



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0821397-6 B1**



**(22) Data do Depósito: 23/12/2008**

**(45) Data de Concessão: 09/10/2018**

**(54) Título: USO DE UM MATERIAL CALIBRADOR, MÉTODO PARA CALIBRAR UM IMUNOENSAIO PARA A DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS, E, KIT DE IMUNOENSAIO**

**(51) Int.Cl.: G01N 33/536; G01N 33/564**

**(30) Prioridade Unionista: 24/12/2007 GB 0725239.8, 26/12/2007 US 61/016,689**

**(73) Titular(es): ONCIMMUNE LIMITED**

**(72) Inventor(es): JOHN FORSYTH RUSSEL ROBERTSON; ANDREA MURRAY; CAROLINE CHAPMAN; ANTHONY BARNES**

**(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/06/2010**

**“USO DE UM MATERIAL CALIBRADOR, MÉTODO PARA CALIBRAR UM IMUNOENSAIO PARA A DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS, E, KIT DE IMUNOENSAIO”**

**Campo da invenção**

5                   A invenção, em geral, diz respeito ao campo de imunoensaios. Em particular, a invenção diz respeito ao uso de um material calibrador para calibrar imunoensaios para auto-anticorpos.

**Fundamentos da invenção**

10                  Dia a dia, a variação é inerente em qualquer imunoensaio. Esta variação pode ocorrer devido a diversos fatores variantes incluindo as condições ambientais, envelhecimento do instrumento de medição ou dos reagentes, mudanças de bateladas em reagentes e variação biológica. Em estudos longitudinais quando se necessita comparar um resultado de teste em um dia com um outro medido em um dia diferente, é necessário ser capaz de 15 se ajustar a esta variação. A calibração do ensaio torna isto possível e também pode alertar o operador quanto a problemas com o rendimento ou desvio diário no instrumento.

20                  Em geral, a calibração de um imunoensaio projetado para medir um antígeno no soro é relativamente direto, visto que as formas recombinantes ou sintéticas do antígeno podem ser frequentemente produzidas e facilmente quantificadas. Em consequência um material calibrador altamente caracterizado e claramente definido pode ser disponibilizado.

25                  Para ensaios projetados para medir o nível de anticorpos humanos em uma amostra de teste de paciente, a identificação de um calibrador de material adequado é obstruída pela especificidade diversa de anticorpos sendo medidos e pela policlonalidade da resposta. Foi investigado

o uso de anticorpos monoclonais de camundongo como calibradores para ensaios de auto-anticorpo. Entretanto, estes requerem um sistema repórter diferente àquele usado para detectar auto-anticorpos humanos de modo que um nunca possa garantir que a variação detectada seja uma representação verdadeira de variação inerente no ensaio de antianticorpo. Além dos anticorpos monoclonais terem especificidade altamente definida e precisarem da promiscuidade demonstrada pelas respostas policlonais humanas. Isto significa que as mudanças sutis na estrutura de antígeno de captura que resultam na variação do ensaio podem permanecer não detectadas. Se um for projetar um anticorpo humanizado para o uso como um material calibrador este deve utilizar o mesmo sistema repórter como o ensaio de auto-anticorpo, mas ainda deve apresentar os mesmos problemas de monoclonalidade como a sua contraparte de murino.

Portanto, tiveram que procurar uma nova fonte de material de calibração que forneceria uma fonte de longo prazo de calibração tanto em termos de ter volume suficiente quanto também a sua capacidade de ser armazenada por períodos prolongados de tempo.

### **Sumário da invenção**

Em um primeiro aspecto a invenção diz respeito ao uso de um material calibrador que compreende fluido corporal de mamífero e, especialmente, humano para calibrar um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos.

Em uma forma de realização o material calibrador compreende fluido corporal humano.

Em uma forma de realização o material calibrador não compreende quaisquer produtos sanguíneos selecionados do grupo que consiste de soro, sangue total e plasma.

Em uma forma de realização o material calibrador compreende um fluido de drenagem, exudato ou transudato. Este material preferivelmente

não contém quaisquer produtos sanguíneos selecionados do grupo que consiste de soro, sangue total e plasma.

Em uma forma de realização o material calibrador compreende fluido corporal coletado de um ou mais pacientes com câncer.

5 Em uma outra forma de realização o material de calibração compreende fluido corporal coletado a partir de uma cavidade ou espaço corporal em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor está ou estava associado.

10 Em uma forma de realização o material calibrador compreende fluido corporal de mamífero e em particular, humano coletado a partir de uma cavidade ou espaço corporal em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor está ou estava associado.

15 Em certas formas de realização não limitantes o material de calibração pode compreende fluido pleural ou fluido de ascite coletado de um ou mais pacientes com câncer.

20 Em uma forma de realização o material de calibração contém auto-anticorpos humanos naturais imunologicamente específicos para uma proteína marcadora de tumor e o imunoensaio a ser calibrado é um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos humanos naturais imunologicamente específicos para uma proteína marcadora de tumor.

Em um segundo aspecto a invenção fornece um método para calibrar um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos que compreende:

25 (a) contactar cada um de uma pluralidade de diluições diferentes de um material de calibração que compreende um fluido corporal de mamífero com um antígeno específico para o auto-anticorpo ser detectado no imunoensaio, em que o dito fluido corporal é conhecido conter auto-anticorpos imunologicamente específicos para o antígeno;

(b) detectar a quantidade de ligação específica entre o dito antígeno e auto-anticorpo presente no material de calibração e

(c) plotagem ou cálculo de uma curva da quantidade da dita ligação específica versus a diluição do material de calibração para cada diluição do material de calibração usado na etapa (a), desse modo calibrando um imunoensaio usando-se o dito antígeno para a detecção do dito auto-anticorpo.

5 Em uma forma de realização o material calibrador compreende fluido corporal humano.

Em uma forma de realização o material calibrador não compreende quaisquer produtos sanguíneos selecionados do grupo que 10 consiste de soro, sangue total e plasma.

Em uma forma de realização o material calibrador compreende um fluido de drenagem, exudato ou transudato. Este material preferivelmente não contém quaisquer produtos sanguíneos selecionados do grupo que consiste de soro, sangue total e plasma.

15 Em uma forma de realização o material calibrador compreende fluido corporal coletado de um ou mais pacientes com câncer.

Em uma outra forma de realização o material de calibração compreende fluido corporal coletado a partir de uma cavidade ou espaço corporal em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor 20 está ou estava associado.

Em uma forma de realização o material calibrador compreende fluido corporal de mamífero e em particular, humano coletado a partir de uma cavidade ou espaço corporal em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor está ou estava associado.

25 Em certas formas de realização não limitantes o material de calibração pode compreender fluido pleural ou fluido de ascite coletado de um ou mais pacientes com câncer humanos.

Em uma forma de realização o material de calibração contém auto-anticorpos humanos naturais imunologicamente específicos para uma

proteína marcadora de tumor e o imunoensaio a ser calibrado é um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos humanos naturais imunologicamente específicos para uma proteína marcadora de tumor.

Portanto, em uma forma de realização não limitante específica, a invenção fornece um método para calibrar um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos marcador anti-tumor que compreende:

(a) contactar cada um de uma pluralidade de diluições diferentes de um material de calibração que compreende fluido pleural ou fluido de ascite isolado de um ou mais pacientes com câncer com um antígeno marcador de tumor específicos para o auto-anticorpo marcador anti-tumor, em que o dito fluido pleural ou fluido de ascite é conhecido conter auto-anticorpos imunologicamente específicos para o dito antígeno;

(b) detectar a quantidade de ligação específica entre o dito antígeno e auto-anticorpo presente no material de calibração e

(c) plotagem ou cálculo de uma curva da quantidade da dita ligação específica versus a diluição do material de calibração para cada diluição do material de calibração usado na etapa (a), desse modo calibrando um imunoensaio usando-se o dito antígeno para a detecção do dito auto-anticorpo.

Em um terceiro aspecto a invenção fornece uma série de padrões de calibração para o uso na calibração de um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos, em que cada padrão de calibração na dita série compreende uma diluição diferente de um fluido corporal de mamífero, o dito fluido corporal de mamífero sendo conhecido conter auto-anticorpos humanos naturais.

Uma série de padrões de calibração de acordo com a reivindicação 22 em que o dito fluido corporal de mamífero é um fluido corporal humano.

Em uma forma de realização, o fluido corporal de mamífero

não compreende quaisquer produtos sanguíneos selecionados do grupo que consiste de soro, sangue total e plasma.

Em uma forma de realização o fluido corporal de mamífero é um fluido de drenagem, exudato ou transudato.

5 Em uma forma de realização o fluido corporal de mamífero é fluido coletado de um ou mais pacientes com câncer.

Em uma forma de realização o fluido corporal de mamífero é fluido corporal coletado a partir de uma cavidade ou espaço corporal em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor está ou estava 10 associado.

Em uma forma de realização o fluido corporal de mamífero compreende fluido pleural coletado de um ou mais pacientes com câncer, tal como pacientes com câncer humanos.

Em uma forma de realização o fluido corporal de mamífero 15 compreende fluido de ascite coletado de um ou mais pacientes com câncer, tais como pacientes com câncer humanos.

A invenção ainda fornece um kit de imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos, o dito kit compreendendo uma série de padrões de calibração de acordo com o terceiro aspecto da invenção e um reagente de 20 imunoensaio que compreende um antígeno imunologicamente específicos para os ditos auto-anticorpos.

#### **Breve descrição dos desenhos**

Figura 1: Inibição específica de antígeno de auto-anticorpos humanos em fluidos pleurais de pacientes com câncer de mama avançado.

25 Figura 2: Especificidade de fluidos pleurais para antígenos associados com câncer recombinantes demonstrados por Western Blotting. (a) fluido B3280 específico para p53, (b) fluido B1564 específico para NY-ESO-1, (c) fluido PL-061 específico para BGU4-5 e Annexin 1, (d) fluido B3084 específico para p53, CAGE e NY-ESO-1. Coluna 1 = marcadores de peso

molecular, coluna 2 = VOL, coluna 3 = p53, coluna 4 = c-myc, coluna 5 = CAGE, coluna 6 = NY-ESO-1, coluna 7 = GBU4-5, coluna 8 = IKBKE, coluna 9 = Annexin 1, coluna 10 = Annexin 2.

Figura 3: Ligação de soro para contaminar as proteínas bacterianas em proteínas recombinantes demonstradas por Western Blotting. (a), (b). Coluna 1 = marcadores de peso molecular, coluna 2 = Annexin XIa, coluna 3 = BRCA2, coluna 4 = c-myc, coluna 5 = ECD6, coluna 6 = IKBKE, coluna 7 = NY-ESO-1, coluna 8 = p53, coluna 9 = PSA, coluna 10 = VOL.

Figura 4: Esta Figura descreve as diluições de fluido de paciente contra a concentração nM tituladora de NYESO revestido na placa.

Figura 5: Reprodutibilidade de curvas de calibração produzidas usando-se os fluidos de drenagem. A curva representa a média de dez séries com variação inter-ensaio representada pelo desvio padrão mostrado como barras de erro. Reatividade a p53 (a), c-myc (b), ECD6 (c), NYESO (d), BRCA2 (e) PSA (f) e Annexin XIa (g) são mostrados.

Figura 6: Reservatório de fluido pleural de paciente C3/C4 (a) e reservatório de fluido pleural de paciente B3255/B3258 (b) reatividade contra 160 nM de NYESO em 5 séries onde a diluição de fluido em log é plotada contra o OD em log. Os dados são corrigidos para ligação não específica pela subtração do sinal obtido a partir da ligação ao antígeno de controle negativo, VOL.

Figura 7: Reservatório de fluido pleural de paciente B3255/B3258 (a) e reservatório de fluido pleural de paciente C3/C4 (b) reatividade contra 160 nM de p53 em 5 séries onde a diluição de fluido em log é plotado contra a densidade óptica em log. Os dados são corrigidos para ligação não específica pela subtração do sinal obtido a partir da ligação ao antígeno de controle negativo, VOL.

Figura 8: Reservatório de fluido pleural de paciente B3255/B3258 (a) e reservatório de fluido pleural de paciente C3/C4 (b)

reatividade contra 160 nM de BRCA2 em 5 séries onde a diluição de fluido em log é plotado contra o OD em log. Os dados são corrigidos para ligação não específica pela subtração do sinal obtido a partir da ligação ao antígeno de controle negativo, VOL.

5 Figura 9: Reservatório de fluido pleural de paciente B3255/B3258 (a) e reservatório de fluido pleural de paciente C3/C4 (b) reatividade contra 160 nM de c-myc em 5 séries onde a diluição de fluido em log é plotado contra o OD em log. Os dados são corrigidos para ligação não 10 específica pela subtração do sinal obtido a partir da ligação ao antígeno de controle negativo, VOL.

15 Figura 10: Reservatório de fluido pleural de paciente B3255/B3258 (a) e reservatório de fluido pleural de paciente C3/C4 (b) reatividade contra 160 nM de PSA em 5 séries onde a diluição de fluido em log é plotado contra o OD em log. Os dados são corrigidos para ligação não 20 específica pela subtração do sinal obtido a partir da ligação ao antígeno de controle negativo, VOL.

Figura 11: Reservatório de fluido pleural de paciente B3258/B3255 (a) e reservatório de fluido pleural de paciente C3/C4 (b) contra 160 nM de ECD6 em 5 séries onde a diluição de fluido em log é plotado 25 contra o OD em log. Os dados são corrigidos para ligação não específica pela subtração do sinal obtido a partir da ligação ao antígeno de controle negativo, VOL.

Figura 12: Reservatório de fluido pleural de paciente B3255/B3258 (a) e reservatório de fluido pleural de paciente C3/C4 (b) reatividade contra 160 nM de Annexin XIa em 5 séries onde a diluição de fluido em log é plotado contra o OD em log. Os dados são corrigidos para 25 ligação não específica pela subtração do sinal obtido a partir da ligação ao antígeno de controle negativo, VOL.

Figura 13: Efeito de calibração na reproduzibilidade de

amostras de controle. Os auto-anticorpos contra p53 foram medidos em 8 soros de controle em 5 ocasiões separadas. Os valores de OD brutos são mostrados em (a). Uma curva de calibrador foi realizada de maneira concorrente e esta foi usada para extrapolar valores para as amostras de controle (b).

Figura 14: Efeito de calibração na reproduzibilidade de amostras de controle. Os auto-anticorpos contra c-myc foram medidos em 8 soros de controle em 5 ocasiões separadas. Os valores de OD brutos são mostrados em (a). Uma curva de calibrador foi realizada de maneira concorrente e esta foi usada para extrapolar valores para as amostras de controle (b).

Figura 15: Efeito de calibração na reproduzibilidade de amostras de controle. Os auto-anticorpos contra ECD6 foram medidos em 8 soros de controle em 5 ocasiões separadas. Os valores de OD brutos são mostrados em (a). Uma curva de calibrador foi realizada de maneira concorrente e esta foi usada para extrapolar valores para as amostras de controle (b).

Figura 16: Efeito de calibração na reproduzibilidade de amostras de controle. Os auto-anticorpos contra NYESO foram medidos em 8 soros de controle em 5 ocasiões separadas. Os valores de OD brutos são mostrados em (a). Uma curva de calibrador foi realizada de maneira concorrente e esta foi usada para extrapolar valores para as amostras de controle (b).

Figura 17: Efeito de calibração na reproduzibilidade de amostras de controle. Os auto-anticorpos contra BRCA2 foram medidos em 8 soros de controle em 5 ocasiões separadas. Os valores de OD brutos são mostrados em (a). Uma curva de calibrador foi realizada de maneira concorrente e esta foi usada para extrapolar valores para as amostras de controle (b).

Figura 18: Efeito de calibração na reprodutibilidade de amostras de controle. Os auto-anticorpos contra PSA foram medidos em 8 soros de controle em 5 ocasiões separadas. Os valores de OD brutos são mostrados em (a). Uma curva de calibrador foi realizada de maneira concorrente e esta foi usada para extrapolar valores para as amostras de controle (b).

Figura 19: Efeito de calibração na reprodutibilidade de amostras de controle. Os auto-anticorpos contra Annexin XIa foram medidos em 8 soros de controle em 5 ocasiões separadas. Os valores de OD brutos são mostrados em (a). Uma curva de calibrador foi realizada de maneira concorrente e esta foi usada para extrapolar valores para as amostras de controle (b).

Figura 20: Comparaçao de soro e fluidos de drenagem como calibradores de material potencial para ensaios de auto-anticorpo. O fluido pleural C3 (a) é comparado com a amostra de soro 18176 (b) do mesmo paciente.

Figura 21: Comparaçao de soro e fluidos de drenagem como calibradores de material potencial para ensaios de auto-anticorpo. O fluido pleural C7 (a) é comparado com a amostra de soro 11828 (b) do mesmo paciente.

Figura 22: Curvas de calibrador logístico de quatro parâmetros com a soma minimizada de resíduos quadrados. A plotagem 4pl é construída a partir da densidade óptica versus diluição de calibrador em log. Média para as séries 1 a 12 são mostradas como linhas cinzas sólidas e as média para as séries 13 e 14 são mostradas como linhas negras pontilhadas. As barras de erro representam os desvios padrão das médias. Os ensaios de auto-anticorpos específicos de antígeno para p53 (a), c-myc (b), CAGE (c), NY-ESO-1 (d), GBU4-5 (e), Annexin 1 (f) e Annexin 2 (g).

Figura 23: O efeito da calibração na variabilidade de medições

de auto-anticorpo feito em séries de ensaio diferente. Os resultados para as amostras de soro foram corrigidos usando-se a curva de calibrador específica de antígeno para aquela série. Triângulos abertos = medições não calibradas, pontos sólidos = medições ajustadas por calibração, linhas pontilhadas = média dos valores calibrados mais ou menos 3 desvios padrões.

5 média dos valores calibrados mais ou menos 3 desvios padrões 3.

Figura 24: Comparação de alíquotas congeladas de séries de calibrador com séries de calibrador recentemente diluídas. O fluido pleural calibrador C3 foi deixado reagir com o antígeno NYESO. Cada par de série fresca e congelada foi realizada 10 vezes (a). A plotagem log/log média é 10 dada em (b) com barras de erro que representam os desvios padrão.

Figura 25: Comparação de alíquotas congeladas de séries de calibrador com séries de calibrador recentemente diluídas. O fluido pleural calibrador C7 foi deixado reagir com o antígeno c-myc. Cada par de série fresca e congelada foi realizada 10 vezes (a). A plotagem log/log média é 15 dada em (b) com barras de erro que representam os desvios padrão.

Figura 26: Comparação de alíquotas congeladas de séries de calibrador com séries de calibrador recentemente diluídas. O fluido pleural calibrador B3258 foi deixado reagir com antígeno p53. Cada par de série fresca e congelada foi realizada 10 vezes (a). A plotagem log/log média é 20 dada em (b) com barras de erro que representam os desvios padrão.

Figura 27: Comparação de alíquotas congeladas de séries de calibrador com séries de calibrador recentemente diluídas. O fluido pleural calibrador B3258 foi deixado reagir com antígeno PSA. Cada par de série fresca e congelada foi realizada 10 vezes (a). A plotagem log/log média é 25 dada em (b) com barras de erro que representam os desvios padrão.

Figura 28: Comparação de alíquotas congeladas de séries de calibrador com séries de calibrador recentemente diluídas. O fluido pleural calibrador B3258 foi deixado reagir com antígeno Annexin. Cada par de série fresca e congelada foi realizada 10 vezes (a). A plotagem log/log média é

dada em (b) com barras de erro que representam os desvios padrão.

Figura 29: Comparação de alíquotas congeladas de séries de calibrador com séries de calibrador recentemente diluídas. O fluido pleural calibrador B3255 foi deixado reagir com antígeno BRCA2. Cada par de série fresca e congelada foi realizada 10 vezes (a). A plotagem log/log média é dada em (b) com barras de erro que representam os desvios padrão.

Figura 30: Comparação de alíquotas congeladas de séries de calibrador com séries de calibrador recentemente diluídas. O fluido pleural calibrador C3 foi deixado reagir com antígeno ECD6. Cada par de série fresca e congelada foi realizada 10 vezes (a). A plotagem log/log média é dada em (b) com barras de erro que representam os desvios padrão.

Figura 31: Reatividade de auto-anticorpos em fluidos de pacientes com tipos diferentes de câncer com antígenos associados com tumor.

Figura 32: Reação de uma série de diluições de um fluido pleural de um paciente com câncer pancreático com a proteína de controle negativo, VOL em 160 nM (a) e 50 nM (b). O experimento foi repetido 5 vezes em 5 dias separados.

Figura 33: Os resultados de 4 séries de fluido de ascite B2993 contra 160 nM de C-myc com barras de erro de desvio padrão tanto na Figura a quanto b (a Figura a descreve o valor OD do soro de controle usado em seu experimento).

Figura 34: Os resultados de 4 séries de fluido de ascite B3259 contra 160 nM de ECD6 com barras de erro de desvio padrão tanto na figura a quanto b (a Figura a descreve o valor OD do soro de controle usado em seu experimento).

Figura 35: Os resultados de 4 séries de fluido de ascite B2993 contra 160 nM de ECD6 com barras de erro de desvio padrão tanto na figura a quanto b (a Figura a descreve o valor OD do soro de controle usado em seu

experimento).

#### Descrição detalhada da invenção

A presente invenção diz respeito ao uso de um material de calibração que compreende um fluido corporal de mamífero, em particular humano, para calibrar um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos e, em particular, auto-anticorpos humanos.

Em uma forma de realização, o material de calibração usado neste pode compreender o fluido corporal humano como uma fonte de "auto-anticorpos humanos naturais", significando que os auto-anticorpos que foram produzidos em um hospedeiro humano como um resultado dos processos imunológicos naturais. Para evitar dúvidas, este material de calibração não compreende anticorpo não humanos ou quaisquer anticorpos humanos ou humanizados produzidos de maneira exógena pelas técnicas de laboratório, por exemplo, anticorpos monoclonais derivados de células imunes cultivadas.

O material de calibração pode compreender qualquer fluido corporal humano ou de outro mamífero que é conhecido conter auto-anticorpos da especificidade imunológica apropriada, isto é, o calibrador deve compreender um fluido corporal de mamífero (por exemplo, um humano) que é conhecido positivo para o auto-anticorpo ser detectado no imunoensaio. Sob este aspecto, deve ser conhecido em avanço que o fluido calibrador contém os auto-anticorpos que apresentam especificidade imunológica comparável aos auto-anticorpos que é desejado detectar usando-se o imunoensaio. Uma vantagem do material de calibração da invenção é que este contém auto-anticorpos humanos naturais de especificidade imunológica substancialmente equivalente aos anticorpos naturais encontrados no soro humano, em termos de ligação ao antígeno usado como um reagente no imunoensaio é pretendido calibrar.

Como ilustrado nos exemplos anexos, pode-se determinar em avanço se uma dada amostra de fluidos corporais humanos contêm auto-

anticorpos da especificidade imunológica apropriada pela realização de um antígeno de teste. Em uma forma de realização, este ensaio de teste pode usar o mesmo antígeno e a metodologia de detecção como é pretendido usar no imunoensaio apropriado. Os fluidos corporais que são mostrados conter auto-anticorpos imunologicamente específicos para o antígeno de teste em um tal ensaio de teste são adequados para o uso como calibradores de material em imunoensaios subsequentes usando-se o mesmo antígeno de teste para detectar os auto-anticorpos correspondentes em amostras de teste de paciente de estado de auto-anticorpo desconhecido. Neste contexto, as "amostras de teste" podem ser definidas como amostras removidas de pacientes a serem testados quanto à presença de auto-anticorpos, em que o estado de auto-anticorpo do paciente é desconhecido antes do teste da amostra.

Em geral, não é necessário determinar um titulador preciso da quantidade de auto-anticorpo presente no material de calibração antes do uso, particularmente quando se usa o método de calibração da invenção, que utiliza diluições múltiplas do material de calibração para fornecer uma série de padrões de calibração. A quantidade absoluta de auto-anticorpo presente na série de padrões de calibração não necessitam ser precisamente calibrados, contanto que o ajuste de padrões de calibração cubra a faixa normal de tituladores de auto-anticorpo que deveria ser esperado encontrar quando o paciente de teste testa as amostras de estado de anticorpo desconhecido no imunoensaio apropriado. Isto pode ser determinado empiricamente pelo teste de uma faixa de amostras de calibração diluídas em paralelo em comparação com as amostras de teste de paciente típico.

