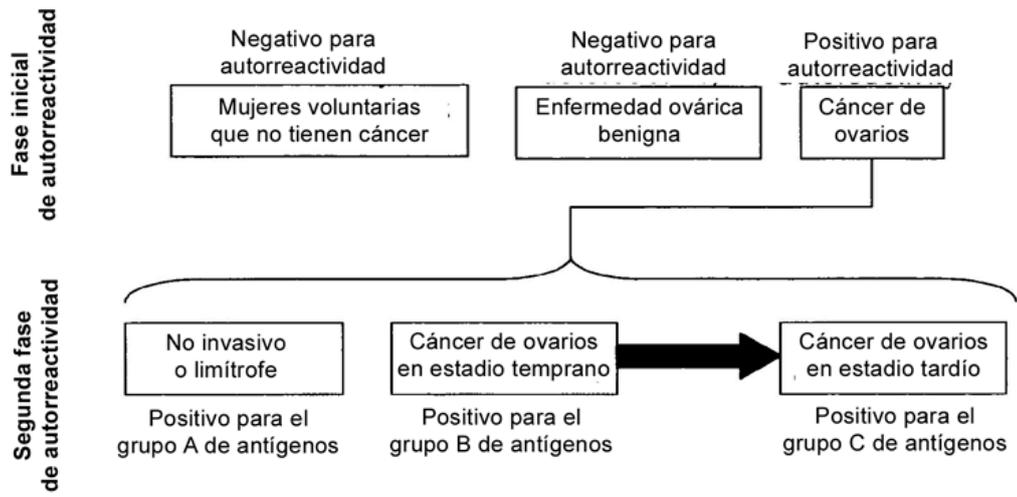


FIGURA 5

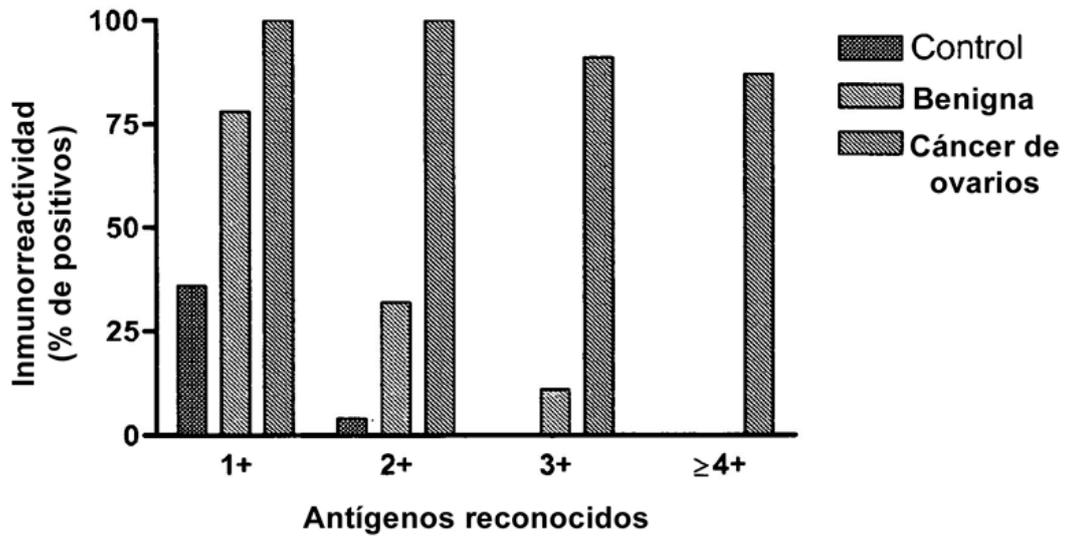


FIGURA 6

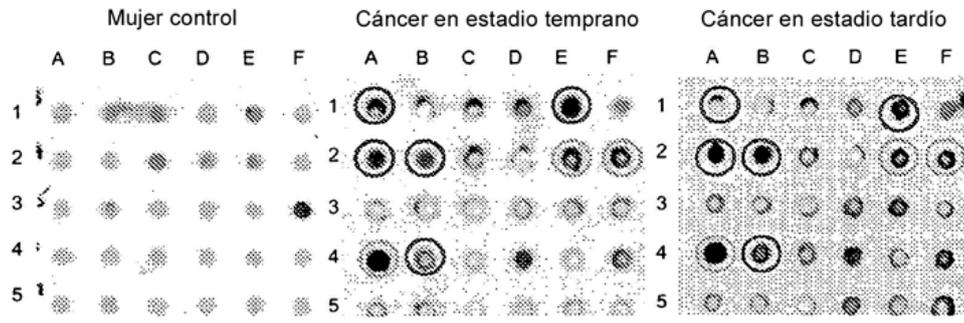
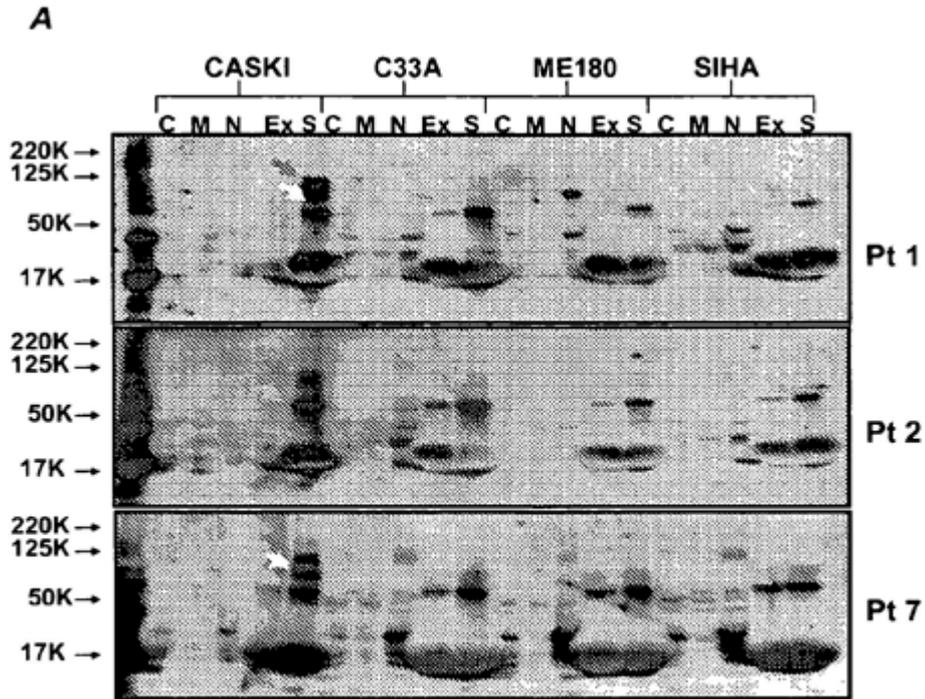


FIGURA 7



Reactividad de antisueros de pacientes con cáncer cervical con antígenos celulares.
C: citoplásmática; M: de membrana; N: nuclear; Ex: exosómica; S: soluble

B

Reactividad de antígenos derivados de líneas celulares de cáncer cervical con sueros de pacientes (n=12)