O material de calibração pode consistir simplesmente do fluido corporal humano na forma em que este é isolado do corpo humano (por exemplo, fluido pleural ou de ascite "puro") ou o fluido corporal pode ser misturado ou diluído com outros componentes para formar um material de calibração antes do uso. Tipicamente, uma série de diluição do fluido em um

tampão adequado é preparado para fornecer uma série de padrões de calibração. Os tampões de diluição adequados para a preparação dos padrões de calibração incluem, por exemplo, um tampão com alto teor de sal de PBS + 0,5M de NaCl + 0,1 % de caseína + 0,1 % de Tween 20 (referido nos exemplos como HSBT) ou PBS contendo 1 % de BSA. A invenção, portanto, considera o uso de calibradores de material que consistem de um fluido corporal de mamífero (por exemplo, humano) de um tipo descrito neste misturado com um destes tampões de diluição. Os calibradores particularmente úteis consistem de fluido pleural humano ou fluido de ascite humano, que pode ser obtido de um ou mais pacientes com câncer humanos, misturado com HSBT. Alternativamente, o soro normal pode ser usado como um diluente de calibrador. Também é considerado concentrar o fluido corporal ou (semi) purificar os anticorpos e então diluir este material para fornecer os padrões de calibração. Os componentes adicionais podem ser adicionados ao material de calibração, por exemplo, para melhorar a estabilidade durante a armazenagem a longo prazo.

As amostras de material de calibração diluídos em tampão de diluição apropriado podem ser dispensadas em alíquotas e armazenadas antes do uso. Convenientemente, as alíquotas já diluídas de material de calibração podem ser armazenadas congeladas a -20° C ou -80° C e descongeladas antes do uso. Mostraram que o fluido pleural e de ascite são estáveis na armazenagem a -20° C e podem ser armazenados congelados por períodos estendidos sem perda de reatividade de auto-anticorpo. A pré-diluição e a formação de alíquotas de padrões de calibração antes da armazenagem congelada de longo período é conveniente e evita erros de reproduzibilidade e ciclo de congelamento-descongelamento numerosos.

O uso de amostras positivas como calibradores para imunoensaios é prática quase rotineira no campo dos imunoensaios para a detecção de antígeno. Entretanto, é difícil fornecer materiais de calibração

adequados que são amostras positivas conhecidas contendo anticorpos de especificidade apropriada quando o alvo do ensaio é um anticorpo, em vez de um antígeno. A invenção trata este problema pelo uso de material de calibração que compreende fluido corporal que é conhecido em avanço para 5 conter anticorpos da especificidade apropriada.

Em geral é preferido não usar fluidos corporais que são ou 10 compreendem "produtos sanguíneos", tais como sangue total, plasma ou soro, como a base do material calibrador. Em vez disso, o material calibrador pode compreender fluidos corporais que são fluidos de drenagem, exudatos ou 15 transudatos e inclui tais materiais produzidos durante ou como um resultado de doença. Nas formas de realização não limitantes, o fluido corporal pode ser selecionado de: efusão pleural, ascite, hidrocele, fluido de drenagem de ferimento, fluido sinovial inflamatório ou não inflamatório, seroma, fluido aspirado do mamilo, efusão pericardial, bile, secreções pancreáticas, etc. o 20 fluido pode ser obtido de um paciente humano ou de um paciente mamífero não humano, incluindo, por exemplo, cães e primatas não humanos.

Em certas formas de realização, o material de calibração pode 25 compreender fluido corporal isolado de uma cavidade ou espaço corporal em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor está ou estava associado. Sob este aspecto, o termo "cavidade ou espaço corporal" inclui qualquer cavidade ou espaço corporal, onde houver uma cavidade natural ou espaço ou cavidade que se surgem como um resultado de doenças ou intervenção medida incluindo cavidades em colapso ou precedentes. O fluido é derivado de uma tal cavidade ou espaço em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor está ou estava associado. Preferivelmente o "fluido corporal derivado de uma cavidade corporal" será um fluido corporal induzido por tumor, significando um fluido corporal que é produzido durante o processo da doença, por exemplo, em resposta a ou como uma consequência da presença de células tumorais. Em relação a isto, os fluidos de "cavidade

corporal" exemplares são ascite, efusão pleural, seroma, hidrocele e fluido de drenagem de ferimento.

Para evitar dúvida os "fluidos corporais derivados de uma cavidade ou espaço corporal" não incluem produtos sanguíneos derivados da circulação sistêmica, tal como sangue, soro ou plasma.

O fluido pleural e fluido de ascite são particularmente úteis nas fontes do material de calibração para o uso de acordo com a invenção visto que estes são tipicamente obtidos em um amplo volume e removido a partir dos pacientes como parte da estratégia terapêutica. Este fluido, que de outra maneira seria descartado, é uma fonte valiosa do material de calibração.

Como resumido acima, tem demonstrado que os fluidos "cavidade corporal" humano tal como o fluido pleural e ascite são materiais de calibração adequados para os imunoensaios para a detecção de auto-anticorpos no soro humano, visto que estes fluidos contém os auto-anticorpos que são comparáveis aqueles presentes no soro humano, ambos em termos da especificidade imunológica de ligação ao antígeno e também o isotipo de anticorpo. O último é importante visto que este capacita o mesmo sistema de detecção a ser usado para os auto-anticorpos no material de calibração e auto-anticorpos da especificidade de ligação de antígeno equivalente presente nas amostras testadas do soro do paciente.

O material de calibração pode compreender o fluido corporal, e mais especificamente fluido de "cavidade corporal" como fluido pleural ou fluido de ascite, coletado de um ou mais pacientes com câncer. Neste contexto o termo "paciente com câncer" inclui um indivíduo previamente diagnosticado como tendo câncer, incluindo, mas não limitado a câncer de cólon, câncer ovariano, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer esofágico, câncer gástrico, câncer renal, câncer de bexiga, câncer endometrial, linfoma e leucemia ou câncer de mama. O fluido pode ser retirado de um paciente simples ou os fluidos obtidos a partir de dois ou mais

pacientes podem ser reunidos. As amostras de fluido podem ser unidas a partir de dois ou mais pacientes tendo o mesmo ou estágios diferentes do mesmo ou diferentes tipos de câncer. É também considerado unir os tipos diferentes de fluidos corporais a partir de um simples ou múltiplos pacientes

5 com câncer.

O material de calibração preparado a partir do fluido corporal retirado dos pacientes com câncer com um tipo particular de câncer podem ser usados para auxiliar o diagnóstico dos mesmos tipos de cânceres ou tipos diferentes de cânceres em outros indivíduos. Como ilustrado nos exemplos

10 anexos, os auto-anticorpos humanos naturais específicos para a proteínas

marcadoras de tumor estão presentes em fluidos pleurais retirados de paciente com câncer de cólon, câncer ovariano, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer pancreático e câncer de mama. Uma vez, a presença de auto-anticorpos

da especificidade imunológica requerida foi estabelecida para testar o ensaio,

15 tais fluidos podem ser usados para calibrar os imunoensaios para testar os

auto-anticorpos da especificidade imunológica equivalente nas amostras

testadas dos pacientes com outros tipos de câncer, por exemplo, imunoensaios

para os auto-anticorpos no soro de câncer de mama pode ser calibrado usando

o material de calibração que compreende o fluido pleural (e outros fluidos de

20 cavidade corporal) a partir de pacientes com câncer de cólon, câncer ovariano,

câncer de pulmão, câncer de fígado, ou câncer pancreático.

Em uma forma de realização um estoque do material de calibração preparado a partir de um paciente diagnosticado com câncer pode ser usado para calibrar um imunoensaio realizado no último dado para avaliar

25 o estado imune do mesmo paciente ou um paciente diferente, por exemplo,

para monitorar a progressão da doença e/ou para avaliar a efetividade de um

curso de tratamento anti-câncer naquele paciente.

No uso, o material de calibração da invenção pode ser usado para calibrar os imunoensaios para a detecção de auto-anticorpos realizado de

acordo com os métodos conhecidos. Tipicamente, o imunoensaio pode levar a forma de uma ELISA direta, sanduíche ou competitiva, mas outras metodologias de ensaio também são o escopo da invenção. As características gerais dos imunoensaios para a detecção de auto-anticorpos marcadores anti-tumores humanos são descritos em WO 99/58978 e WO 2006/126008, os conteúdos de que são incorporados neste em sua totalidade por referência. O material calibrador fornecido por esta invenção pode ser usado para calibrar os ensaios descritos em WO 99/58978 e WO 2006/126008.

O material de calibração descrito neste e as séries da calibração padrão que compreende este material de calibração, pode ser usado para calibrar um imunoensaio para qualquer tipo de auto-anticorpo que serve como um marcador do estado da doença ou susceptibilidade da doença, em que a doença em questão tem o potencial para produzir /induzir a formação de um fluido corporal do tipo descrito neste, que compreende os auto-anticorpos da especificidade imunológica comparável aos auto-anticorpos que servem como o marcador de doença.

Exemplos de doenças que são tipicamente associados com a produção de fluidos corporais contendo os auto-anticorpos inclui os cânceres dos tipos listados neste. Como explicado acima, os fluidos corporais obtidos a partir de pacientes com câncer, e um "fluido de cavidade corporal" particular tal como fluido pleural, fluido de ascite, hidrocele, seroma, drenagem de fluido de ferimento etc., fornece uma fonte útil do material de calibração positivo contendo os auto-anticorpos específico para marcadores de tumor. Este material de calibração pode ser, portanto, usado para calibrar os imunoensaios para a detecção de câncer ou doença neoplástica precoce as amostras de teste do paciente (por exemplo, amostras de soro do paciente de estado de auto-anticorpo conhecido). Tais ensaios (para a detecção de auto-anticorpos marcadores anti-tumor nas amostras testadas dos pacientes) podem ser realizados usando os métodos descritos em WO 99/58978 e WO

2006/126008, ou modificações destes.

Será entendido, entretanto, que a invenção não é limitada ao uso dos fluídos derivados de câncer, ou de fato a detecção dos marcadores de tumor, embora esta seja uma forma de realização importante. Um outro grupo 5 de doenças associados com a produção de fluidos corporais (outros do que o soro, sangue total ou plasma) contendo os auto-anticorpos característicos da doença são as doenças autoimunes benignas. A invenção, portanto, considera o uso de fluidos corporais obtidos de pacientes mamíferos (por exemplo, humanos) com doença autoimune benigna como os materiais de calibração 10 para os imunoensaios para a detecção de auto-anticorpos que são marcadores da doença autoimune. Os exemplos de tais doenças autoimunes incluem artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), cirrose biliar primária (PBC), tireóide autoimune (por exemplo, tireóide de Hashimoto), gastrite 15 autoimune (por exemplo, anemia nociva), adrenalite autoimune (por exemplo, doença de Addison), hipoparatiroidismo autoimune, diabete autoimune (por exemplo, diabete tipo 1) ou miastenia grave.

No caso de artrite reumatóide, o material calibrador pode compreender ou consistir de um exudato associado com o processo da doença, tipicamente um fluido que acumula em uma junta, tal como fluido sinovial 20 inflamatório isolado a partir do joelho de um paciente com RA.

No caso de lúpus eritomatoso sistêmico (SLE), o material calibrador pode compreender ou consistir de fluido de ascite obtido a partir dos pacientes com SLE (ver Lacconi *et al.* Internet Journal of Radiology, 25 ISSN: 1528-8404). Em consideração, deve ser notado que nem todos os fluidos de ascites (ou de fato outros fluidos de cavidade corporais tal como efusões pleurais) são associados com a presença de um tumor.

No caso de cirrose ciliar, o material calibrador pode compreender ou consistir de fluido de ascite obtido dos pacientes de cirrose biliar.

As características gerais dos imunoensaios, por exemplo, ELISA, radioimunoensaios e outros, são bem conhecidos aqueles habilitados na técnica (ver Imunoensaio, E. Diamandis and T. Christopoulus, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996, cujos conteúdos são incorporados neste por referência). Os imunoensaios para a detecção dos anticorpos tendo uma especificidade imunológica particular (por exemplo, auto-anticorpos tendo a reatividade imunológica com um antígeno dado, tal como uma proteína marcadora de tumor) em geral requer o uso de um reagente que compreende um antígeno que exibe a reatividade imunológica específica com o anticorpo sob o teste. Dependendo do formato do ensaio, estes reagente pode ser imobilizado em um suporte sólido. Uma amostra testada será testada para a presença do anticorpo é levado em contato com o reagente e se anticorpos da reatividade imunológica requerida estão presentes na amostra testada reagirá imunologicamente com o reagente para formar os complexos reagente de auto-anticorpo que podem então ser detectados ou quantitativamente medidos. Tais imunoensaios são tipicamente calibrados pela realização dos ensaios paralelos usando os mesmos reagentes para detectar os (auto)anticorpos na amostra de teste, mas substituindo a amostra testada com uma ou mais calibração padrão, que são as amostras do material de calibração conhecidos por conter os (auto)anticorpos da especificidade imunológica apropriada.

O método de calibração preferida usando o material de calibração da invenção utiliza uma série de padrões de calibração, tipicamente diluições em séries do material de calibração da invenção, que são testados contra um ou mais concentrações conhecidas de antígeno. Em um típico "sanduíche" de ELISA, o antígeno tendo a especificidade para os auto-anticorpos sob o teste é imobilizado em uma superfície sólida (por exemplo, os reservatórios de uma placa de ensaio microtituladora padrão, ou a superfície de uma micropérola) em uma amostra do calibrador (ou amostra testada a ser testada para a presença dos auto-anticorpos) é levado em contato

com o antígeno imobilizado. Os auto-anticorpos da especificidade desejada presentes no material calibrador ligarão o antígeno imobilizado. Os complexos de antígeno/auto-anticorpo podem ser então detectados usando qualquer método adequado.

5 A invenção, portanto, fornece um método para calibrar um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos que compreende:

(a) contactar cada um de uma pluralidade de diluições diferentes de um material de calibração que compreende um fluido corporal de mamífero ou outro humano com um antígeno específico 10 (imunologicamente) para um auto-anticorpo, em que o dito fluido corporal humano é conhecido por conter os auto-anticorpos imunologicamente específicos para o antígeno;

(b) detectar a quantidade da ligação específica (imunologicamente) entre o dito antígeno e auto-anticorpo presente no 15 material de calibração; e

(c) plotagem ou cálculo de uma curva da quantidade da dita ligação específica versus a diluição do material de calibração para cada diluição do material de calibração usado na etapa (a), desse modo calibrando um imunoensaio usando-se o dito antígeno para a detecção do dito auto- 20 anticorpo.

A metodologia precisa usada para detectar a ligação específica na etapa (b) não é limitante a invenção. Em uma forma de realização um anticorpo de imunoglobulina anti-humano secundário rotulado, que especificamente reconhece um epítopo comum a uma ou mais classes de 25 imunoglobulinas humanas, é usada para detectar os complexos de antígeno/auto-anticorpo. Tipicamente o anticorpo secundário será anti-IgG ou anti-IgM. O anticorpo secundário é usualmente rotulado com um marcador detectável, tipicamente um marcador de enzima tal como, por exemplo, peroxidase ou fosfatase alcalina, permitindo a detecção quantitativa pela

adição de um substrato para a enzima que gera um produto detectável por exemplo, um produto fluorescente, quimioluminescente ou colorido. Outros tipos de rótulos detectáveis conhecidos na técnica pode ser usado com o efeito equivalente.

5                   A concentração de antígeno usado na etapa (a) é selecionado para dar uma ampla faixa dinâmica em termos da medição de ligação obtida na etapa (b), a fim de fornecer a calibração de uma ampla faixa de medições de auto-anticorpo. Este é uma consideração importante em relação à detecção de auto-anticorpos marcadores de anti-tumores, que pela definição são 10 policlonais e exibem a variação paciente a paciente em termos da força da ligação de antígeno/auto-anticorpo bem como a quantidade absoluta de auto-anticorpo presente. A concentração de antígeno usado será tipicamente maior do que 20 nM, e mais particularmente na faixa de 20 nM a 180 nM, ou na faixa de 50 nM a 160 nM.

15                  Como muitas diluições do material de calibração pode ser testados como são necessários para construir uma ampla curva de calibração na parte (c). Tipicamente pelo menos 6 diluições separadas do material de calibração serão testadas em cada concentração de antígeno usado, mas este número não é pretendido a ser limitante.

20                  Um uso preferido do material de calibração descrito neste é um calibrador para os imunoensaios para a detecção de auto-anticorpos humanos naturais imunologicamente específico para os marcadores de tumores humanos, estes auto-anticorpos tipicamente sendo associados ao câncer.

25                  O desenvolvimento e progressão do câncer em um paciente é geralmente observado ser associado com a presença de marcadores no fluido corporal do paciente, estes "marcadores de tumor" que reflete os aspectos diferentes da biologia do câncer (ver Fateh-Maghdam, A. & Steilber, P. (1993) Uso sensível dos marcadores de tumor. Publicado por Verlag GMBH,

ISBN 3-926725-07-9; Harris *et al.*, J Clin Oncol., 25: 5287-5312, 2007; Voorzanger-Rousselot and Garnero, Cancer Treatment Reviews, 31: 230-283, 2007). Os marcadores de tumor são frequentemente observados serem formas alteradas de proteínas de tipo selvagem expressadas pelas células "normais", 5 em que o caso da alteração pode ser uma mudança na sequência de aminoácido primário, uma mudança na estrutura secundária, terciária ou quaternária ou uma mudança na modificação pós-tradução, por exemplo, glicosilação anormal. Além disso, as proteínas de tipo selvagem que são super regulada ou super expressada nas células tumorais, possivelmente como um 10 resultado da amplificação do gene ou regulação transcripcional anormal, também pode ser os marcadores de tumor.

As diferenças entre uma proteína de tipo selvagem expressada pelas células "normais" e uma proteína marcadora tumoral correspondente pode, em alguns exemplos, levar a proteína marcadora de tumor sendo 15 reconhecido por um sistema imune individual como "não próprio" e deste modo evocando uma resposta imune naquele indivíduo. Este pode ser um resposta imune humoral (isto é Célula B mediada) levando a produção de auto-anticorpos imunologicamente específicos para a proteína marcadora de tumor. Os auto-anticorpos são naturalmente os anticorpos de ocorrência 20 natural direcionado ao antígeno que um sistema imune individual reconhece como estranho ainda que o antígeno atualmente originado no indivíduo. Este pode estar presente na circulação como circulação dos auto-anticorpos livres ou na forma de complexos imunes de circulação que consiste da ligação de auto-anticorpos a sua proteína marcadora de tumor alvo.

25 O termo auto-anticorpos marcadores anti-tumor "associado ao câncer" refere-se aos auto-anticorpos que são característicos do estado de doença de câncer e que são direcionados contra os epítopos presentes nas formas de proteínas marcadoras de tumor que são preferivelmente expressado no estado da doença de câncer.

Tipicamente, os抗ígenos marcadores de tumor usados para detectar os auto-anticorpos marcadores anti-tumor que compreende as proteínas marcadoras de tumor recombinantes (expressado em células de mamíferos, de levedura, de inseto ou bacterianas) ou抗ígenos marcadores de tumor quimicamente sintetizados, que podem compreender substancialmente as proteínas marcadoras de tumor totais, ou fragmentos destes, tal como抗ígenos de peptídeos curtos. Outras fontes potenciais de proteínas associadas ao tumor para uso como a base de reagentes de imunoensaios para a detecção de auto-anticorpos anti-tumor inclui as células de tumor cultivados (e o meio gasto usado por seu desenvolvimento), tecido tumoral e soro a partir dos indivíduos com neoplasia, ou outros fluidos corporais a partir de um ou mais pacientes com câncer (como descrito em WO 2004/044590).

O material de calibração descrito neste pode ser usado para calibrar os imunoensaios para a detecção de uma ampla faixa de auto-anticorpos marcadores anti-tumor contra marcadores de tumor diferentes, não respetivo da natureza do抗ígeno usado em tal ensaio. Uma característica chave do material de calibração usado nesta invenção (e especialmente o material de calibração que compreende o fluido pleural ou fluidos de ascite a partir de um ou mais pacientes com câncer) é que contém auto-anticorpos que junto assemelha-se aquele presente nas amostras testadas do paciente com câncer (por exemplo, soro de paciente com câncer) em termos da especificidade de ligação de抗ígeno. Este material de calibração pode ser usado com抗ígenos marcadores de tumor recombinante,抗ígenos marcadores de tumor de peptídeo sintético ou抗ígenos naturais marcadores de tumor purificados.

A invenção não é pretendida ser limitada com relação ao alvo do imunoensaio, isto é a especificidade do auto-anticorpo alvo que é pretendido detectar. O material de calibração descrito neste pode ser usado para calibrar um imunoensaio para qualquer auto-anticorpo presente no

material de calibração por si só. Um material de calibração simples pode conter diversos auto-anticorpos diferentes da especificidade imunológica diferente e deste modo o mesmo material pode ser usado para calibrar diversos ensaios diferentes. Por meio do exemplo, as amostras da efusão pleural humana foi mostrado nos exemplos correntes para conter os auto-anticorpos a uma faixa de marcadores de tumor, incluindo p53, c-myc, ECD-6 (HER2/fragmento extracelular neu), NY-ESO1, BRCA2, PSA e Anexina X1-A.

Em um aspecto final, a invenção fornece um material de calibração que pode ser usado a fim de quantificar a quantidade da proteína rotulada ligada a uma superfície sólida, tal como os reservatórios de uma placa microtituladora, devido a presença no material de calibração de auto-anticorpos imunologicamente naturais específicos a um componente de rótulo de peptídeo da proteína "rotulada", tal como por exemplo um rótulo de histidina ou rótulo de biotina. Foram observados que certas amostras do fluido pleural isolado de pacientes com câncer contém anticorpos imunologicamente específico por histidina e/ou rótulos de biotina ligado aos抗ígenos marcadores de tumor recombinante. Estes fluidos pleurais podem ser, portanto, usados para fornecer um ELISA quantitativo genérico para as proteínas recombinantes que transporte a histidina e/ou rótulos de biotina que utiliza um anticorpo humano natural específico para o rótulo, em combinação com um anticorpo secundário anti-humano rotulado. Este método fornece certas vantagens no uso de anticorpos monoclonais de murino ao抗ígeno rotulado quantitativo liga-se a um suporte sólido no contexto total dos imunoensaios para os auto-anticorpos marcadores anti-tumor, visto que o uso do mesmo sistema repórter como aquele usado para medir os auto-anticorpos humanos naturais específicos pelo抗ígeno marcador de tumor por si só. Deste modo, dentro de uma placa de ensaio simples um pode realizar um ensaio para quantificar a quantidade do抗ígeno marcador de tumor

recombinante rotulado ligado a placa usando o material de calibração contendo os auto-anticorpos naturais à porção de histidina ou rótulo de biotina do antígeno e em paralelo apresente uma série de calibração padrão para a ligação do mesmo antígeno recombinante rotulado aos auto-anticorpos naturais marcadores anti-tumor e uso do mesmo sistema repórter para ambos

5 ensaios.

Portanto, em um aspecto adicional a invenção fornece um método de quantificação da quantidade da proteína ligada a uma superfície sólida, em que a dita proteína que compreende um rótulo, o método que

10 compreende:

contactar a superfície sólida a ser testada pela presença da dita proteína com um material reagente que compreende um fluido corporal humano, em que o dito fluido corporal é conhecido por conter um anticorpo humano natural imunologicamente específico para o rótulo e medir a

15 quantidade da ligação específica entre o anticorpo humano natural e o rótulo, por meio da quantificação da quantidade da dita proteína presente na superfície.

Neste contexto, o termo "rótulo" refere-se a metade química ligada as proteínas que não está presente em qualquer forma naturalmente expressada da proteína. O rótulo pode ser um polipeptídeo, em que no caso o rótulo consiste de uma sequência de aminoácidos que não é contínuo com a sequência de aminoácido de qualquer forma naturalmente expressada da proteína.

A proteína a ser quantificada na superfície sólida é tipicamente uma proteína recombinantemente expressada. Exemplos dos rótulos comumente ligados as proteínas recombinantemente expressadas incluem os rótulos de biotina e rótulos de histidina. Como ilustrado nos exemplos anexos, cerca de 10 % da população humana contém anticorpos humanos naturais que são imunologicamente específicos por biotina. Os indivíduos humanos com

anticorpos naturais específico por rótulos de histidina também podem ser identificados dentro da população humana normal.

Será entendido que análise estatística e matemática dos dados de curva de calibração obtido de acordo com a presente invenção pode incluir, 5 mas não é necessário limitar a, plotagem logística de quatro parâmetros.

A invenção ainda será entendida com referência aos seguintes exemplos experimentais.

Todas as Publicações científicas e de Patente especificamente a referência neste são incorporados em sua totalidade por referência.

10 **Materiais e métodos**

**Preparação de material de calibração**

Os fluidos de ascite e pleurais foram coletados a partir de pacientes com câncer sob o consentimento informado usando os protocolos padrão. Tipicamente os fluidos foram coletados pela inserção de um dreno na 15 cavidade torácica ou cavidade peritoneal sob anestésico local. O dreno deve ser inserido com ou sem controle guiado por imagem (por exemplo, Ultrasom) dependendo dos protocolos locais e a prática do tratamento clínico.

(i) efusão pleural deve ser coletada em um recipiente de dreno torácico estéril na maneira padrão para a drenagem de uma efusão pleural.

20 (ii) ascite coletado em um saco de drenagem estéreo por intermédio de um dreno peritoneal na maneira padrão para a drenagem de ascite

Nenhuma química necessária será adicionada ao saco/recipiente enquanto o fluido é drenado neste.

25 O saco/recipiente deve ser coletado quando cheio ou em uma base diária, o que ocorrer mais cedo.

Na classe II Hood, 1 Litro de fluido foi transferido em 20 x 50 ml dos tubos estéreis usando 25 ml de pipetas estéreis e centrifugados a 400 g por 5 minutos.

Os sobrenadantes foram vertidos em 2 frascos de cultura de tecido estéril de 500 ml e azida de sódio adicionado a 0,01 % (1  $\mu$ l de 10 % de estoque a 1ml de sobrenadante). Aprotinina (inibidor de protease) foi adicionado a 1  $\mu$ g/ml (1  $\mu$ l de 10 mg/ml do estoque de Aprotinina em PBS a 5 10 ml do sobrenadante). Os sobrenadantes foram então vertidos em tubos 50 ml não estéreis e armazenados a -20° C

## Lista de reagentes:

Estoque de azida sódica armazenada @ RT,

Aprotinin = Calbiochem 616370

10 estoque de Aprotinina armazenada em alíquotas de 50 µl @ -  
20° C

PBS = solução salina tamponada por fosfato

## Imunoensaio padrão para os auto-anticorpos

A metodologia do imunoensaio geral é exemplificado neste  
15 usando antígenos marcadores de tumor recombinante mas será apreciado que  
o mesmo protocolo de ensaio pode ser adaptado para o uso com outros  
(auto)antígenos.

As amostras de antígenos marcadores de tumor foram preparados pela expressão recombinante, seguindo os métodos análogos aqueles descritos em WO 99/58978.

Brevemente, os cDNA que codifica os抗ígenos marcadores de interesse foram克隆ados no vetor pET21 (Invitrogen) que foi modificado para codificar um rótulo de biotina e um rótulo de 6xhistidina para ajudar na purificação da proteína expressada. Os clones resultantes foram desenvolvidos em uma célula hospedeira bacteriana adequada (nos corpos de inclusão), a bactéria lisada e desnaturada e os抗ígenos expressados recuperados por intermédio das colunas por afinidade quelato de níquel (Hi-trap, comercialmente disponível de Amersham, seguindo os protocolos do fabricante). Os抗ígenos expressados foram renaturados pela diálise no

tampão apropriado e o rendimento da proteína expressada avaliada por SDS-PAGE, western blot e ELISA e quantificado antes da armazenagem.

O controle negativo VOL é vetor vazio (isto é nenhum cDNA clonado) que ainda inclui as sequências de His e rótulo de biotina.

5 Número de acesso GenBank para os diversos marcadores cDNAs são como seguem:

P53: B003596

c-myc: V00568

domínio extracelular ECD6 (HER2): M11730

10 NY-ESO: NM 001327 BRCA2: U43746

BRCA1 delta 9-10: NM 007302

Anexina X1-A: NM 145868 PSA: NM 001648

CAGE: NM 182699 XM 291343

GBU4-5: NM 001110822 XM 001713629 XM 001713630

15 XM 001713631

Anexina 1: NM 000700

Anexina 2: NM 004039

20 1. Antígenos e VOL (controle negativo) foram diluídos as concentrações apropriadas em 0,1 M de tampão de carbonato. As diluições de antígeno foram dispensados em 50 µl/reservatório nas séries de uma placa micrótuladora Falcon de acordo com um esquema da placa usando uma pipeta de canais múltiplos eletrônicos. As placas foram revestidas e armazenadas a 4° C por 48 horas.

25 2. As placas foram lavadas uma vez em PBS + 0,1 % de tween 20 usando um lavador de placa automática então secagem manual em papel toalha.

3. As placas foram bloqueadas com tampão de incubação com alto teor de sal (HSBT, PBS + 0,5 M de NaCl + 0,1 % de caseína + 0,1 % de tween<sup>TM</sup> 20) a 200 µl/reservatório por uma hora ou até requerer para o uso

(estoque revestido a 4° C).

4. Amostras testadas do fluido corporal do paciente e materiais calibradores foram diluídos como apropriado em HSBT em temperatura ambiente.

5. As placas foram esvaziadas e secadas manualmente em papel toalha. Cada amostra de teste diluída (ou material calibrador) foi dispensado em 50 µl/reservatório em todos os reservatórios da placa microtituladora usando uma pipeta de canais múltiplos eletrônicos. As placas foram revestidas e incubadas por 1,5 hora em temperatura ambiente com agitação.

10 6. Etapa de lavagem: As placas foram lavadas três vezes em PBS + 0,1 % de tween 20 usando um lavador de placa automática então secagem manual em papel toalha.

15 7. IgG&M anti-humano de coelho conjugado por peroxidase de rabano silvestre (Jackson, 1/10.000 em HSBT) ou IgG anti-humano de coelho (Dako, 1/5000 em HSBT). Foi dispensado em 50 µl/reservatório em todos os reservatórios da placa microtituladora. Ig anti-camundongo de coelho conjugado por HRP (1/1000 em HSBT) foi usado para os ensaios que utilizam os anticorpos monoclonais de camundongo. As placas foram então incubadas 20 em temperatura ambiente por 1 hora com agitação.

8. As placas foram lavadas como na etapa 6.

9. O substrato TMB pré-preparado foi adicionado a 50 µl/reservatório e placa incubada na bancada por 1 minuto. As placas foram gentilmente manuseadas para misturar.

25 10. A densidade óptica dos reservatórios foi determinada a 650 nm usando um protocolo de leitura de placa padrão.

#### **Exemplo 1 (comparativo): Anticorpos monoclonais como calibradores**

Os anticorpos monoclonais foram investigados como materiais calibradores potenciais nos ensaios de auto-anticorpo (dados não mostrados).

Embora as respostas de diluição reprodutíveis devem ser produzidas, estes não devem ser usados como curvas calibradoras. Foi considerado que este foi um sistema de calibração ineficiente por causa dos anticorpos monoclonais foram murino na origem e, portanto, requerem um sistema repórter de anticorpo secundário diferente aquele usado para detectar os auto-anticorpos humanos no soro. Deste modo com este método um é efetivamente usando dois sistemas de medição diferentes e variação dia a dia devido ao sistema de anticorpo secundário não pode ser detectado e calibrado pelo sistema monoclonal de camundongo. Além disso, a resposta monoclonal é deste modo específico que este não pode efetivamente imitar a resposta policlonal exibido pelos auto-anticorpos humanos. Este pode explicar porque os anticorpos monoclonais não são usados como materiais calibradores na doença autoimune benigna tal como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide.

Visto que os anticorpos monoclonais foram descontados como possíveis calibradores materiais, os inventores escolhidos para investigar fluidos de ascite e pleurais humanos como possível fontes de materiais calibradores pelas razões resumidas acima.

**Exemplo 2: Demonstração da Especificidade de antígeno dos anticorpos em fluidos humanos**

Os fluidos pacientes foram avaliados em um ensaio de auto-anticorpo padrão em diluição de 1 a 100 (em HSBT) para determinar aquele que os anticorpos contidos contra um antígeno selecionado (Tabela 1). Figura 1 a & b mostra os exemplos de inibição da ligação de auto-anticorpos em dois fluidos pleurais diferentes a dois antígenos diferentes por sua pré-incubação com aquele antígeno na solução. Deste modo, foram mostrados que os antígenos selecionados mede os auto-anticorpos que são específicos por aquele antígeno associado do tumor particular.

Como uma demonstração adicional da especificidade dos anticorpos nos fluidos pleurais pelos antígenos associados ao tumor, Western

Blots foram realizados nos antígenos recombinantes usados como agentes de captura no ensaio de auto-anticorpo. Estes realizam de acordo com as metodologias padrão descritas na literatura e foram sondados com fluidos pleurais selecionados como calibradores. Os resultados podem ser visto na Figura 2 em que a especificidade de cada fluido para um antígeno particular é demonstrado por faixas fortes do tamanho correto correspondente a ligação de anticorpo ao antígeno com pequena ou nenhuma evidência de ligação as faixas do material de contaminação. Na figura 3, o soro foi usado para sondar Western Blots similar e no caso de forte ligação aos contaminantes bacterianos que estão presentes em todos dos antígenos recombinantes podem ser vistos. Foram observados que 7/67 (90 %) das amostras de soro testadas contém os anticorpos as proteínas bacterianas entretanto, dos 54 fluidos pleurais avaliados por Western Blotting, apenas 4 (7 %) mostrou qualquer evidência de tal ligação.

Apesar do fato que os pacientes tem câncer metastático e, portanto, presumidamente o câncer está presente por algum período, algumas amostras de fluido foram mostrados ter os auto-anticorpos a um número limitado dos antígenos (Tabela 1).

	Número de fluidos em cada grupo calibrador						
	P53	C-myc	ECD6	NYESO	BRCA2	PSA	Anexina XIa
baixo							
intermediário							
alto							

Tabela 1: Avaliação de fluidos pleurais para os auto-anticorpos contra sete antígenos diferentes associados ao tumor. Níveis de auto-anticorpo medidos são arbitrariamente projetados baixos, intermediários ou altos.

Na doença autoimune benigna os auto-antígenos são usualmente mais limitados para o distúrbio particular. Neste respeito os dados nos fluidos corporais em pacientes com câncer relacionados são diferentes. A presença de auto-anticorpos diferentes em pacientes diferentes com câncer fazem o desenvolvimento de um sistema de calibração total por teste de auto-

anticorpo múltiplo mais desafios e complexos. Seguindo a avaliação destes fluidos aquele positivo contra um antígeno foram investigados ainda por seu melhor uso como um calibrador para o ensaio.

### **Exemplo 3: Antígeno e VOL titulado e fluidos titulados**

5 A possibilidade do uso dos fluidos pacientes como um sistema de calibração foi inicialmente investigado usando um sistema de titulação duplo, em que as placas de ensaio foram revestidas com titulações de tanto antígeno quanto VOL (ver Tabela 2a). Os antígenos e VOL foram deixados absorver a placa por um mínimo de 48 horas após este período foi lavado e  
10 bloqueado por 90 minutos com PBS contendo caseína (0,1 % p/v), NaCl (0,5M) e Tween 20 (0,1 % p/v). Durante a incubação de bloqueio de uma série de titulações calibradores de fluido paciente (em HSBT) foram preparados em tubos. Seguindo a remoção do tampão de bloqueio, estes foram adicionados a placa vazia como mostrado na Tabela 2b e incubadas por  
15 90 minutos. O remanescente do ensaio foi realizado como descrito nos materiais e métodos.

2a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
B	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
C	0,5nm A	1,6nM A	5nm A	16nM A	50nM A	160nM A	0,5nm A	1,6nM A	5nm A	16nM A	50nm A	160nM A
D	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
E	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
F	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
G	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0,5nM A	1,6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
H	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0,5nM V	1,6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V

2b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Fluido Calibrador 1:32 diluição						Fluido Calibrador 1:2 diluição					
B	Fluido Calibrador 1:64 diluição						Fluido Calibrador 1:4 diluição					
C	Fluido Calibrador 1:128 diluição						Fluido Calibrador 1:8 diluição					
D	Fluido Calibrador 1:32 diluição						Fluido Calibrador 1:16 diluição					
E	Fluido Calibrador 1:64 diluição						Fluido Calibrador 1:32 diluição					
F	Fluido Calibrador 1:128 diluição						Fluido Calibrador 1:64 diluição					
G	Fluido Calibrador 1:32 diluição						Fluido Calibrador 1:16 diluição					
H	0 Fluido Calibrador						Fluido Calibrador 1:8 diluição					

Tabela 2: Esquema de placa e ensaio da calibração do método 2 onde o fluido e antígeno foram ambos titulados sobre a placa. Onde A: antígeno e V : VOL (proteína de controle negativo).

Pela análise dos dados por este método uma ampla quantidade de dados foi produzida, não todos estes aplicáveis para a função de um sistema de calibração. A Figura 4 é um exemplo de um resultado gerado por este formato de ensaio usando fluido pleural como o material de calibração.

5 Pelo uso deste método foi demonstrado que os fluidos dos pacientes devem produzir as curves de titulação efetiva no fluido diferente e/ou diluições de antígeno. Este método produziu uma ampla quantidade de dados, mas não aparece para otimizar o uso de tais fluidos como ensaios de calibradores. Como é claramente demonstrado na figura 5, a ligação de 10 fluidos as baixas concentrações de antígeno não é útil na calibração devido ao baixo sinal e faixa dinâmica estreita. Entretanto nas concentrações estática altas de antígeno tal como 160 e 50 nM existe uma ampla faixa dinâmica de valores OD derivados da ligação do fluido do paciente ao antígeno; dando o aumento ao escopo para a calibração de uma ampla faixa de medições de 15 auto-anticorpo.

Este resultado leva ao método calibrador 3 onde utilizam esta observação de modo que as placas foram revestidas com uma concentração estática de antígeno e o fluido do paciente titulado como calibrador.

**Exemplo 4: Antígeno e VOL em uma concentração estática e fluido titulados**

20 Observou-se este método produzido as series de dados mais úteis em relação ao ensaio de auto-anticorpos por razão de reduzir a quantidade de dados sendo coletados a um nível que deve ser facilmente reproduzivelmente produzido e analisado de maneira eficiente. Pela redução 25 da quantidade dos reservatórios sendo submetidos ao ensaio pela realização de calibração, também foi possível realizar as amostras de controle concorrentemente na mesma placa como as curvas calibradoras. Também foi demonstrado que as medições de auto-anticorpo de soro a 160 e 50nM são a informação mais útil e que as curves de calibração medidas contra estas duas

concentrações de antígeno fornecidos a maior faixa dinâmica para a calibração. Foi, portanto, decidido para investigar este método nos ajustes múltiplos.

Os experimentos iniciais foram conduzidos para determinar a 5 reproduutibilidade dos fluidos dos pacientes contra sete antígenos diferentes. Estes ensaios foram realizados em placas revestidas com o antígeno a 160nM e 50nM. Os antígenos foram deixados absorver a placa por um mínimo de 48 horas após este período de placa foi lavado e bloqueado por 90 minutos com HSBT. Durante a incubação de bloqueio uma série de titulações múltiplas de 10 calibradores de fluido paciente foram preparadas em tubos. Seguindo a remoção do tampão de bloqueio, estes foram adicionados a placa vazia e incubadas por 90 min. O remanescente do ensaio foi realizado como descrito em materiais e métodos.

A cada placa, o fluido calibrador foi aplicado em duplicata 15 abaixo da faixa de diluição de duplicação começando em 1:2. Este ensaio foi realizado em 10 ocasiões para determinar a reproduutibilidade do sinal. Os resultados na figura 5 mostra os gráficos representativos da forma média das curvas produzidas a partir de 10 realizações. A variação de inter-ensaio é representada na forma de barras de erro que são mostrados na forma dos 20 desvios padrão associados com a média das 10 realizações. O coeficiente de inter-ensaio da variação (CVs) pela reação com cada antígeno são mostrados na Tabela 3.

CV de dados OD brutos							
	C-myc	P53	PSA	Annexina	BRCA2	ECD6	NYESO
diluição 1	11	9	8	8	13	13	7
diluição 2'	9	11	10	8	10	21	8
diluição 3	11	14	12	8	9	20	14
diluição 4	14	17	18	11	11	28	18
diluição 5	15	13	17	17	13	28	21
diluição 6	17	12	19	18	14	25	25
diluição 7	18	10	17	21	17	20	20
diluição 8	17	10	12	19	15	17	17

Tabela 3: Inter-ensaio CVs (%) para cada diluição de fluido de drenagem que

reage com uma faixa de抗ígenos associados ao tumor. As figuras são calculadas a partir do cálculo de dez realizações.

Ainda o desenvolvimento dos experimentos acima of 5 leva ao seguinte protocolo de calibração. Entretanto deve ser notado que este método é dado como um exemplo mas não é apenas o método em que os fluidos corporais tal como ascite e efusões pleurais devem ser usadas para produzir um sistema de calibração. O método descrito permite o uso de um fluido do paciente como um calibrador que é seriamente diluído 10 abaixo da placa revestido com a concentração estática de抗ígeno (por exemplo, 50nM ou 160nM de抗ígeno e VOL). Também permite a incorporação do soro de controle no formato do ensaio. Este método então plota a diluição de fluido em log contra o OD em log dos calibradores de fluido para produzir uma curva logística de 4 parâmetros. 15 Esta curva foi então usada para extrapolar o valor do fluido calibrador equivalente a partir dos valores de densidade óptica em log do soro de controle.

#### **Exemplo 5: Otimização do método de calibração:**

O seguinte é um exemplo de um projeto do ensaio para calibrar os ensaios auto-anticorpos marcadores anti-tumores.

20 As placas microtituladoras de 96 reservatórios foram revestidos nos níveis de抗ígeno tanto em 160nM quanto 50nM (Anexina X1a, PSA, p53, ECD6, BRCA2, NYESO e c-myc) e a proteína de controle negativo, VOL como apresentado na Tabela 4. Os抗ígenos foram deixados absorver à placa por pelo menos 48 horas a 4°C. Após este período a placa 25 foi lavada e bloqueada por 90 minutos com HSBT. Durante a incubação de bloqueio as diluições de calibração e soro de controle (diluído 1:100 em HSBT) foram preparados.

	1-3	4-6	7-9	10-12		1-3	4-6	7-9	10-12
A					A				
B					B				
C					C				
D					D				
E					E				
F					F				
G					G				
H					H				
	160nM Antígeno		160nM VOL			50nM Antígeno		50nM VOL	

Tabela 4: O método de revestimento para as placas calibradoras de fluido.

Seguindo a remoção do tampão de bloqueio, o fluido calibrador e soro de controle foram adicionados a placa vazia como mostrado na Tabela 5 e incubados por 90 minutos. O remanescente do ensaio foi 5 realizado como descrito em materiais e métodos. As curvas de titulação de antígeno foram construídas usando valore médios de triplicatas para a calibração. O log da diluição do fluido calibrador e o log da densidade média óptica foram plotados em um gráfico e usado para plotar uma curva logística de 4 parâmetros para ajustar os dados. Esta curva foi então usada para 10 extrapolar o valor da dissolução do fluido calibrador equivalente a partir dos valores de densidade óptica em log do de controle.

Para cada dia que os ensaios de auto-anticorpo são realizados uma série de placas calibradoras também são realizadas. Usando sete antígenos nas concentrações tanto 50nM quanto 160nM um total de 14 placas 15 de calibração são requeridos.

	B3255/B3258 1-2	C3/C4 3-4	Soro 5-6	B3255/B3258 7-8	C3/C4 9-10	Soro 11-12
A	1:2	1:2	soro 1	1:2	1:2	soro 1
B	1:4	1:4	soro 2	1:4	1:4	soro 2
C	1:8	1:8		1:8	1:8	
D	1:16	1:16	soro 4	1:16	1:16	soro 4
E	1:32	1:32	soro 5	1:32	1:32	soro 5
F	1:64	1:64	soro 6	1:64	1:64	soro 6
G	1:128	1:128	soro 7	1:128	1:128	soro 7
H	1:256	1:256	soro 8	1:256	1:256	soro 8

Tabela 5: Exemplos do calibrador e apresentação do soro de controle do ponto de partida da diluição foi determinado empiricamente para dar o valor mais apropriado para cada calibrador de fluido contra cada antígeno.

Estes experimentos foram inicialmente realizados usando dois

calibradores de fluidos diferentes, cada um de que consiste de um reservatório de dois fluidos retirados pelo mesmo paciente mas em períodos diferentes e 8 controles de soro. Os dados a partir de cinco ensaios realizados são apresentados nas Figuras 6 a 12.

5 O próximo experimento focado na seleção de um calibrador de fluido para cada antígeno. As principais características que definem um bom calibrador de fluido é melhor na faixa dinâmica. Se uma plotagem log/log é usada, então outras características úteis são:

- 10 • Linearidade de plotagem log/log.
- Adequabilidade da inclinação da plotagem log/log
- Reprodutibilidade da inclinação da plotagem log/log.

**Exemplo 6: Efeito da calibração na variabilidade dia a dia nas amostras de controle**

As amostras de controle foram realizadas na mesma placa como as curvas calibradoras para investigar se para o uso da curva de calibração pleural para extrapolar novamente a um valor de diluição em log, será correto pela variação dia a dia observada nas amostras de controle. Os dados que mostram a variação nos valores OD brutos comparados com os valores extrapolados a partir das curvas calibradoras são mostrados nas Figuras 13-19. Pode ser visto a partir destas Figuras que para mais antígenos, a extração a partir da plotagem log/log da linha de calibração melhora a reproduzibilidade dia a dia da medida dos níveis de auto-anticorpo no soro.

**Exemplo 7: Comparação de soro com fluidos pleurais como materiais calibradores**

Os ensaios para medir os auto-anticorpos nas doenças autoimunes tem usados no soro e plasma como materiais calibradores. Os fluidos de drenagem tem diversas vantagens nos produtos sanguíneos. Estes são disponíveis em volumes muito amplos, são estáveis sob a armazenagem

em baixas temperaturas por um longo período de tempo e podem ser, portanto, usados para fornecer os materiais calibradores reprodutíveis por muitos ensaios. A coleção de um amplo volume em um ponto de tempo simples tem potencialmente as vantagens importantes na coleção sequencial múltipla de valores muito menores de soro. Primeiramente, a doença metastática é uma condição incurável e os pacientes eventualmente todos morrerão de sua doença tornando a amostragem sanguínea sequencial muito difícil e eventualmente impossível. Secundariamente, o titulador dos anticorpos devem mudar com o tempo e deste modo as amostras sanguíneas sequenciais não devem ser comparáveis. Em terceiro lugar, com correntes antigênicas da resposta humorai imune deve mudar um outro antígeno imuno-dominante. Ainda se as amostras sanguíneas foram retiradas a partir dos primários pacientes com câncer de mama (isto é em um estágio precoce) então ser um paciente é curado por seu tratamento das respostas auto-anticorpos podem diminuir e não detectam nas amostras sequenciais. Todos dos meios acima que usam os fluidos corporais como descrito em esta aplicação são acreditados ser novos e inventivos. A fim de avaliar outras vantagens do uso de fluidos uma comparação direta com amostras de soro determinadas foi realizado. As series de diluição do soro e fluidos de drenagem retirados pelo mesmo paciente foram submetidos ao ensaio para sua capacidade de ligar a uma faixa de antígenos associados ao tumor. Os resultados são mostrados nas Figuras 20 e 21.