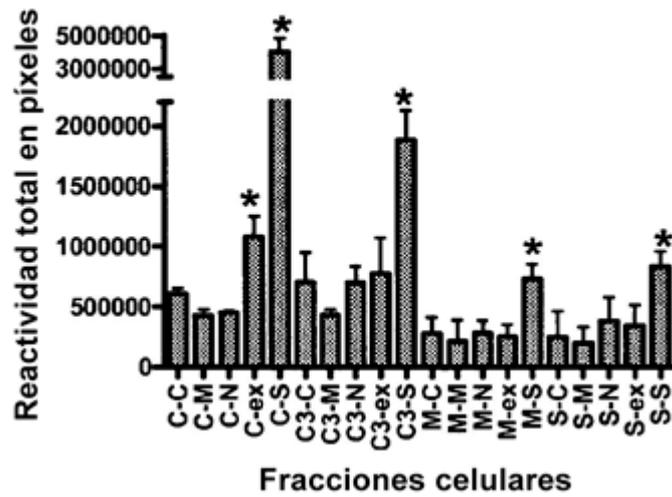


FIGURA 8

A. Antígenos solubles

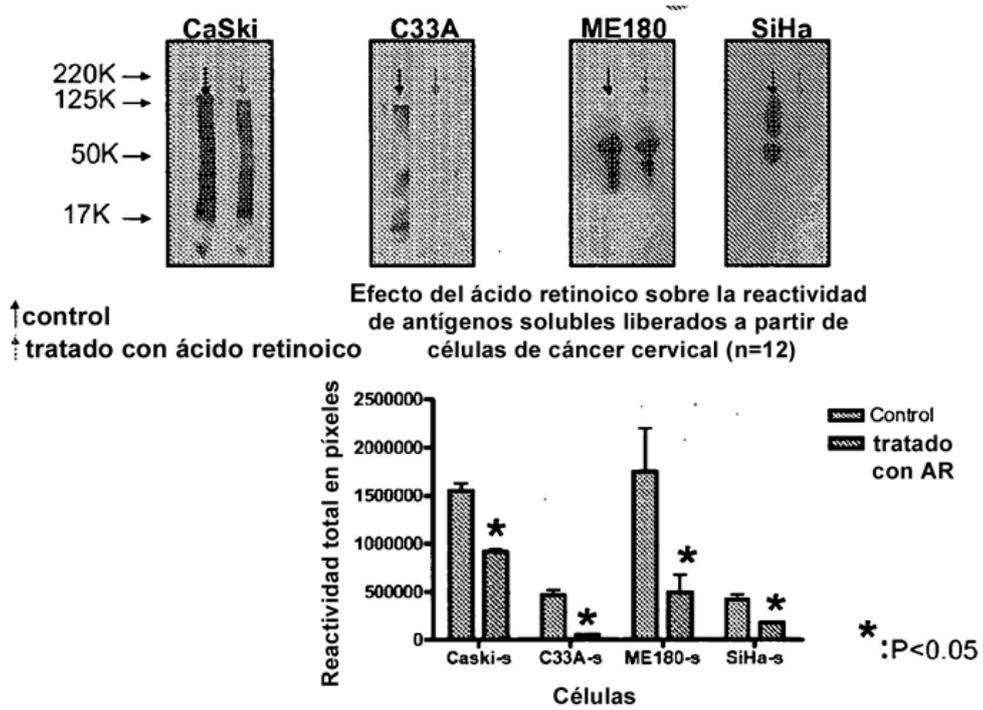