Pode ser visto na Figura 20 que a origem da reatividade do fluido e soro foram similares através de uma faixa de antígenos. Entretanto a Figura 21 mostra que para os antígenos que mostram a reatividade positiva para os sinais dos auto-anticorpos (isto é ECD6, PSA & Anexina XI-a) no soro é geralmente inferior do que o sinal no fluido pleural. Além disso, a origem da reatividade difere-se com os auto-anticorpos de soro tendo um nível bem inferior de reatividade com PSA relativo ao ECD6. Este sugere que

embora as amostras C7 e 11828 são a partir do mesmo paciente, o fluido de drenagem pleural C7 fornece um melhor calibrador pelos auto-anticorpos PSA devido a sua faixa dinâmica maior. Esta observação particular foi extremamente não esperada.

5 **Exemplo 8: Uso dos fluidos pleurais para calibrar os ensaios no ajuste laboratorial clínico**

A fim de validar o uso de fluidos pleurais sob as condições encontradas em um ensaio de realização em laboratório de rendimento alto de auto-anticorpos dos seguintes experimentos foi realizado:

10 Calibração:

Após a primeira identificação dos calibradores de fluidos adequados com especificidade para cada antígeno (ver Exemplo 2) e otimizar a faixa de diluição medir a faixa dinâmica do ensaio (ver Exemplo 4), as placas calibradoras foram revestidas com antígeno como na 15 tabela 6:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Exemplo de séries de diluição de fluido
A													1 em 8
B													1 em 16
C	antígeno a			VOL a			antígeno a			VOL a			1 em 32
D	160nM			160nM			50nM			50nM			1 em 64
E													1 em 128
F													1 em 256
G													1 em 512
H													1 em 1024

Tabela 6: Formato de placas revestidas por antígeno a serem usados pela calibração.

Os fluidos calibradores específicos por cada um dos抗ígenos no painel mostrados na figura 3 foram diluídos em série na faixa apropriada e adicionado a placa acima como mostrados no exemplo. Estas placas foram submetidas ao ensaio de acordo com o protocolo padrão.

20 Amostras de soro:

As placas foram revestidas com antígeno como na tabela 7 e usado para ensaiar diversas amostras de soro diferentes que 25 foram previamente mostrados ter os níveis de auto-anticorpos específicos

por抗原os. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo padrão.

	1 0nM	2 1,6nM	3 5nM	4 16nM	5 50nM	6 160nM	7 0nM	8 1,6nM	9 5nM	10 16nM	11 50nM	12 160nM
A	GBU 4-5							p53				
B	VOL							c-myc				
C	Annexina I							CAGE				
D	Annexina II							NY-ESO-1				
E	p53							GBU 4-5				
F	c-myc							VOL				
G	CAGE							Annexina I				
H	NY-ESO-1							Annexina II				

Tabela 7: Formato de placas usadas para ensaiar as amostras de soro para testar o desempenho do sistema de calibração sob as condições laboratoriais clínicas.

Os ensaios descritos acima foram realizados duas vezes por dia (de manhã e de tarde) por 6 dias em uma colocação de período de 2 semanas (série 1 a 12).

#### Séries de variabilidade:

A fim de testar o sistema de calibração, a variabilidade tem introduzido na produção do ensaio. Este foi atingido pela redução da concentração do anticorpo secundário rotulado pela peroxidase de rábano silvestre a fim de produzir um sinal inferior em todas as placas. Este foi realizado duas vezes no sétimo dia do ensaio (séries 13 e 14).

#### Calibração das amostras de soro:

Plotagem logística de quarto parâmetros (4pl) foi construída para cada série dos dados de calibração. Para cada plotagem uma assíntota inferior foi apresentada a zero e a inclinação foi apresentada a 1. A assíntota superior foi forçada com uma máxima de 2. Os dados a partir de cada curva individual foi resolvida para minimizar a soma dos resíduos quadrados. Estes valores fornecidos para os quarto parâmetros (assíntota superior, assíntota inferior, inclinação e  $EC_{50}$ ) que foram então usados na fórmula para ler as amostras de soro a partir da curva de calibração. Na figura 22 a plotagem 4pl de uma densidade óptica versus a diluição de fluido calibrador em log para as séries 1 a 12 é mostrado (como a linha cinza sólida) junto com as barras de

erros que representa o desvio padrão para os dados apresentados. A segunda curva em cada Figura (linha pontilhada) é a plotagem média 4pl da séries de variabilidade (séries 13 e 14) com os desvios padrão como barras de erros.

As equações que descrevem as plotagens mostradas na figura 22 foram usadas para corrigir cada amostra de soro de acordo com seu calibrador respectivo. Este resultou no valor sendo expressado como uma unidade arbitrária correspondente a diluição em log do fluido calibrador (valores RU). O efeito que este tem na variação entre as séries é mostrado na figura 23 para as amostras de soro diferentes onde os valores não calibrados são mostrados como triângulos abertos e os valores corrigidos de acordo com a curva de calibração para que as séries sejam mostrados como círculos sólidos. A linha pontilhada representa a média dos valores calibrados mais ou menos 3 desvios padrão. Nota-se que a variabilidade introduzida nas séries 13 e 14 é显著mente reduzida pela calibração.

#### **Exemplo 9: Armazenagem das séries calibradoras congeladas**

Visto que a diluição das titulações seriais é consumida no período e propenso aos erros de reproduzibilidade investigamos as diferenças entre uma série de calibradores “congelados”; onde os estoques das diluições do fluido calibrador pleural foram preparados, submetidos a alíquota e congelados a - 20° C; e aqueles frescamente preparados no dia. Os resultados deste estudo pode ser visto nas Figuras 24 a 30. Pode ser visto que existe diferenças muito pequenas entre as séries calibradoras que foram preparadas frescamente a cada dia e aquele que foram feitas nas quantidades de volume e congeladas nas alíquotas. Este sugere que, quando usado como materiais calibradores, os fluidos de pacientes diluídos são estáveis para armazenar em baixa temperatura (-20° C) e pode ser armazenada por até aos períodos estendidos sem a perda na atividade. Este é, portanto, um método válido para a redução da variação inter-série.

**Exemplo 10: Calibração usando os fluidos derivados a partir de pacientes com outros cânceres do que câncer de mama**

Alguns抗ígenos associados ao tumor e os auto-anticorpos não são extraídos ao tipo de tumor específico. Portanto é possível que os fluidos derivados de pacientes com câncer de pulmão por exemplo, devem ser usados para calibrar ensaio de auto-anticorpos para o diagnóstico precoce de câncer de mama e vice versa. A fim de testar esta teoria, os fluidos pleurais retirados dos pacientes com câncer de cólon, ovariano, pulmão, fígado e pancreático foram avaliados contra um painel de抗ígenos associados ao tumor. Uma vez que a positividade é estabelecida, as curvas de diluição de calibração foram preparadas e testadas contra os抗ígenos. O experimento foi repetido 5 vezes nos dias separados para avaliar a reprodutibilidade. Na figura 31 pode ser visto que a ligação de auto-anticorpo a uma faixa de抗ígenos diferentes associados ao tumor podem ser detectados em fluidos de pacientes com câncer de cólon (a e e), câncer ovariano (b), câncer de pulmão (c), câncer de fígado (d e f) e câncer pancreático (g). Estas respostas parecem ser reprodutíveis e tituladas como o fluido é diluído indicando que tem potenciais a serem usados como materiais calibradores nos ensaios de auto-anticorpo para o diagnóstico precoce de câncer de mama e outros cânceres.

**Exemplo 11: Uso de fluidos humanos para a quantificação de uma quantidade de superfícies sólidas em proteína**

A absorção passiva de proteínas as superfícies plásticas tal como aos reservatórios da placa microtituladora não é claramente definida e controlada e pode depender dos fatores tal como a desigualdade da superfície e carga em uma proteína e plástica. Consequentemente, é útil a ser capaz de quantificar a proteína que tem absorvido e será capaz de relacionar este e outras proteínas e outras superfícies. Os ensaios de proteína colorimétrica também são insensíveis para tais medições. As metodologias isotérmica de absorção foram descritas (Kelso et al) mas estes confiam na disponibilidade

em uma molécula investigadora rotulada. Os anticorpos contra os rótulos de proteína (tal como o His-rótulo) também podem ser usados mas estes são usualmente murino de origem e deste modo confiam em um sistema repórter diferente aquele usado para a medição dos anticorpos humanos.

5 Durante a avaliação dos fluidos humanos contra uma faixa de antígenos associados ao tumor dois dos fluidos foram observados para ligar-se a todas as proteínas incluindo o controle negativo, VOL (Figura 32). VOL é um peptídeo recombinante clonado e expressado na mesma maneira exatamente como os antígenos que justificam e que consiste de uma  
10 sequência de rótulo de biotina e um his-rótulo. Portanto os anticorpos humanos dentro destes fluidos deve ser a ligação a um ou ambos destes rótulos. Visto que os rótulos também são presentes em todos os antígenos recombinantes associados ao tumor, o fluido deve ser usado para quantificar a  
15 quantidade de proteína absorvida aos reservatórios da placa. A Tabela 6 mostra a razão de sinal a 50 nM a 160 nM para VOL em cada concentração. Pode ser visto que a razão do sinal de ligação a VOL em 50 nM e 160 nM é relativamente constante além de todas as diluições do fluido pleural. Este sugere que o sinal medido é relacionado a quantidade de proteína na placa e  
deste modo este sistema pode ser usado para quantificar os níveis de proteína.

Diluição de fluido	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
1 em 8	0,65	0,58	0,53	0,76	0,62
1 em 16	0,54	0,52	0,42	0,87	0,92
1 em 32	0,51	0,5	0,41	0,82	0,71
1 em 64	0,54	0,58	0,51	0,84	0,72
1 em 128	0,69	0,64	0,53	1,03	0,76

20 Tabela 8: Medição da ligação de auto-anticorpo a VOL do fluido de drenagem  
16. A razão de sinal em 50 nM ao sinal em 160 nM por VOL em cada diluição de fluido.

#### Exemplo 12: Detecção e calibração da ligação não específica

25 A ligação não específica é um problema inerente em qualquer imuno-ensaio sorológico devido as altas concentrações de imunoglobulinas presentes no soro que se tende a ligar-se não especificamente ao plástico da

placa ou o antígeno de revestimento. Os sinais de ligação não específica variam a partir da amostra de soro a amostra de soro mas pode ser de modo que estes mascarem a reação específica do analito.

Na prévia seção, os fluidos que se ligam a VOL foram identificados. A reação dos anticorpos de soro não é específica em que não é direcionada contra qualquer antígeno particular. Estes fluidos pleurais podem ser, portanto, usados para detectar e corrigir para a ligação não específica.

#### **Exemplo 13: Uso de fluidos de ascite como um material calibrador**

Além disso, os fluidos pleurais, fluidos de ascite foram efetivos no sistema de calibração análogo que são usados nos prévios exemplos. Estes ensaios foram realizados em placas revestidas com antígeno em 160 nM e 50 nM. Os antígenos foram deixados absorver a placa para um mínimo de 48 horas, após este período a placa foi lavada e bloqueada por 90 minutos com HSBT. Durante a incubação de bloqueio uma série de titulações do fluido calibrador de ascite de múltiplos pacientes foram preparados em tubos. Seguindo a remoção do tampão de bloqueio, estes foram adicionados a placa vazia e incubadas por 90 minutos. O remanescente do ensaio foi realizado como descrito nos materiais e métodos.

Para cada placa o fluido de ascite foi aplicado em duplicata abaixo da faixa de diluição da duplicação começando a 1:2. Este ensaio foi realizado em 4 ocasiões para determinar a reprodutibilidade do sinal. Os resultados nas Figuras 33 a 35 mostram os gráficos representativos da forma média de curvas corrigidas VOL produzidas a partir de 4 séries. A variação de inter-ensaio é representada na forma de barras de erros que são mostrados na forma de desvios padrão associado com a média das 4 séries.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um material calibrador, caracterizado pelo fato de compreender fluido corporal de mamífero para calibrar um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos, em que o material calibrador compreende um fluido de drenagem, exudato ou transudato.  
5
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o material calibrador compreende fluido corporal humano.
3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o material calibrador compreende fluido corporal coletado a 10 partir de uma cavidade ou espaço corporal em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor está ou estava associado.
4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o material de calibração compreende fluido pleural coletado de um ou mais indivíduos com câncer.  
15
5. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o material de calibração compreende fluido de ascite coletado de um ou mais indivíduos com câncer.
6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o imunoensaio é para a detecção de auto-anticorpos contra o câncer.  
20
7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o imunoensaio é para a detecção de auto-anticorpos para a mudança neoplástica precoce.
8. Método para calibrar um imunoensaio para a detecção de 25 auto-anticorpos, caracterizado pelo fato de que compreende:
  - (a) contactar cada um de uma pluralidade de diluições diferentes de um material de calibração que compreende um fluido corporal de mamífero com um antígeno específico para um auto-anticorpo, em que o dito fluido corporal de mamífero é conhecido conter auto-anticorpos

imunologicamente específicos para o antígeno e em que o material calibrador compreende um fluido de drenagem, exudato ou transudato;

(b) detectar a quantidade de ligação específica entre o dito antígeno e auto-anticorpo presente no material de calibração; e

5 (c) plotagem ou cálculo de uma curva da quantidade da dita ligação específica versus a diluição do material de calibração para cada diluição do material de calibração usado na etapa (a), desse modo calibrando um imunoensaio usando-se o dito antígeno para a detecção do dito auto-anticorpo.

10 9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o material de calibração compreende fluido corporal humano.

10. Método de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o material calibrador compreende fluido corporal coletado de um ou mais indivíduos com câncer.

15 11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizado pelo fato de que o material de calibração compreende fluido corporal coletado a partir de uma cavidade ou espaço corporal em que um tumor está ou estava presente ou com o qual um tumor está ou estava associado.

20 12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o material de calibração compreende fluido pleural coletado de um ou mais indivíduos com câncer.

25 13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o material de calibração compreende fluido de ascite coletado de um ou mais indivíduos com câncer.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 13, caracterizado pelo fato de que o material de calibração compreende fluido corporal humano que é conhecido conter auto-anticorpos humanos naturais que são imunologicamente específicos para uma proteína marcadora

de tumor.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 14, caracterizado pelo fato de que o antígeno da parte (a) é usado em uma concentração maior do que 20 nM.

5 16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o antígeno da parte (a) é usado em uma concentração na faixa de 20 nM a 180 nM.

10 17. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o antígeno da parte (a) é usado em uma concentração na faixa de 50 nM a 160 nM.

15 18. Kit de imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos, caracterizado pelo fato de que compreende uma série de padrões de calibração para o uso na calibração de um imunoensaio para a detecção de auto-anticorpos, em que cada padrão de calibração na dita série compreende uma diluição diferente de um fluido corporal de mamífero, o dito fluido corporal de mamífero sendo conhecido por conter auto-anticorpos humanos naturais, e em que o material calibrador compreende um fluido de drenagem, exudato ou transudato e um reagente de imunoensaio que compreende um antígeno imunologicamente específico para os ditos auto-anticorpos.

20 19. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o imunoensaio é para a detecção de auto-anticorpos contra doença autoimune benigna.

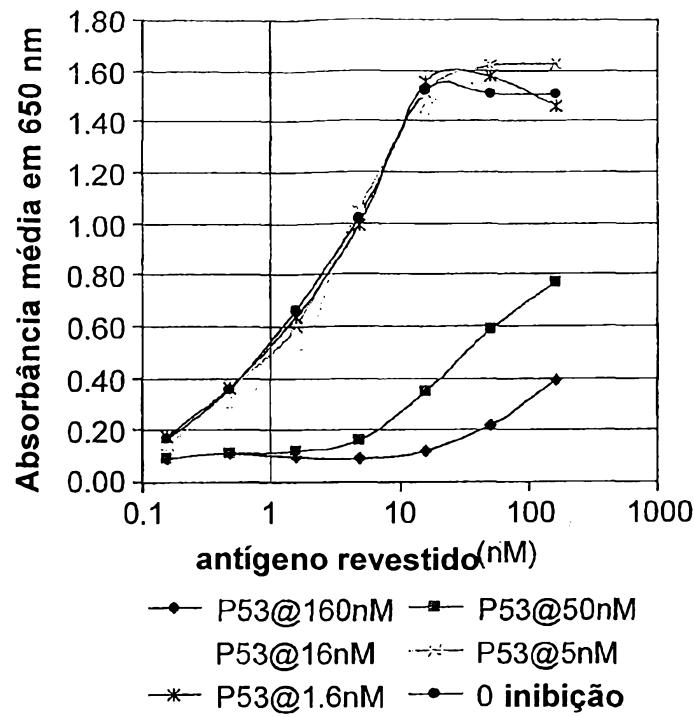


FIG. 1a

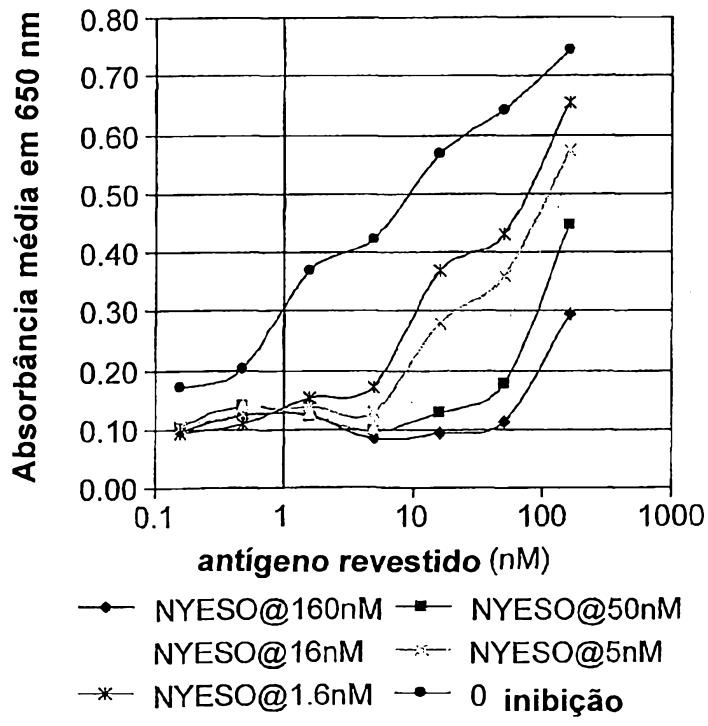


FIG. 1b

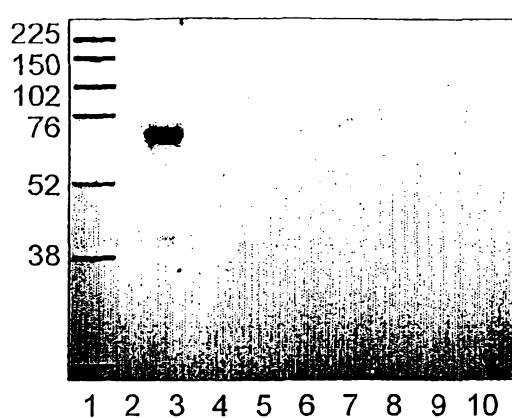


FIG. 2a

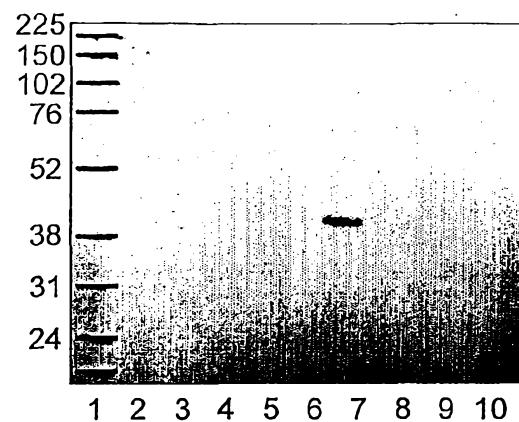


FIG. 2b

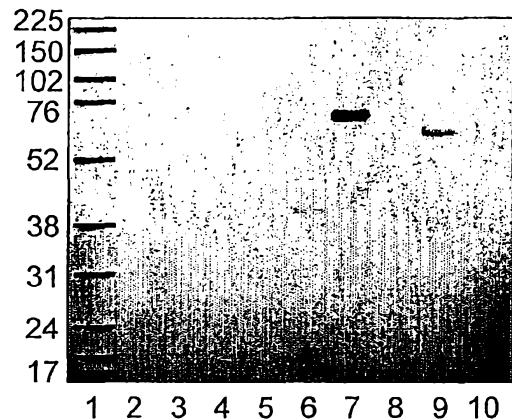


FIG. 2c

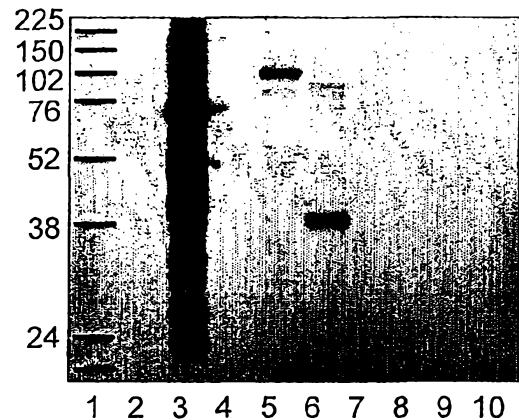


FIG. 2d

## contaminantes

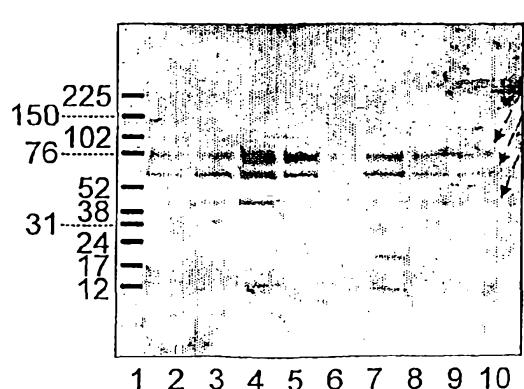
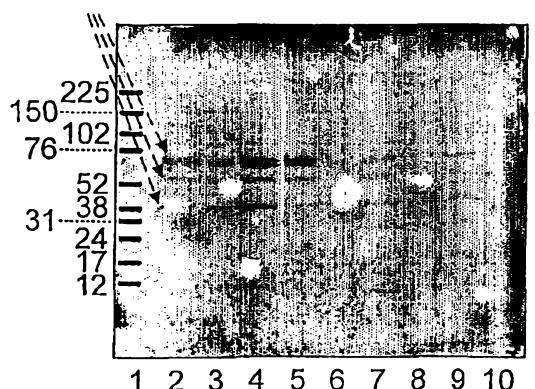


FIG. 3



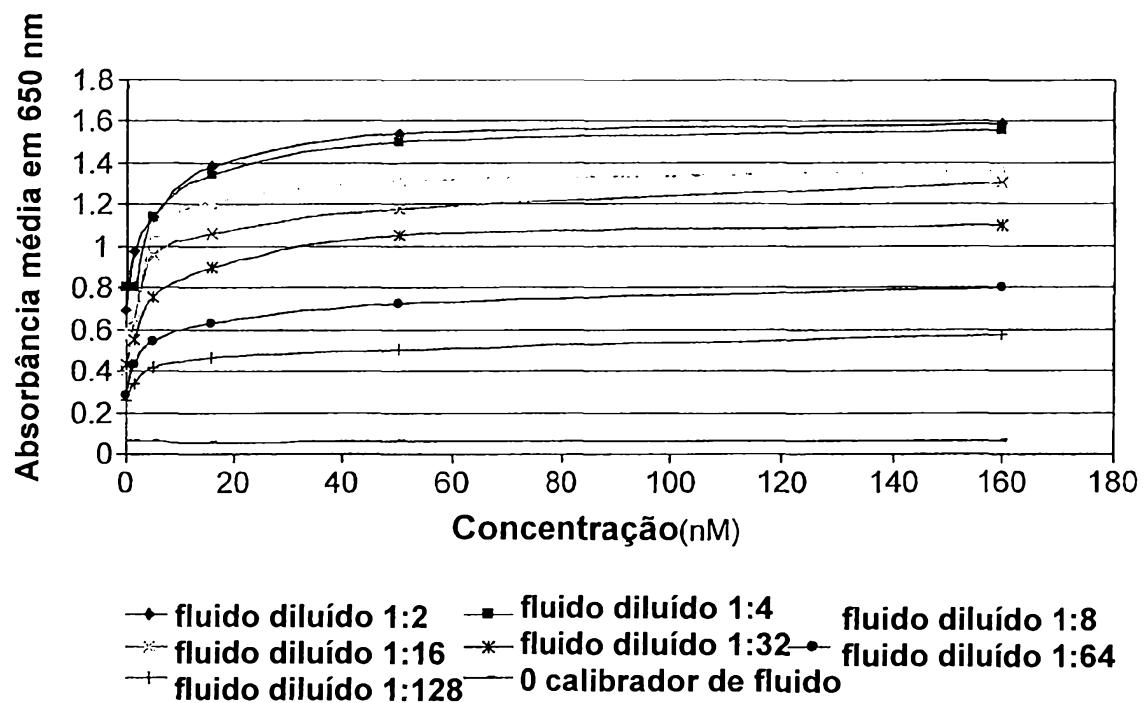


FIG. 4

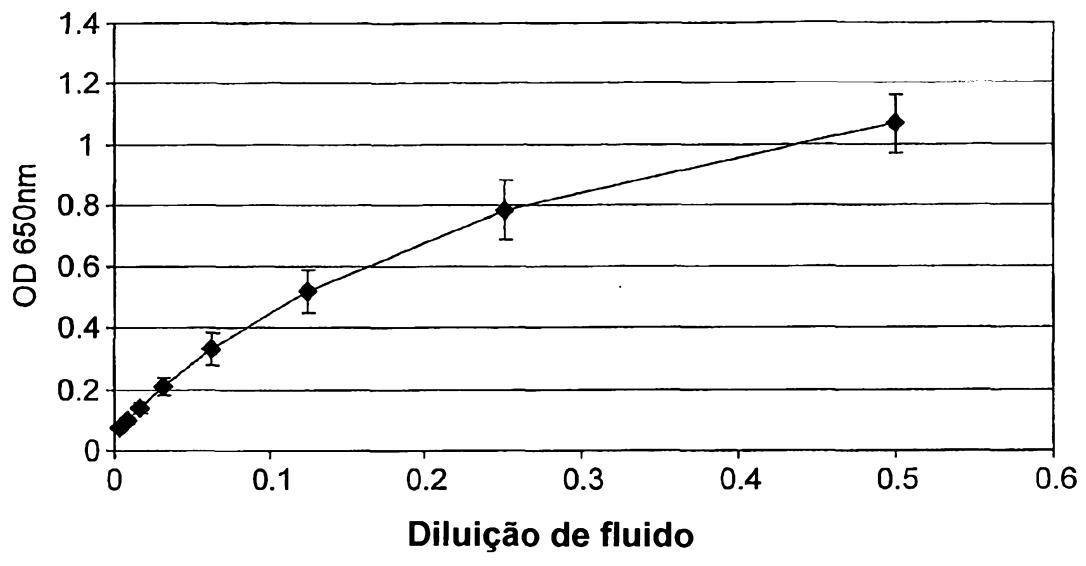


FIG. 5a

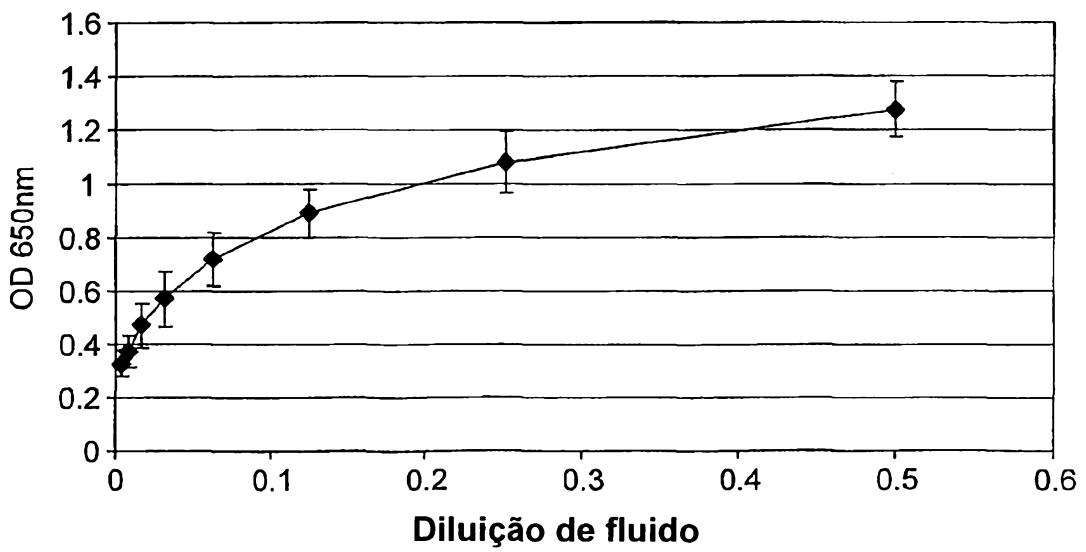
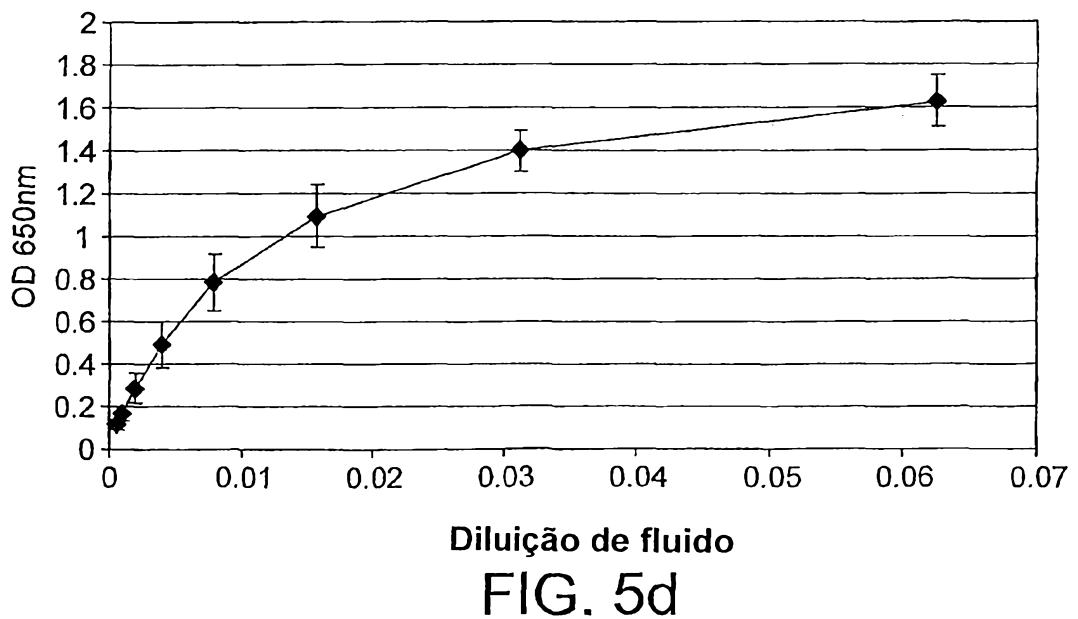
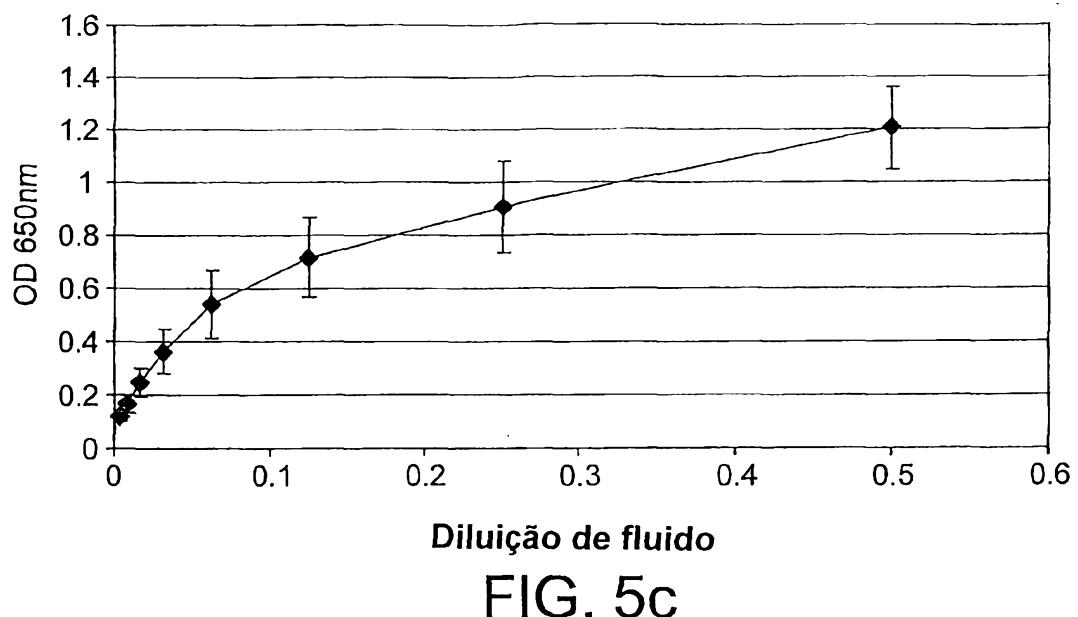


FIG. 5b



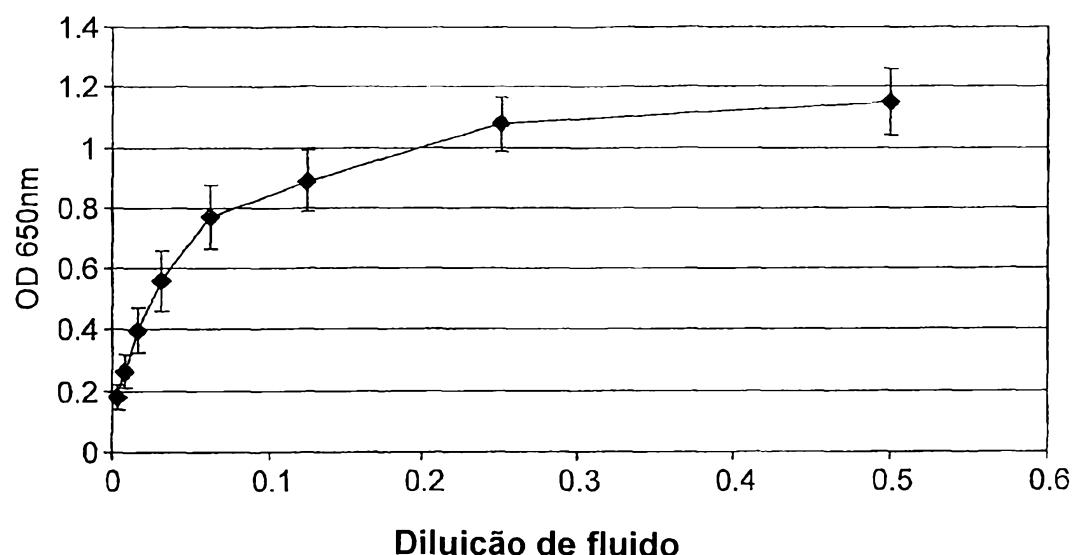


FIG. 5e

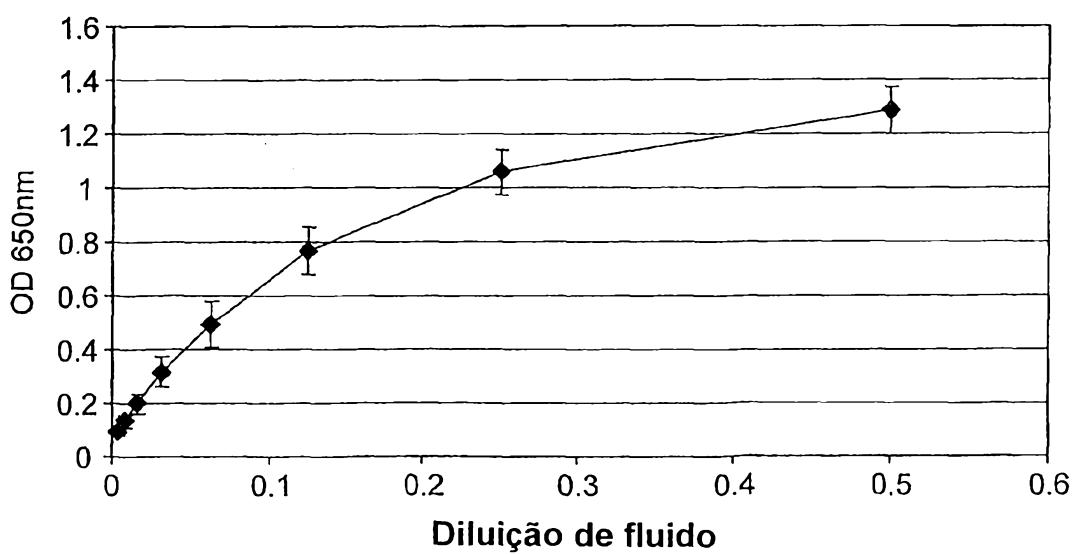
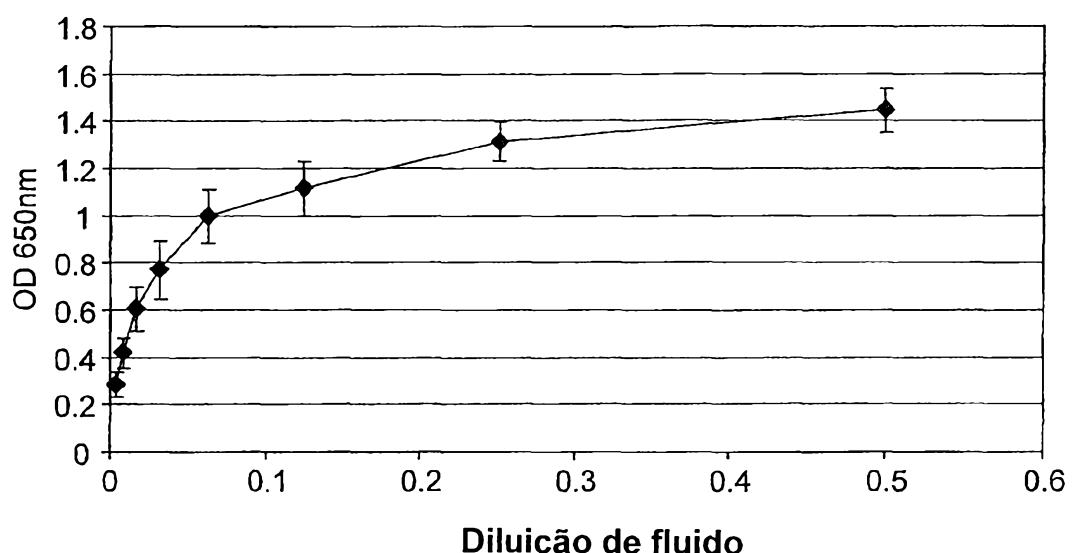
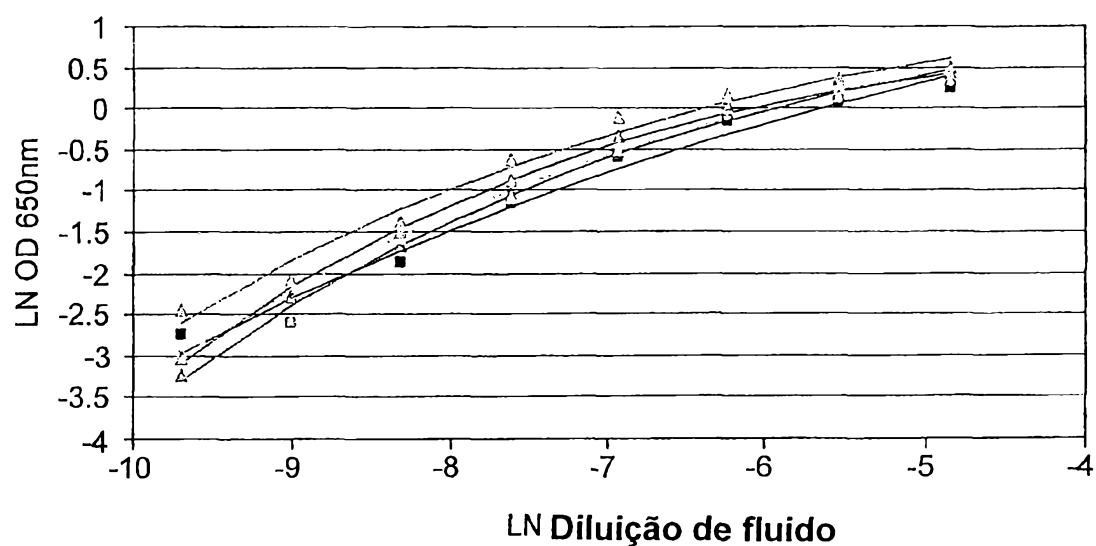