FIGURA 9

B. Antígenos asociados a células

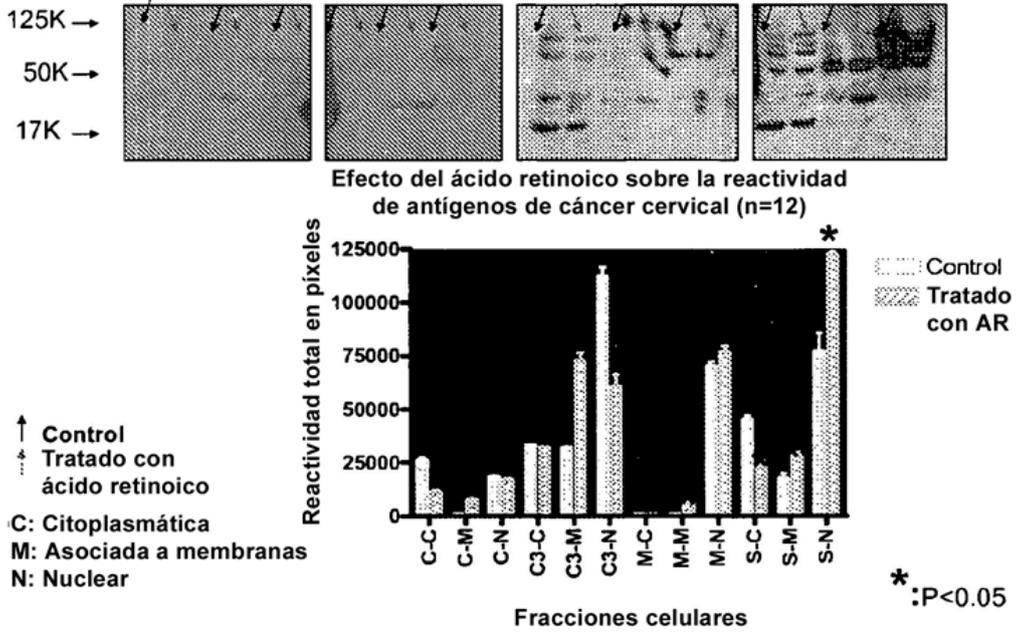


FIGURA 10

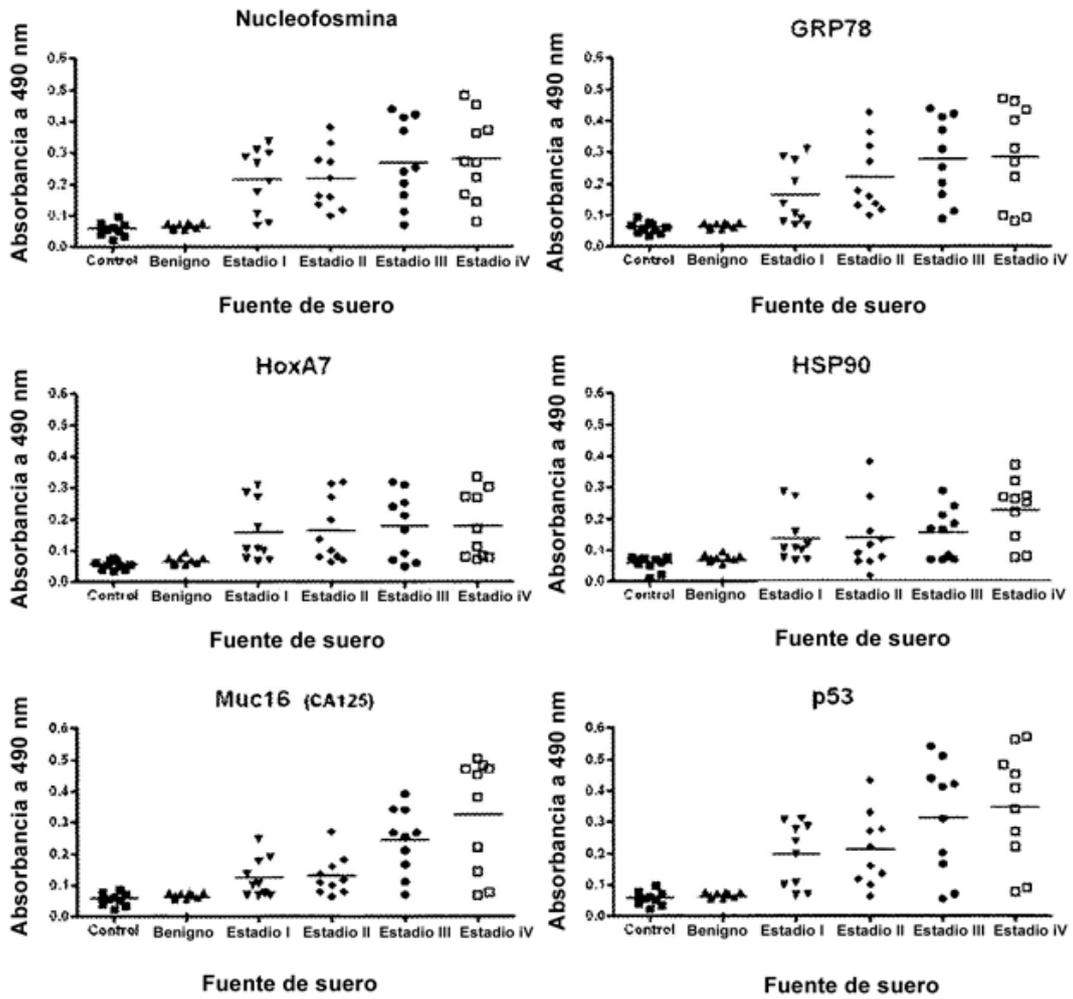


FIGURA 11

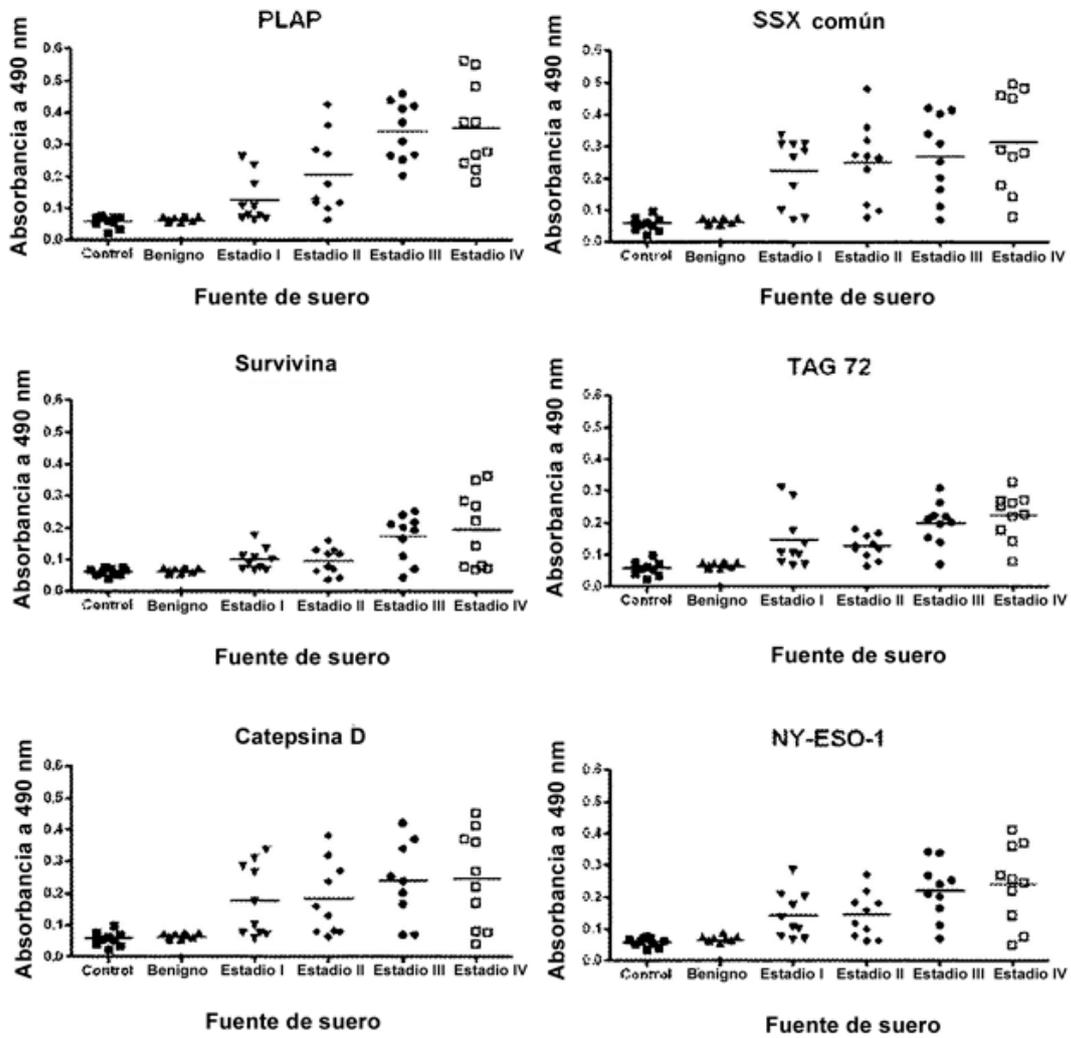


FIGURA 11 (cont.)