FIG. 5f



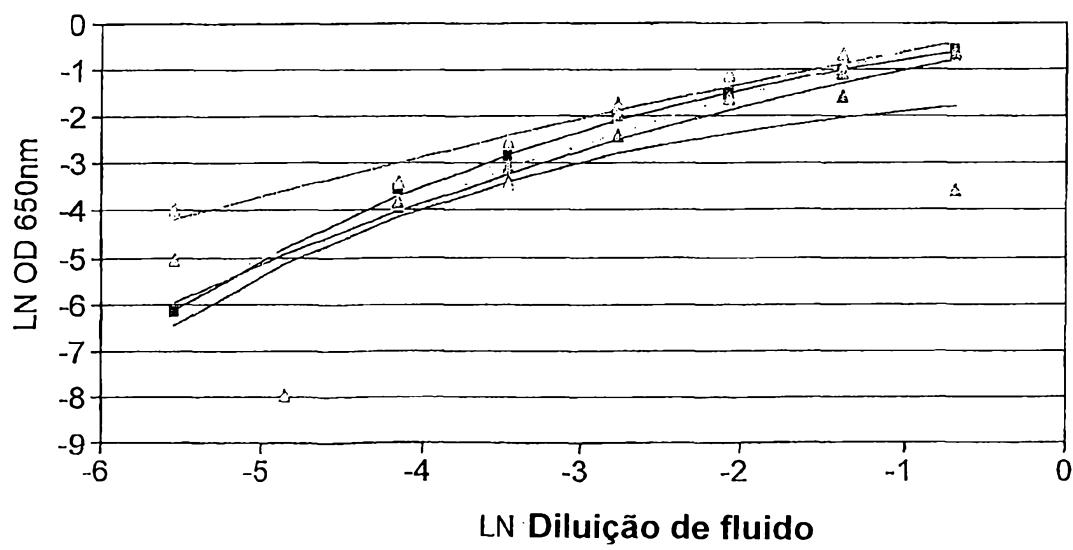
Diluição de fluido

FIG. 5g



LN Diluição de fluido

FIG. 6a



LN Diluição de fluido

FIG. 6b

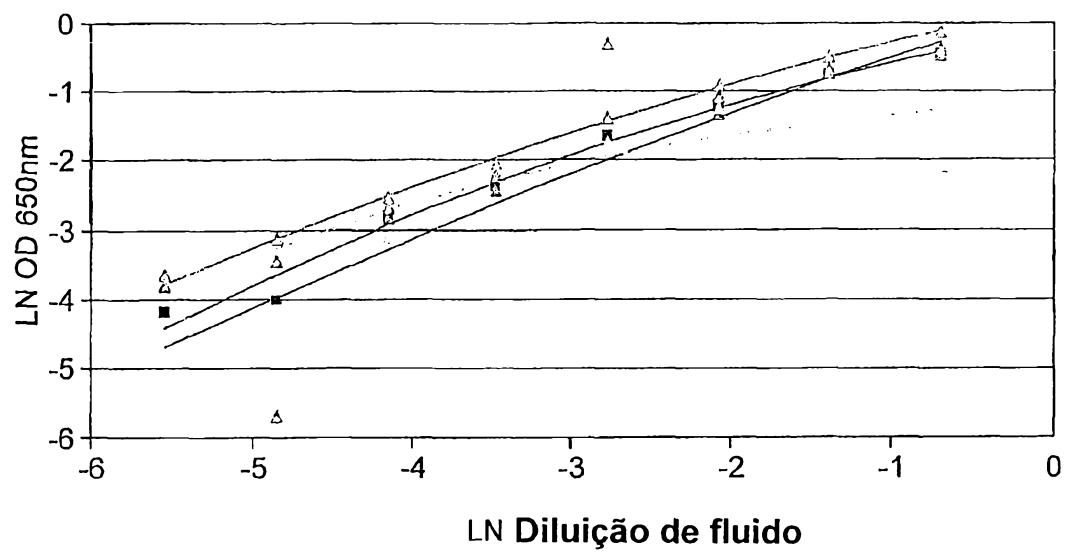


FIG. 7a

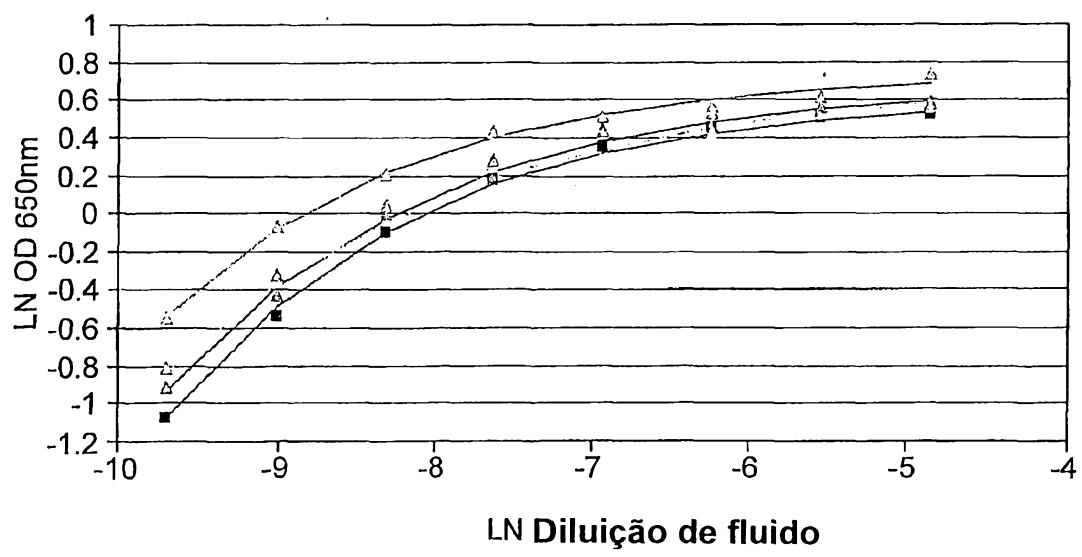


FIG. 7b

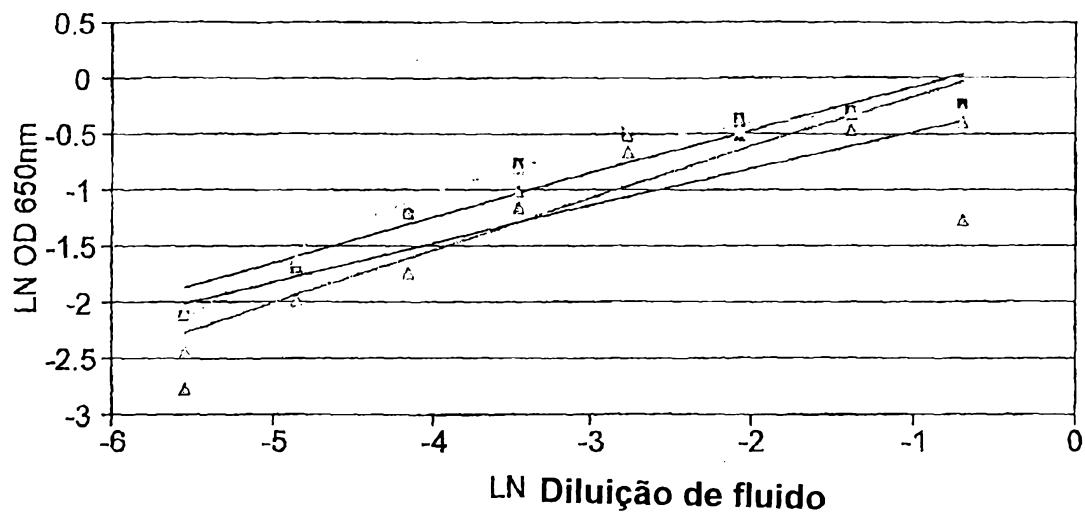


FIG. 8a

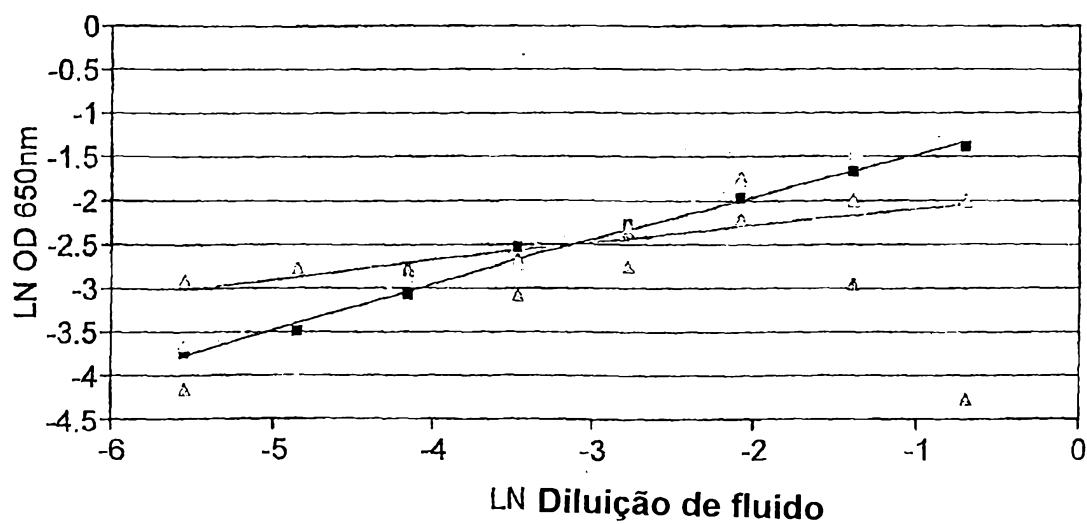


FIG. 8b

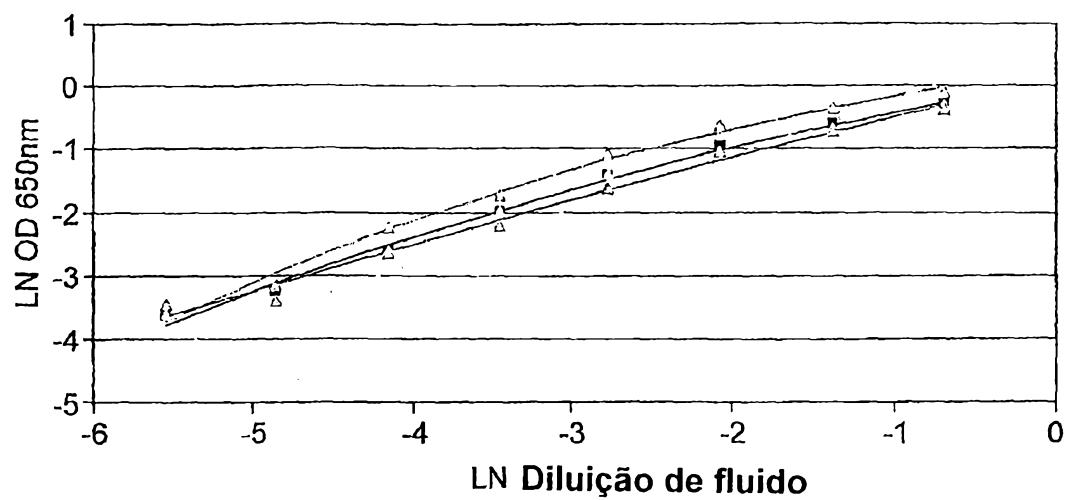


FIG. 9a

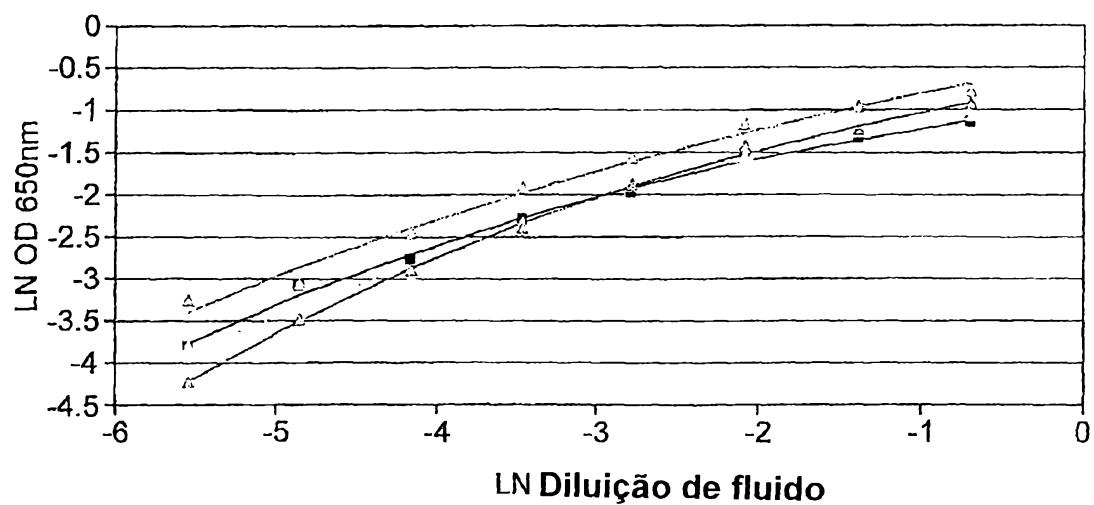


FIG. 9b

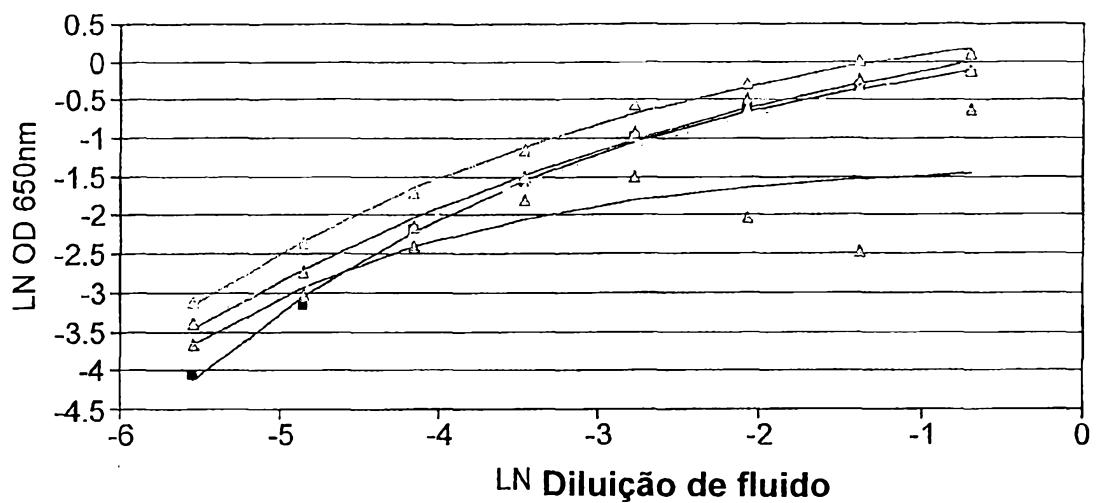


FIG. 10a

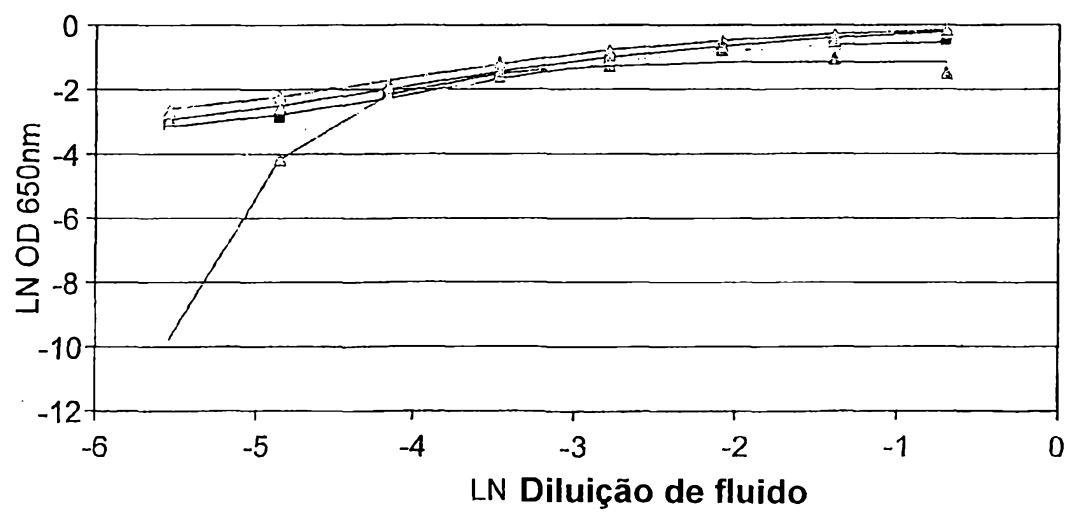


FIG. 10b

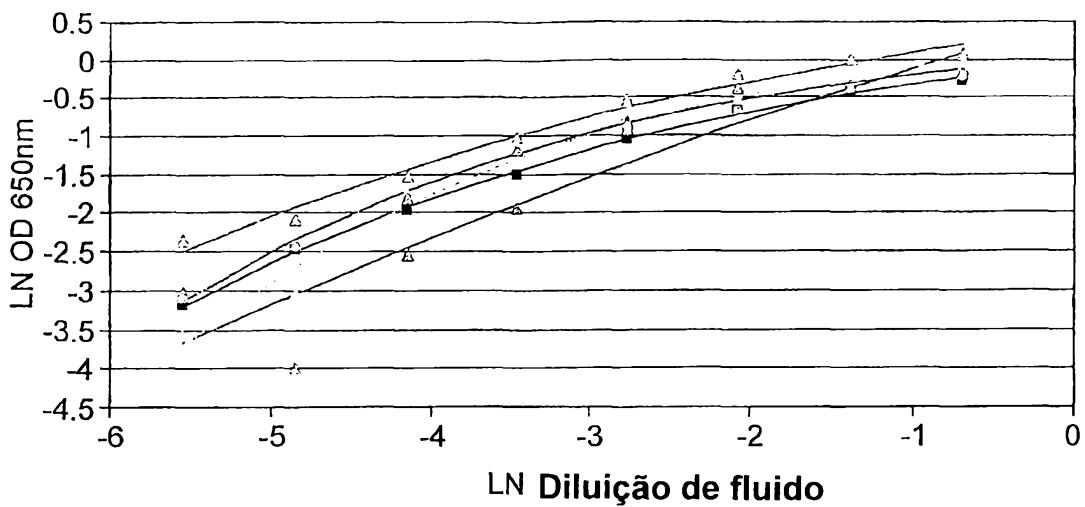


FIG. 11a

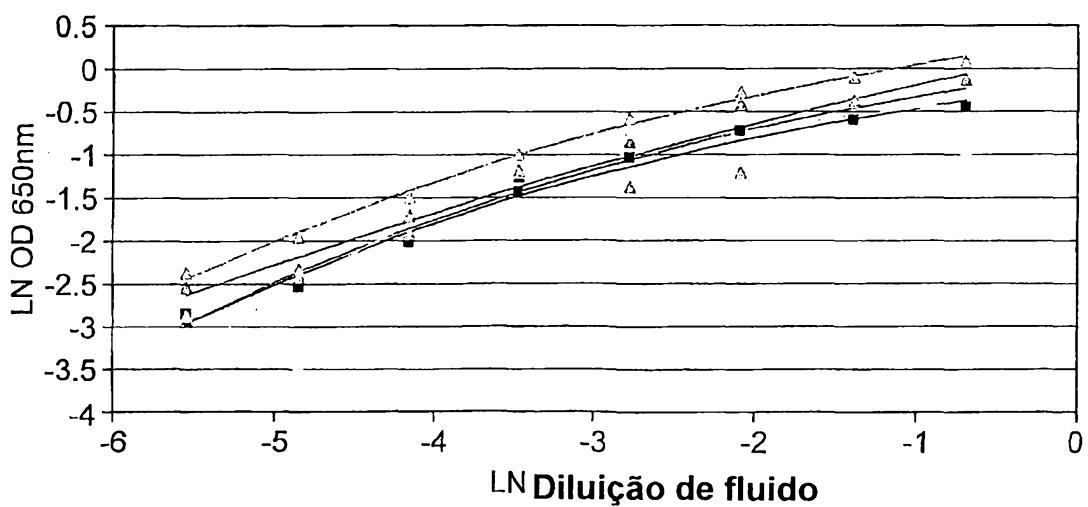


FIG. 11b

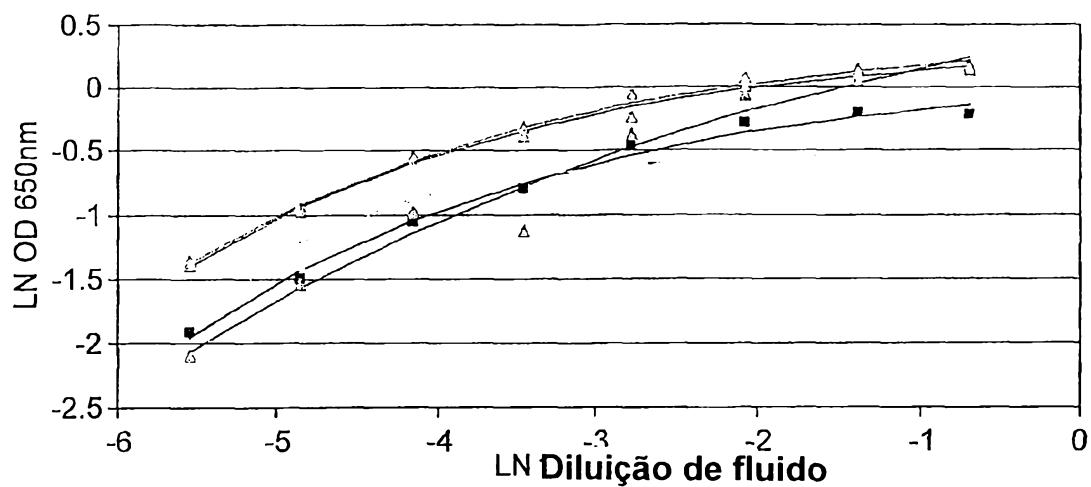