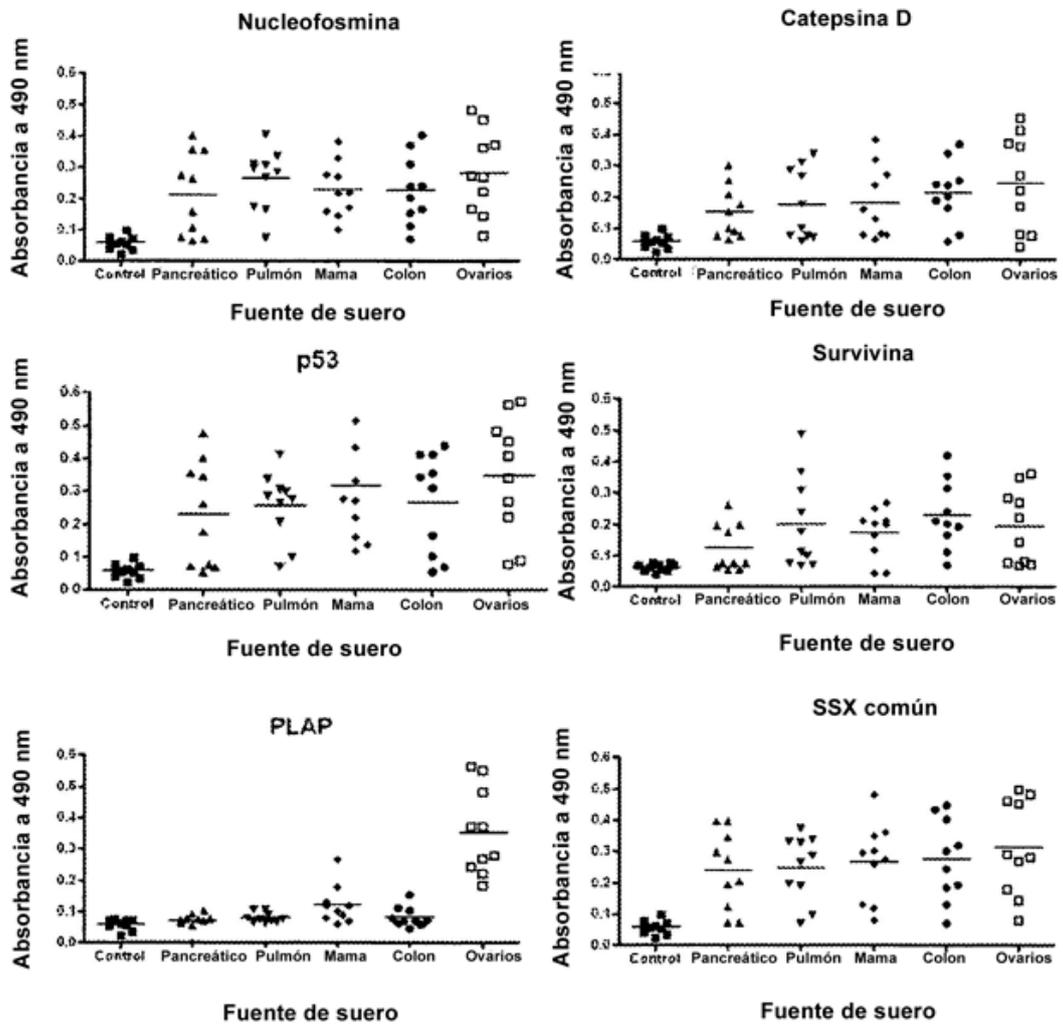


FIGURA 12

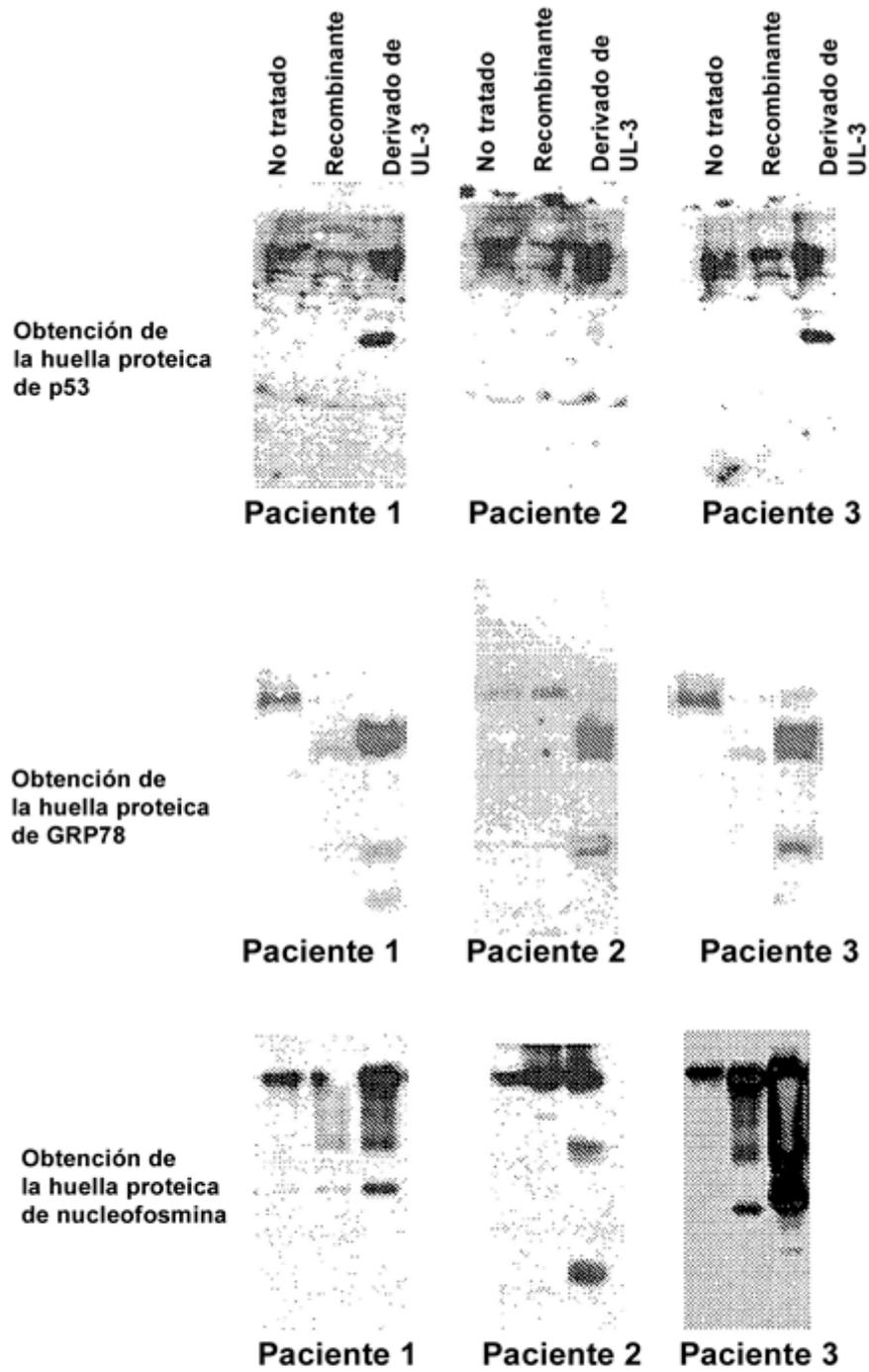


FIGURA 13