FIG. 12a

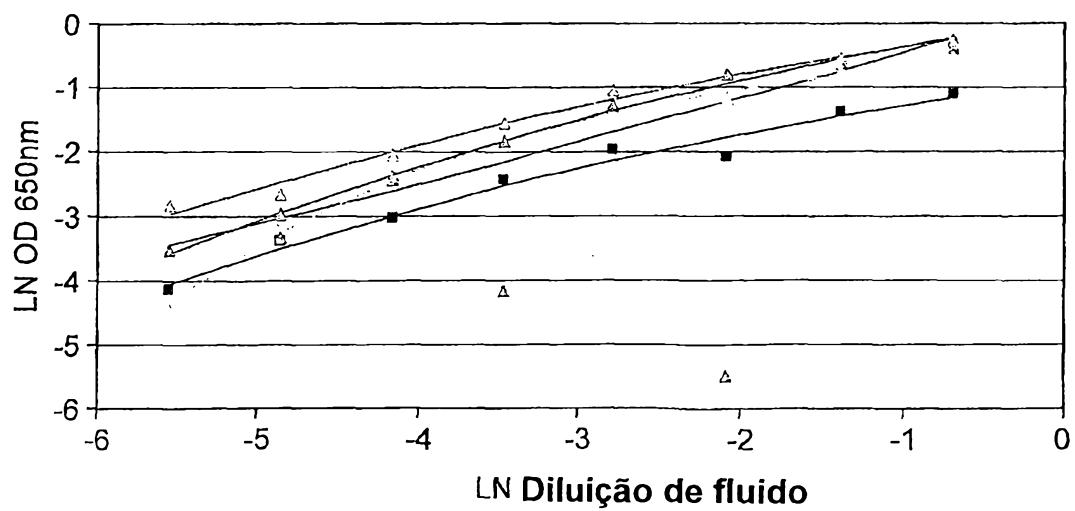


FIG. 12b

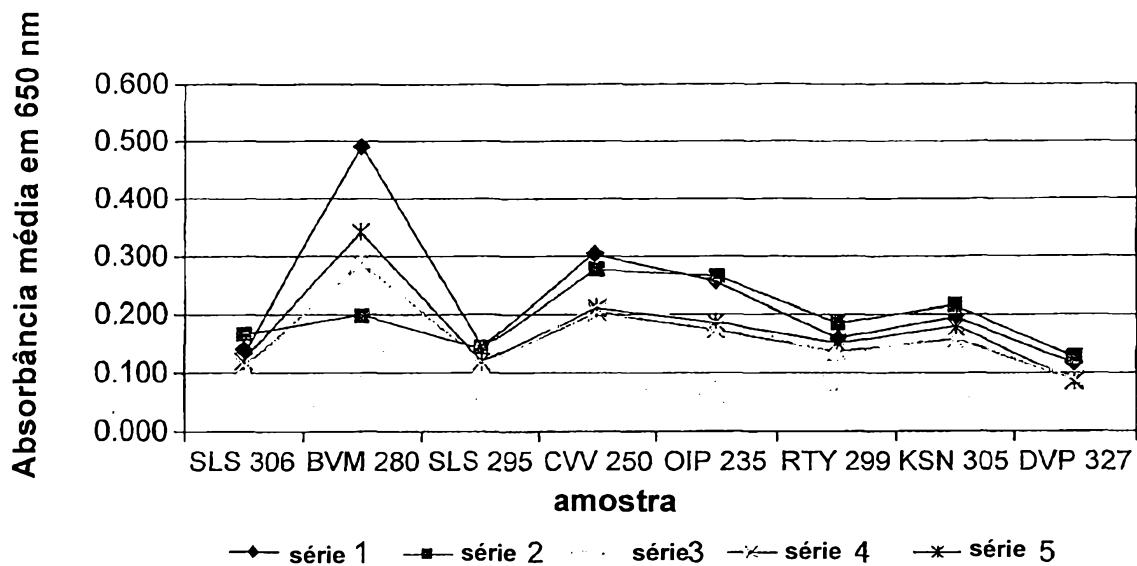


FIG. 13a

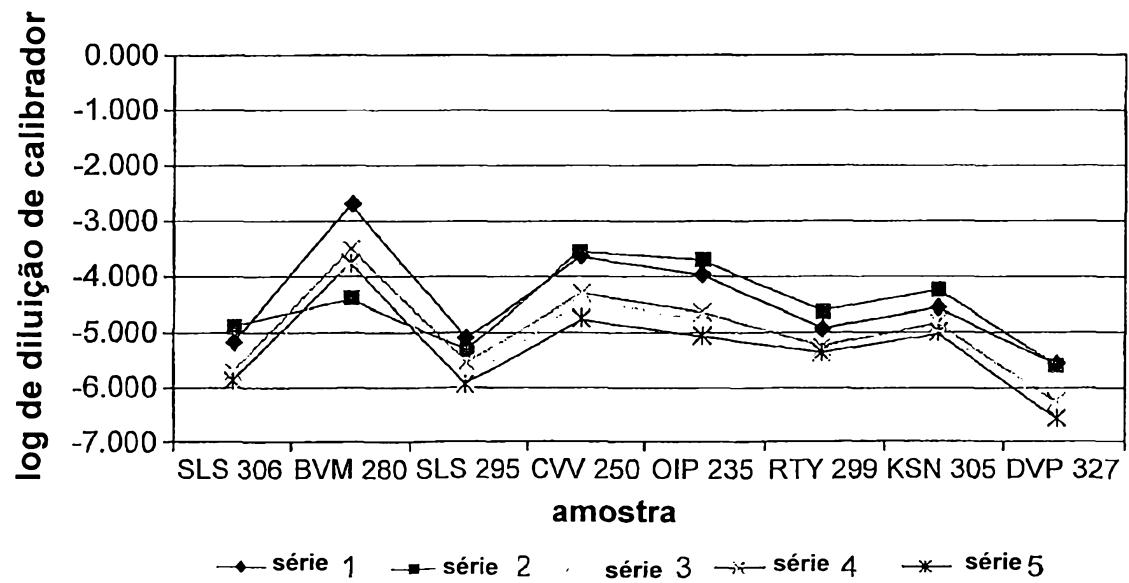


FIG. 13b

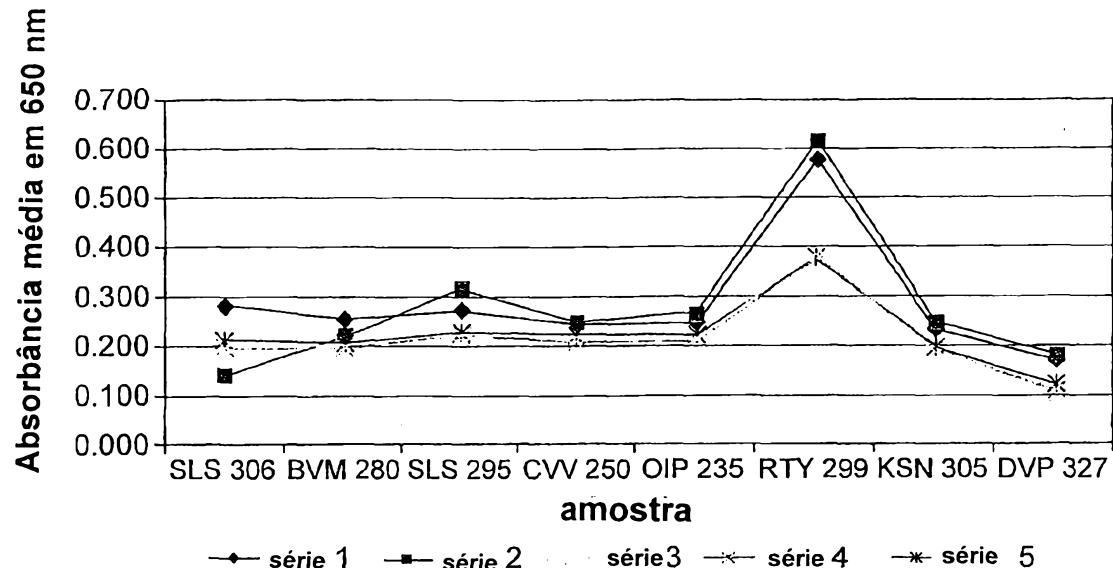


FIG. 14a

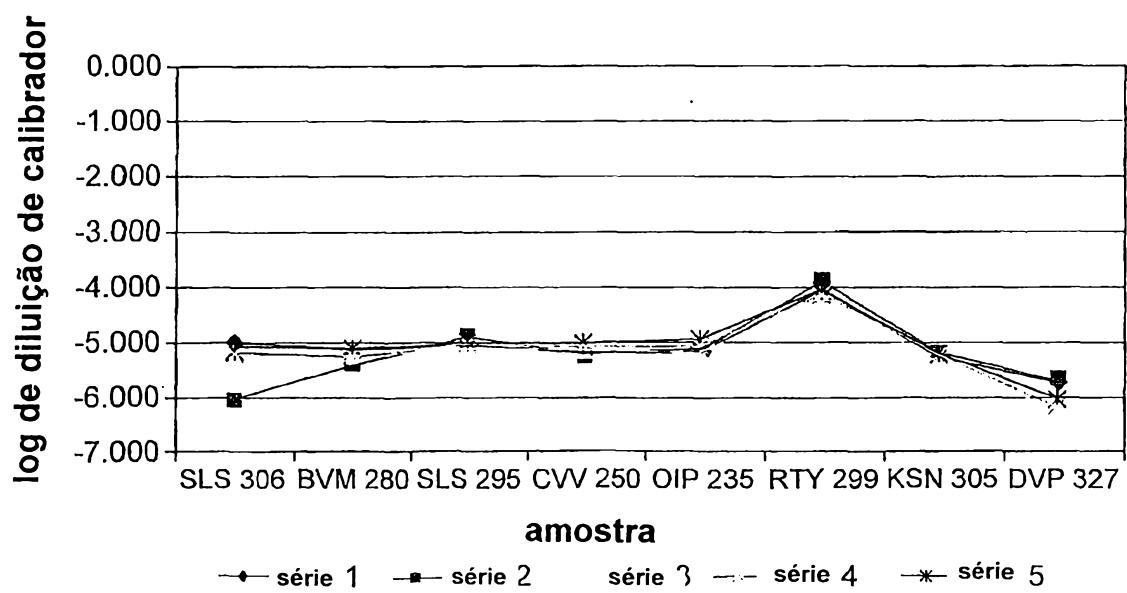


FIG. 14b

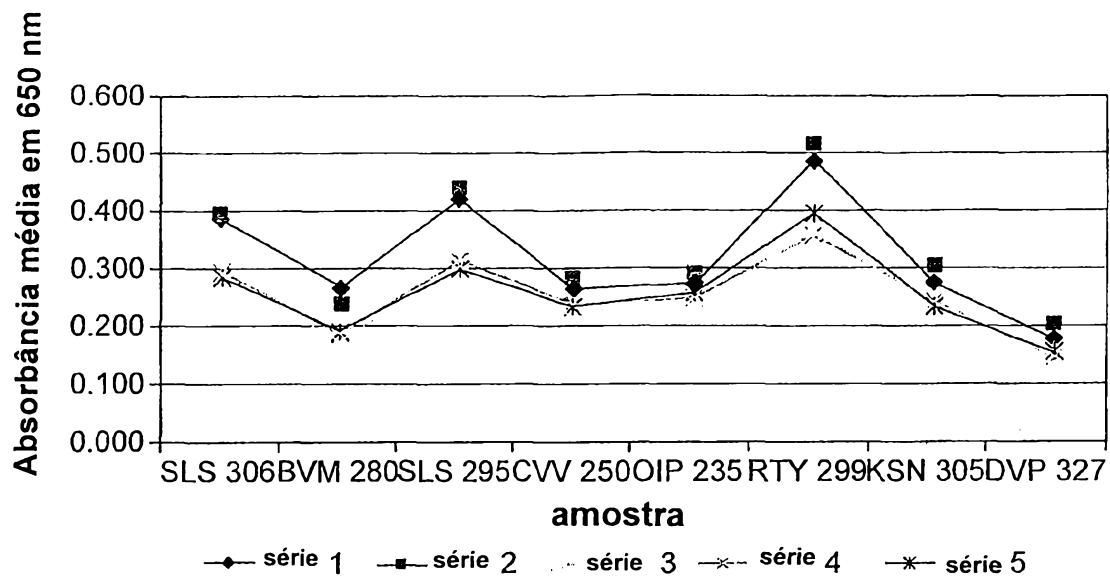


FIG. 15a

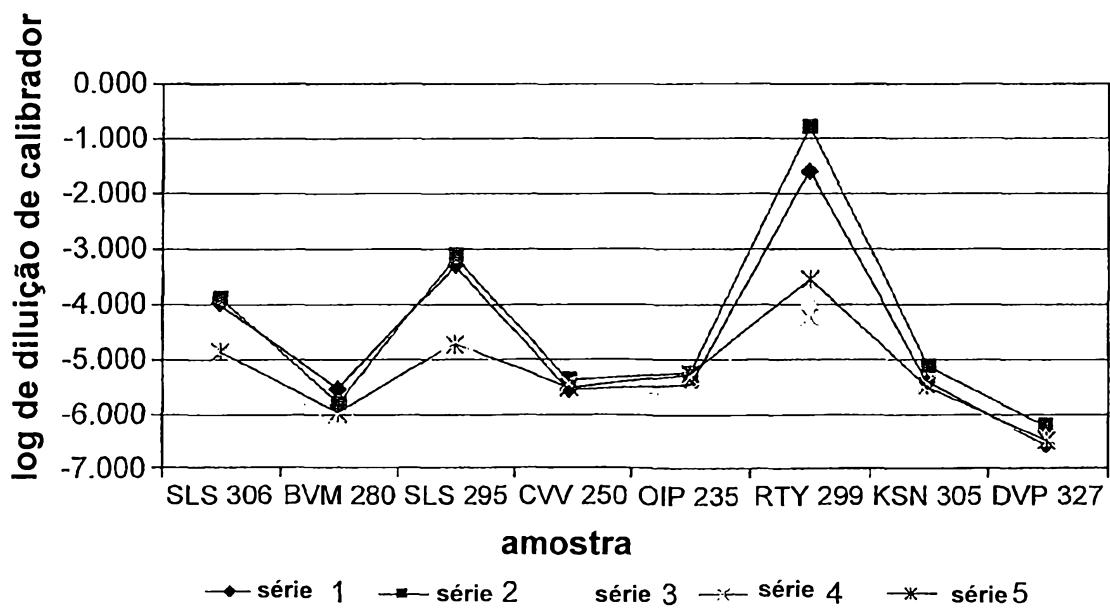


FIG. 15b

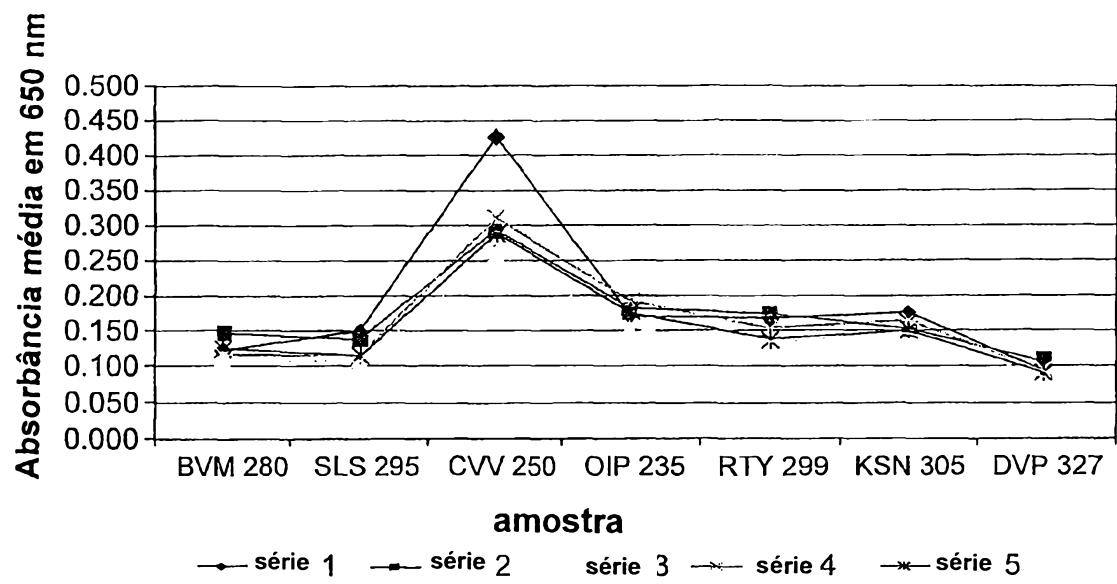


FIG. 16a

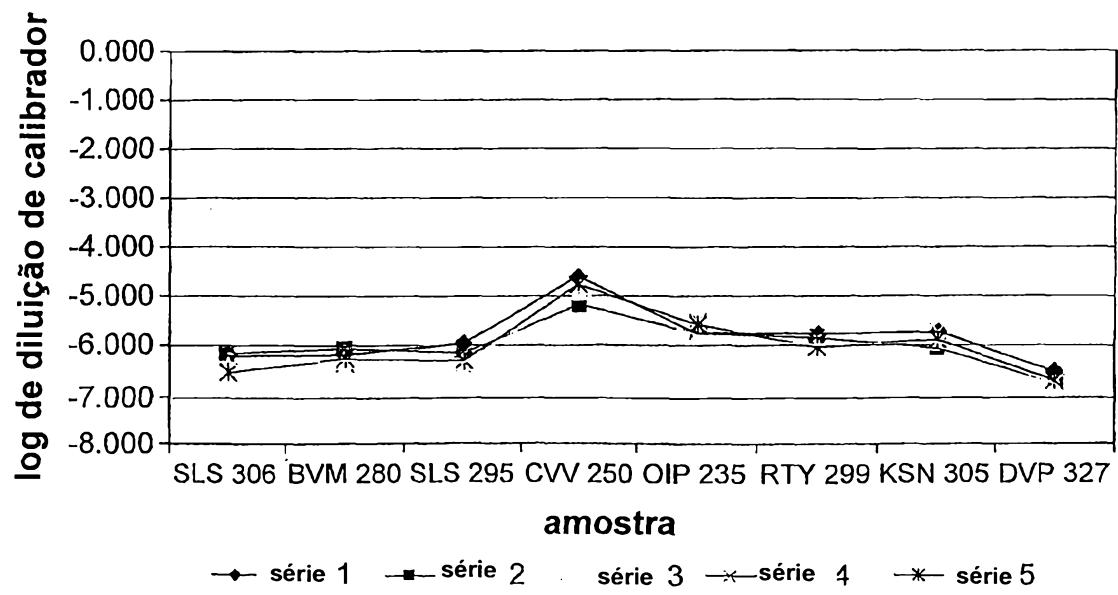


FIG. 16b

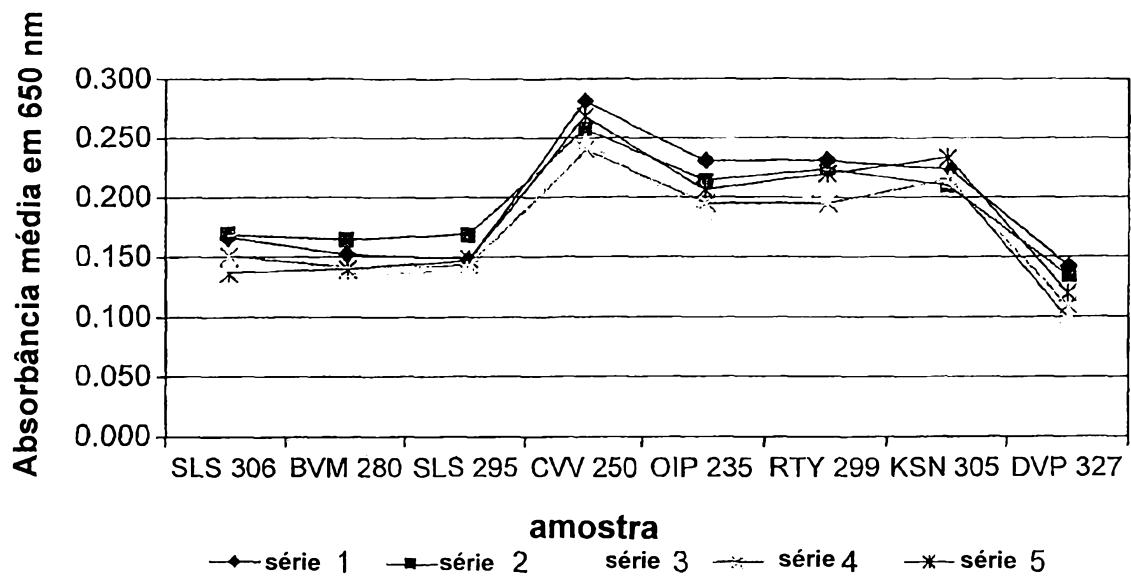


FIG. 17a

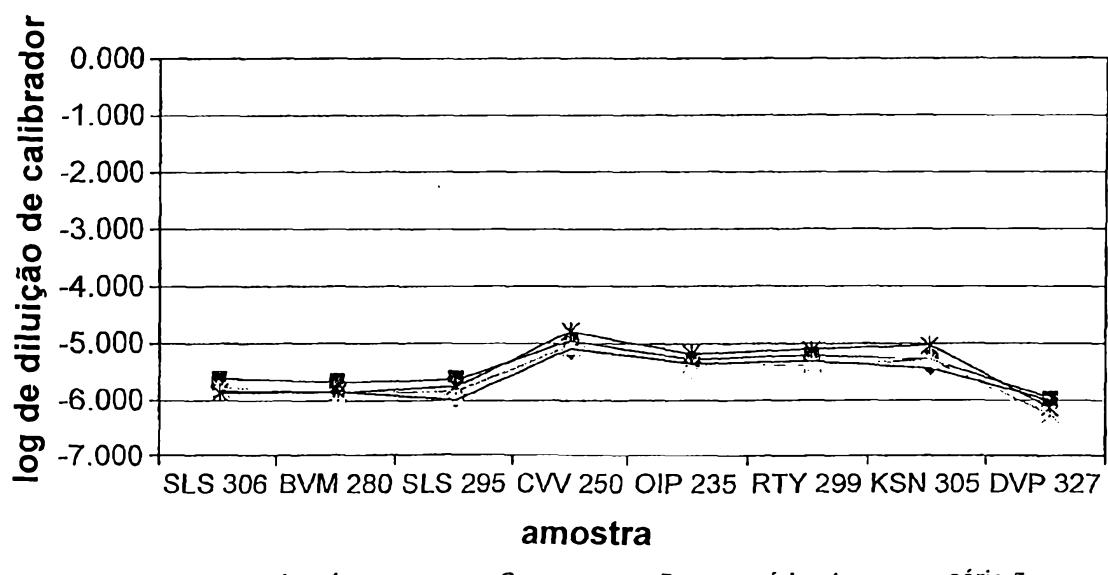


FIG. 17b

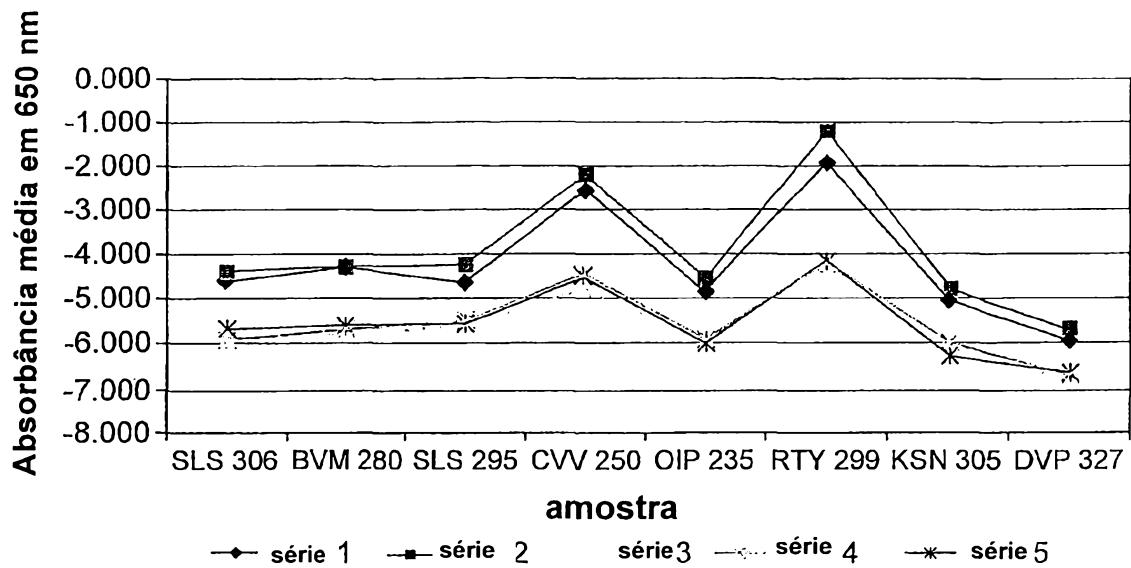


FIG. 18a

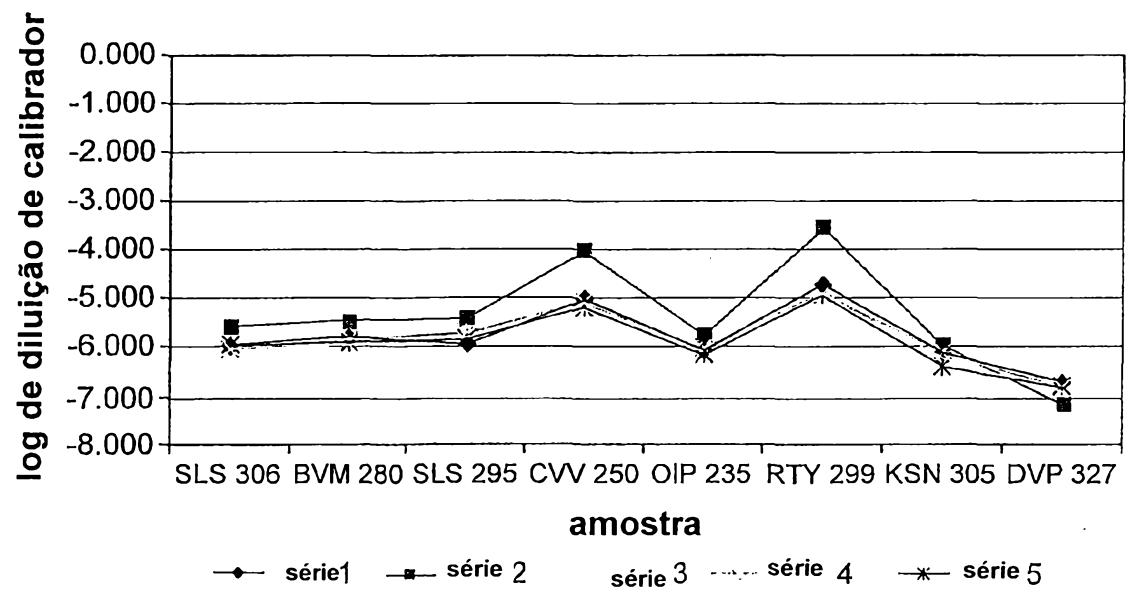


FIG. 18b

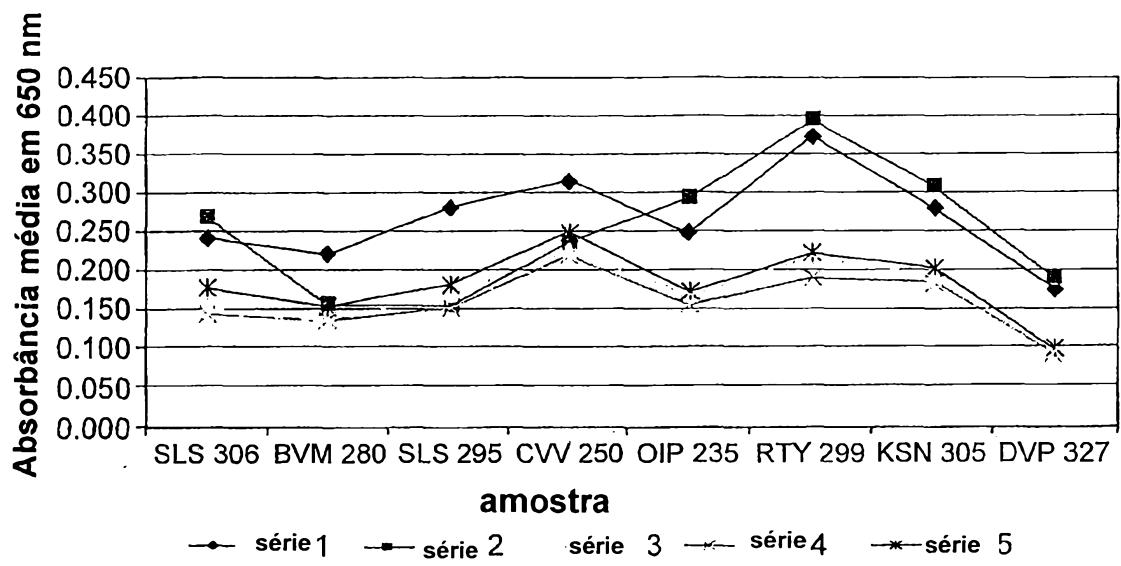