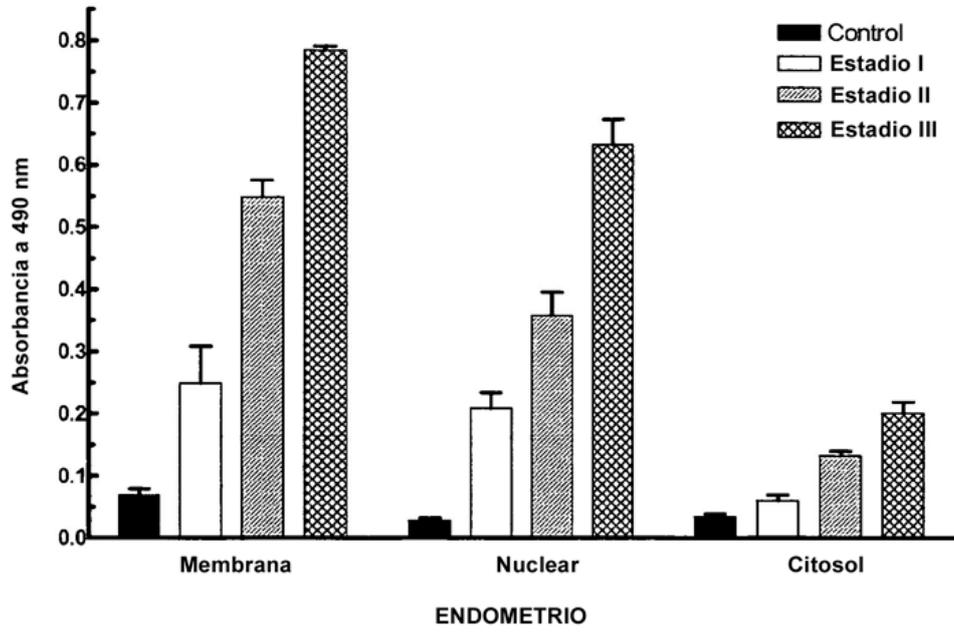


FIGURA 14

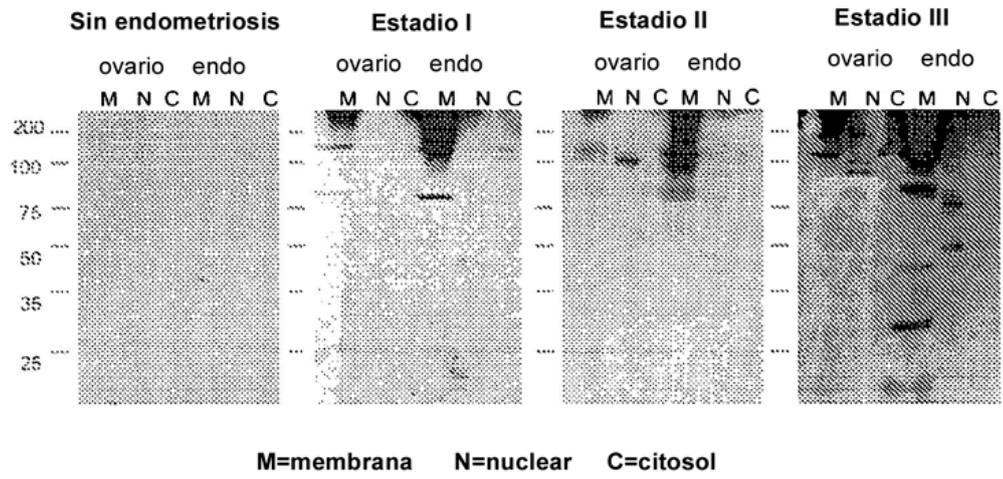


FIGURA 15

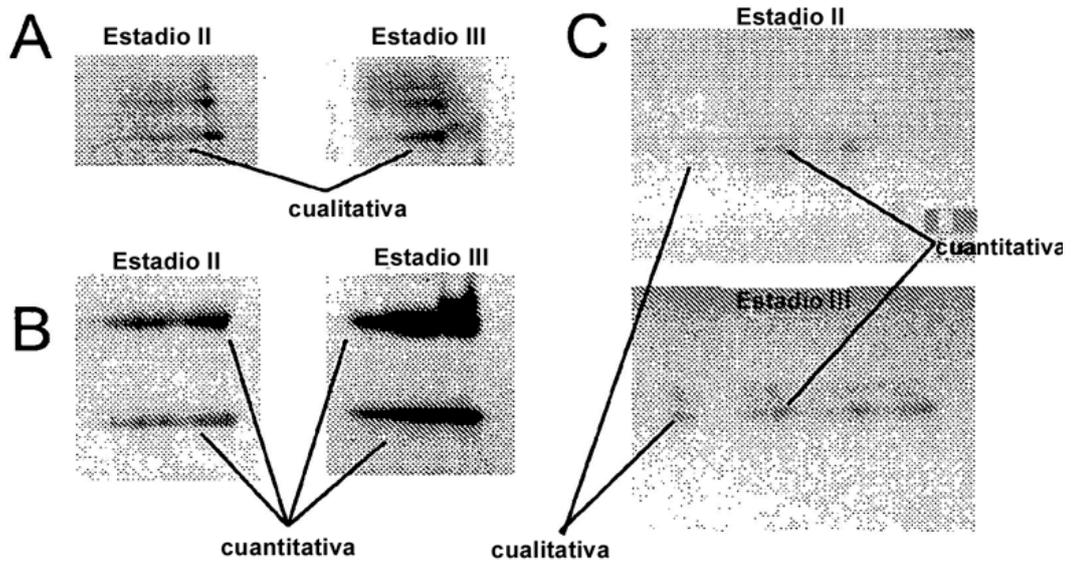
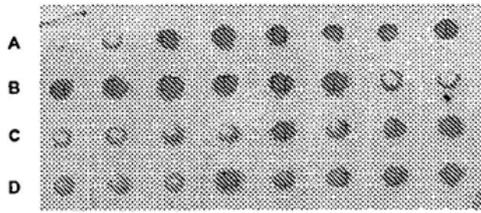
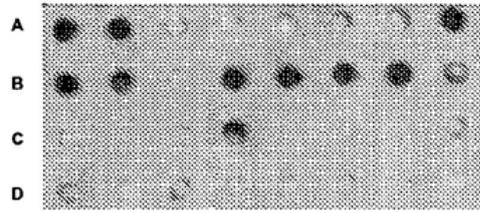


FIGURA 16

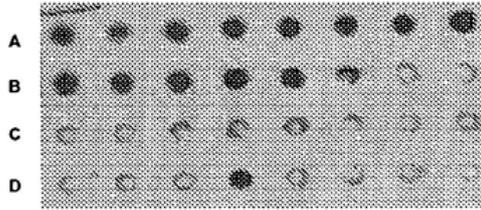
Paciente 1 - endometriosis



Paciente 3 - Insuficiencia ovárica prematura



Paciente 2 - endometriosis



Paciente 4 - Insuficiencia ovárica prematura

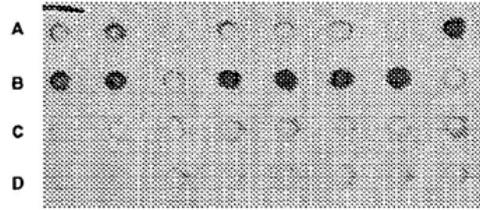


FIGURA 17

Antígenos derivados de la placenta

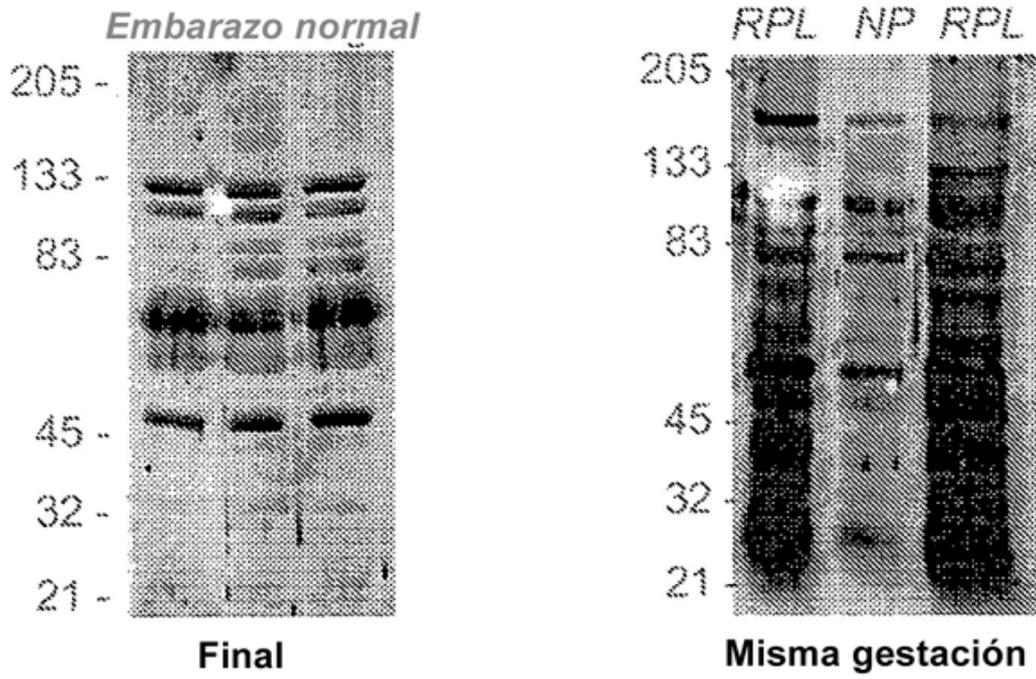


FIGURA 18