FIG. 19a

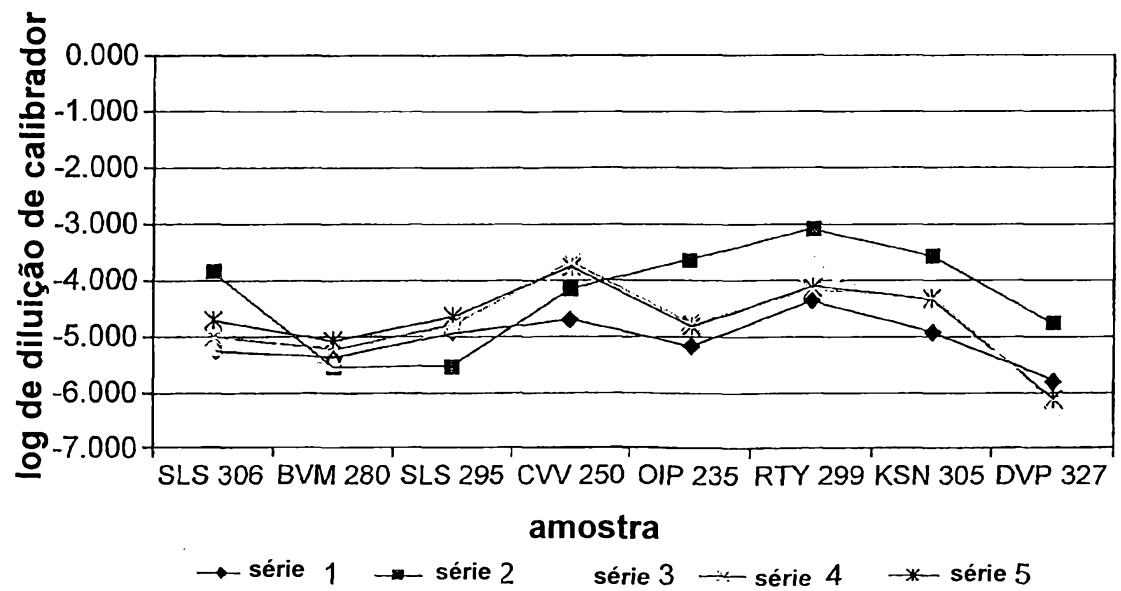


FIG. 19b

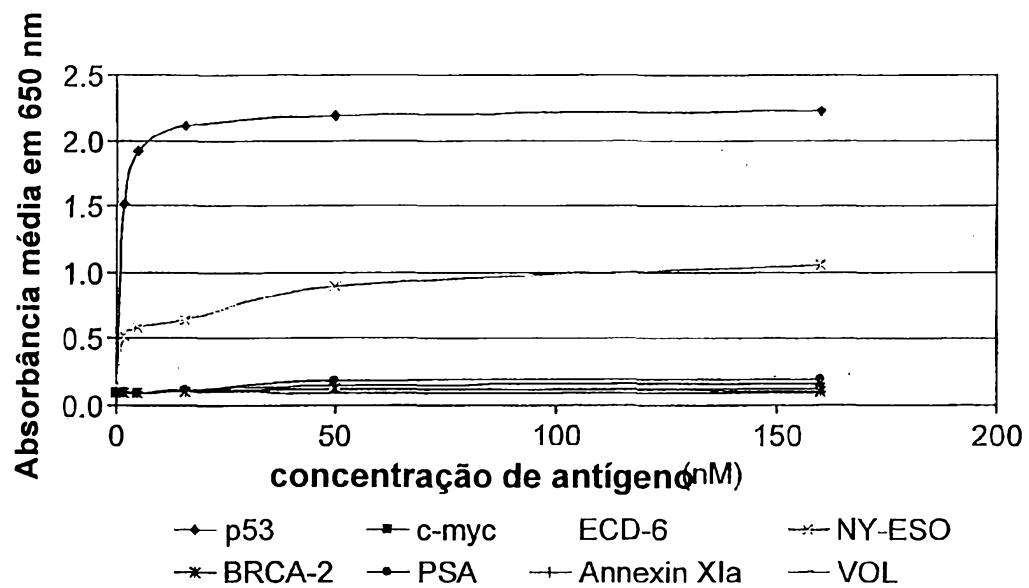


FIG. 20a

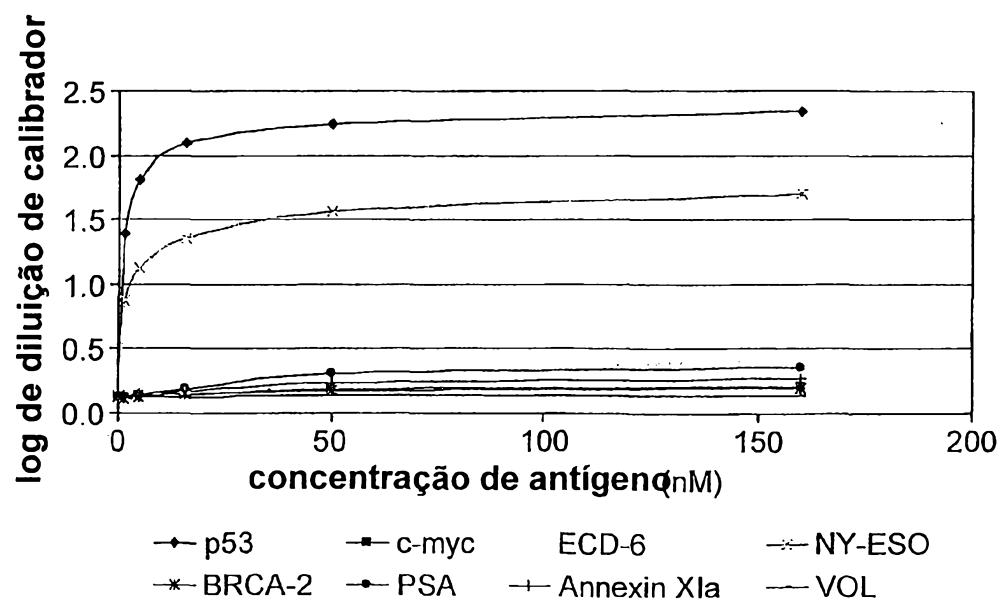


FIG. 20b

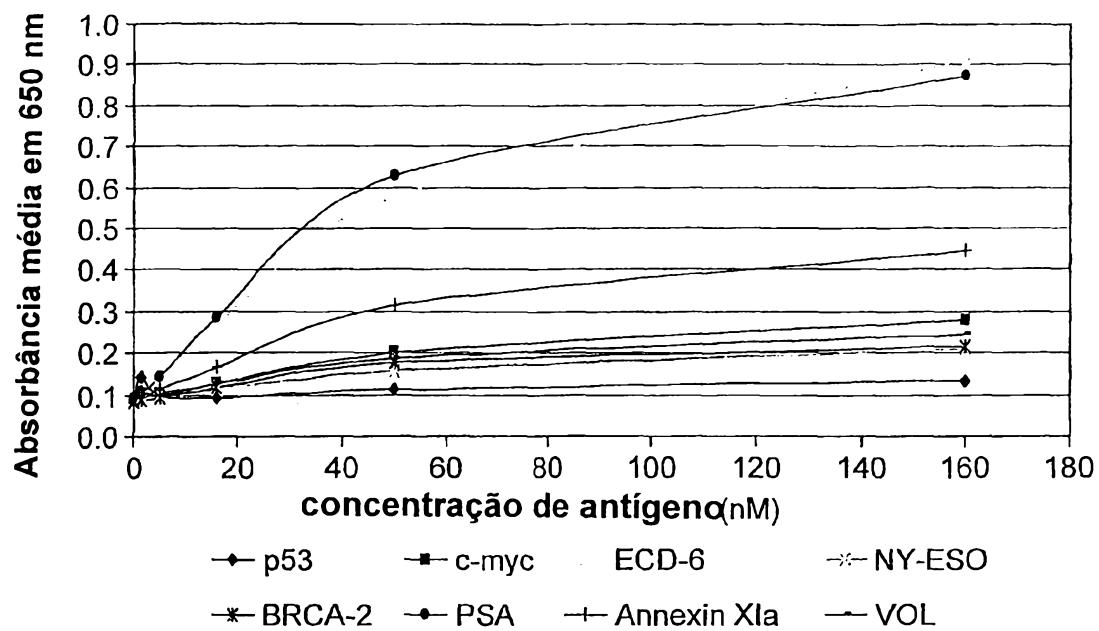


FIG. 21a

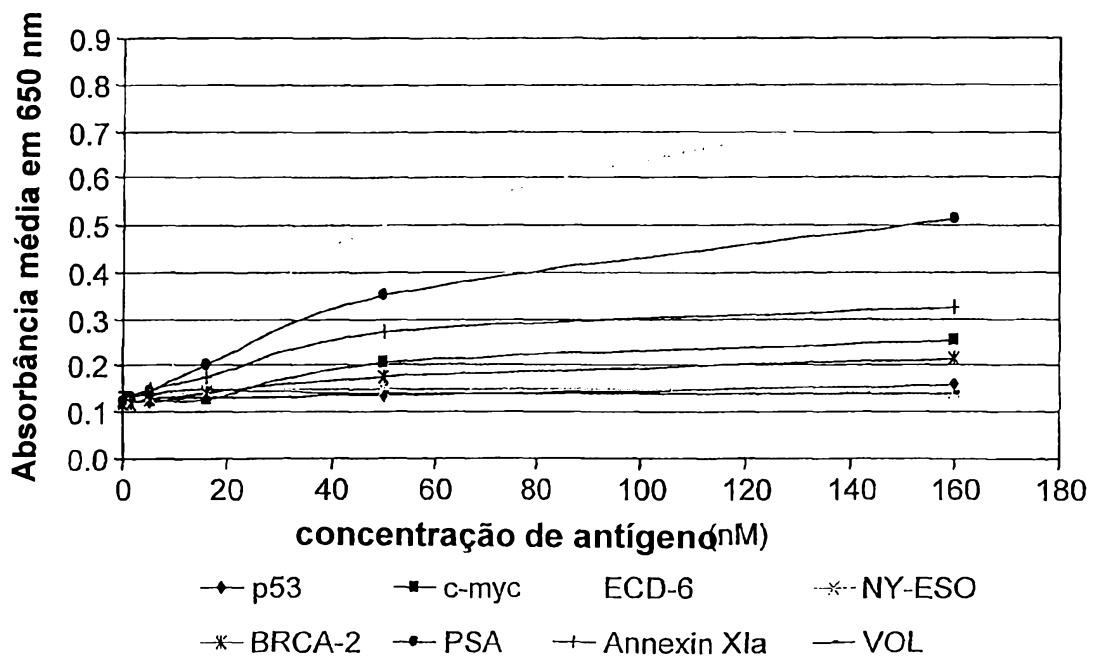


FIG. 21b

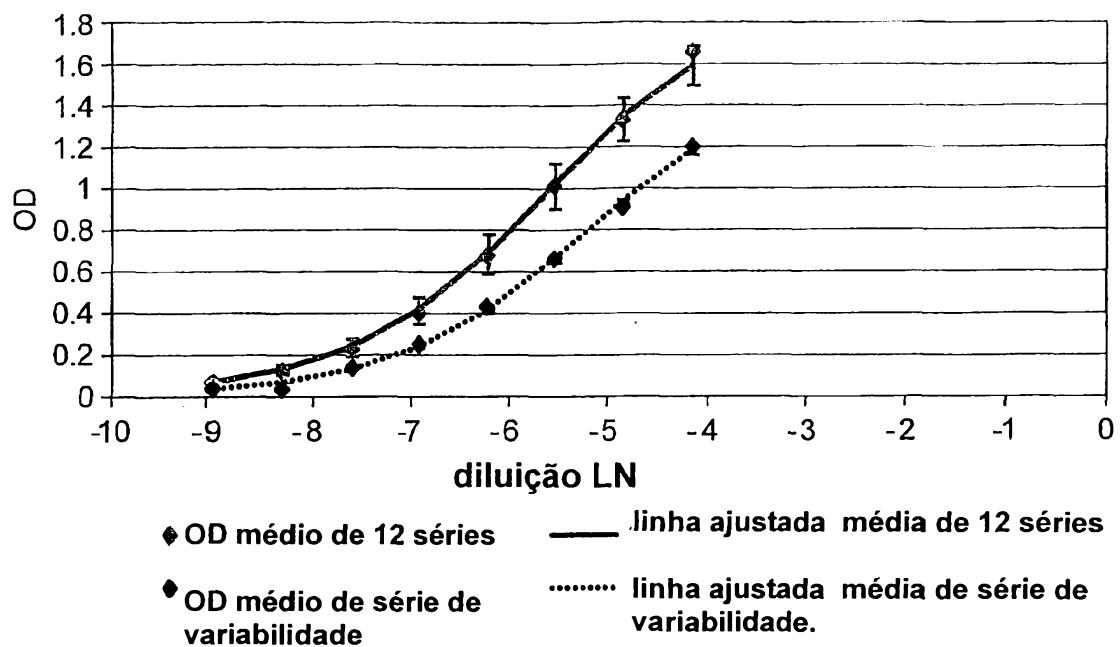


FIG. 22a

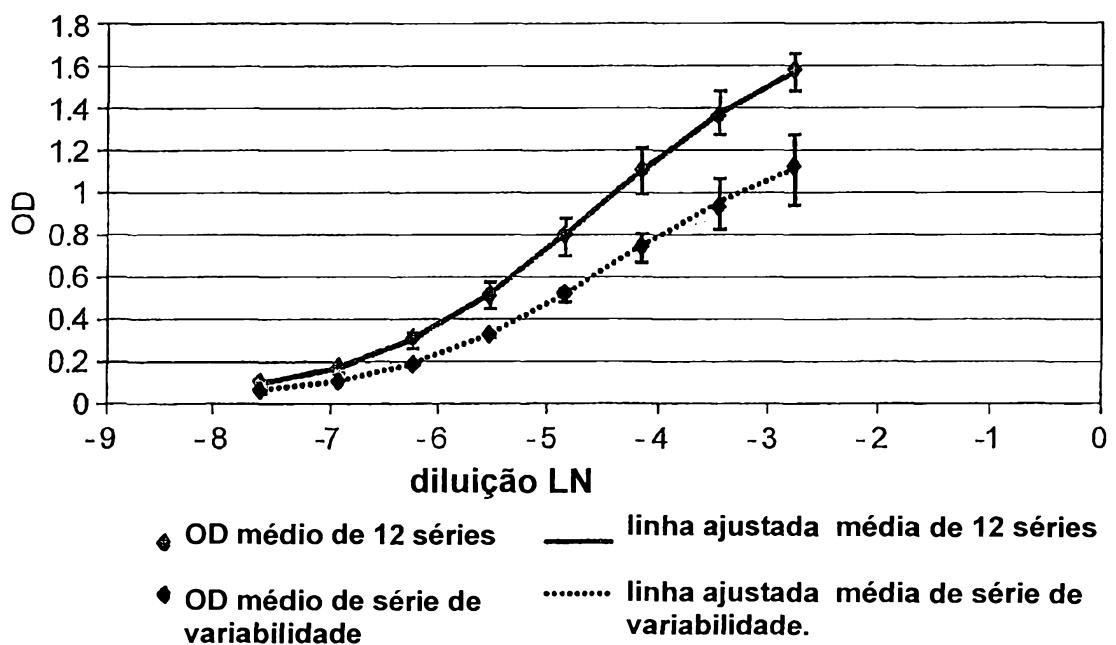


FIG. 22b

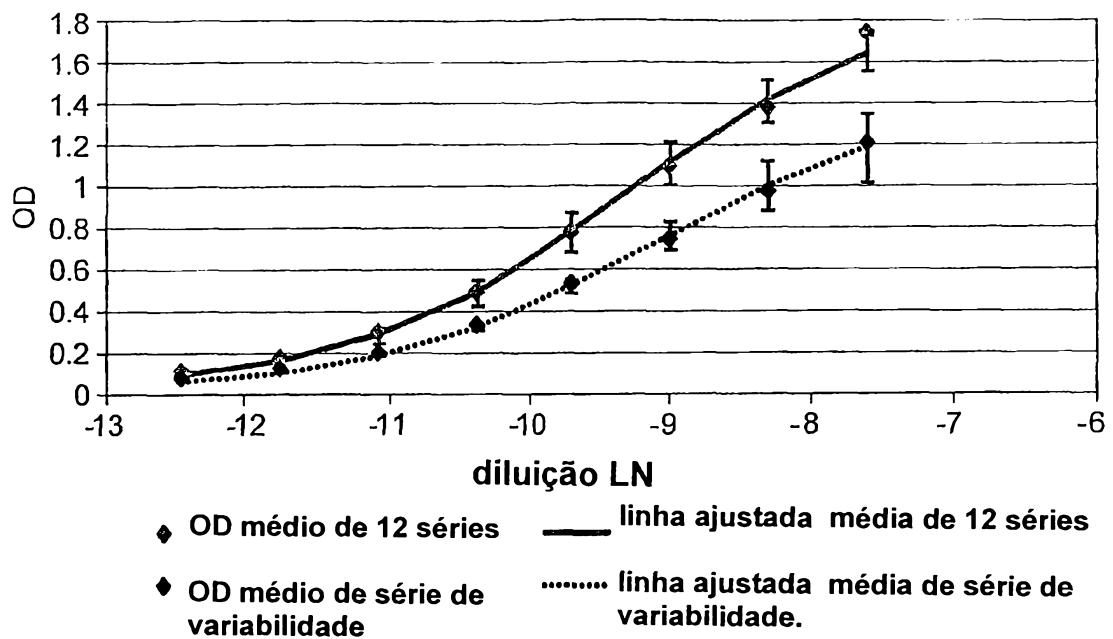


FIG. 22c

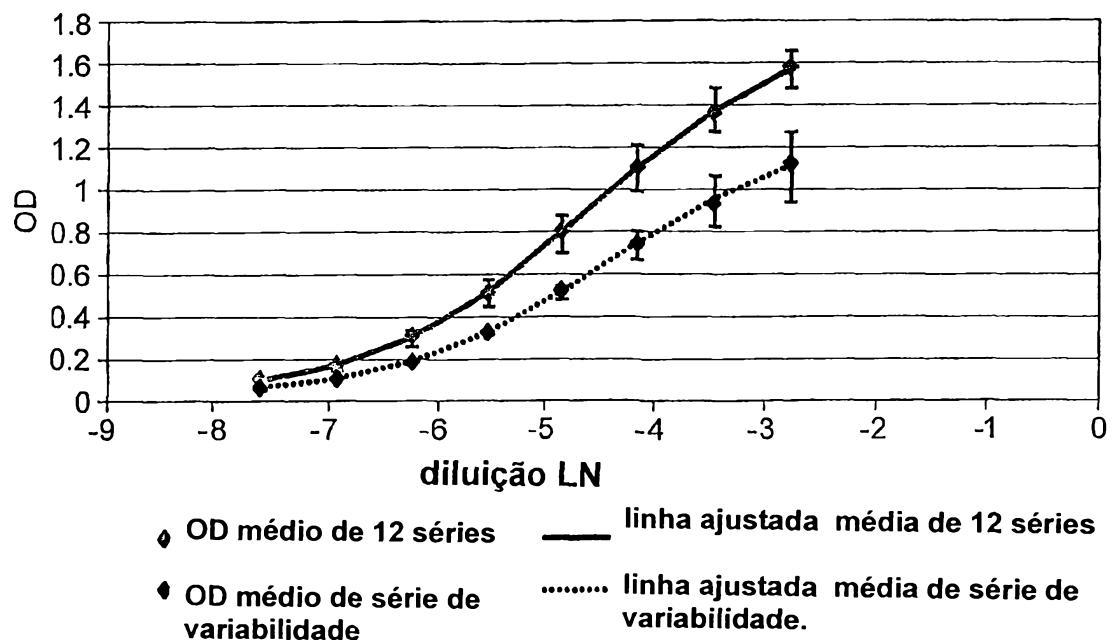


FIG. 22d

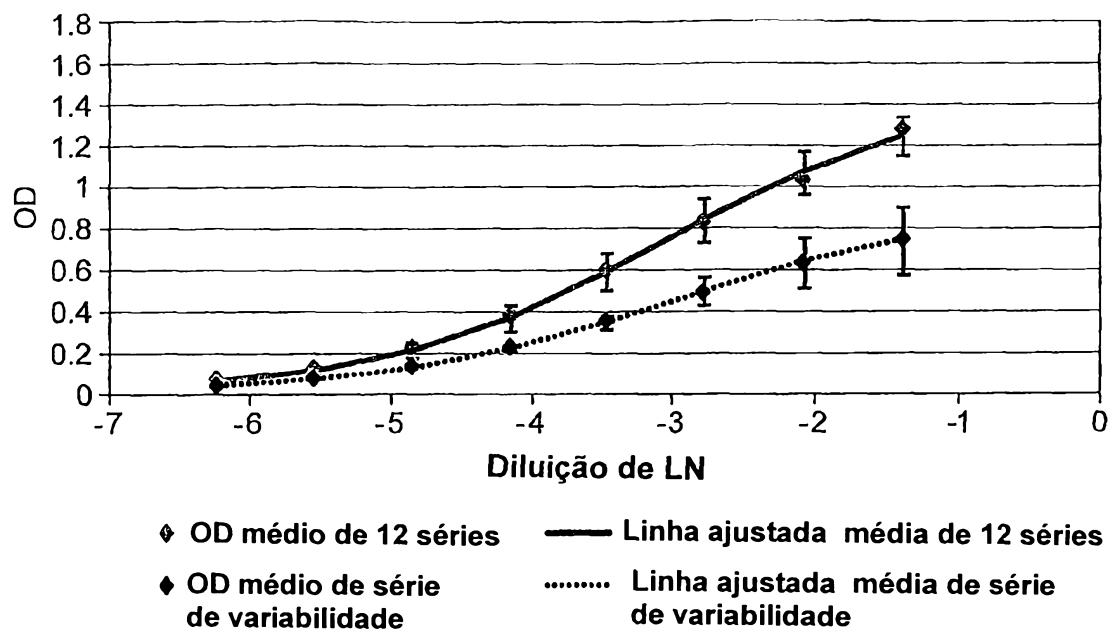


FIG. 22e

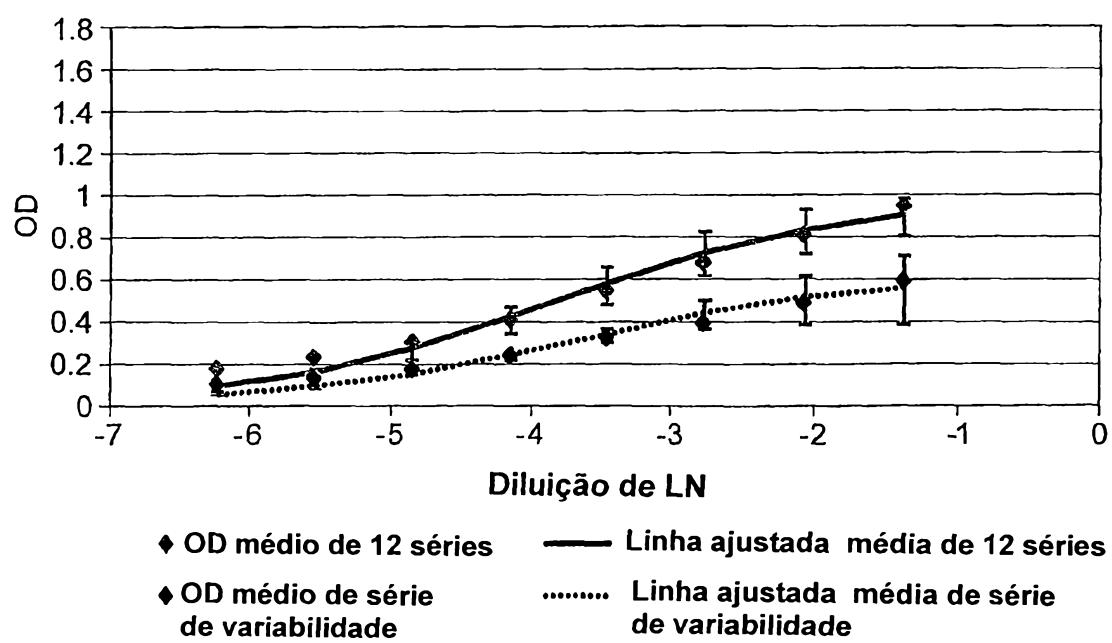


FIG. 22f

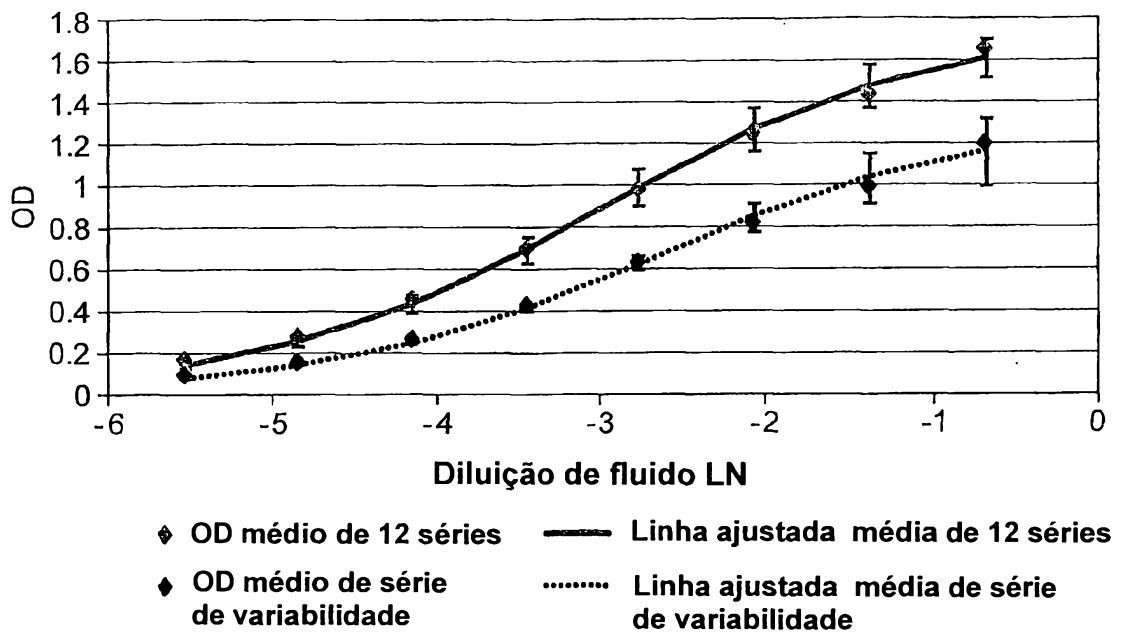


FIG. 22g

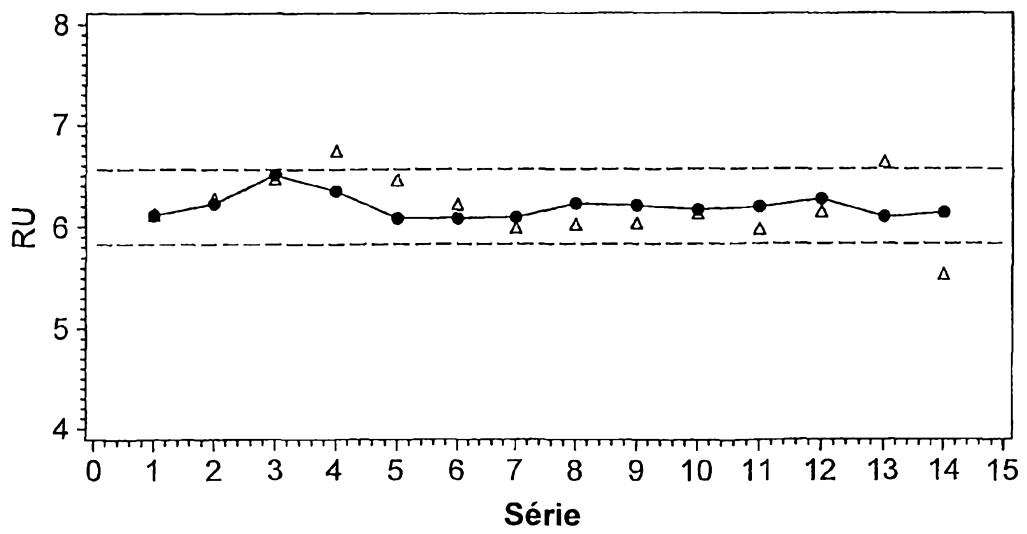


FIG. 23a

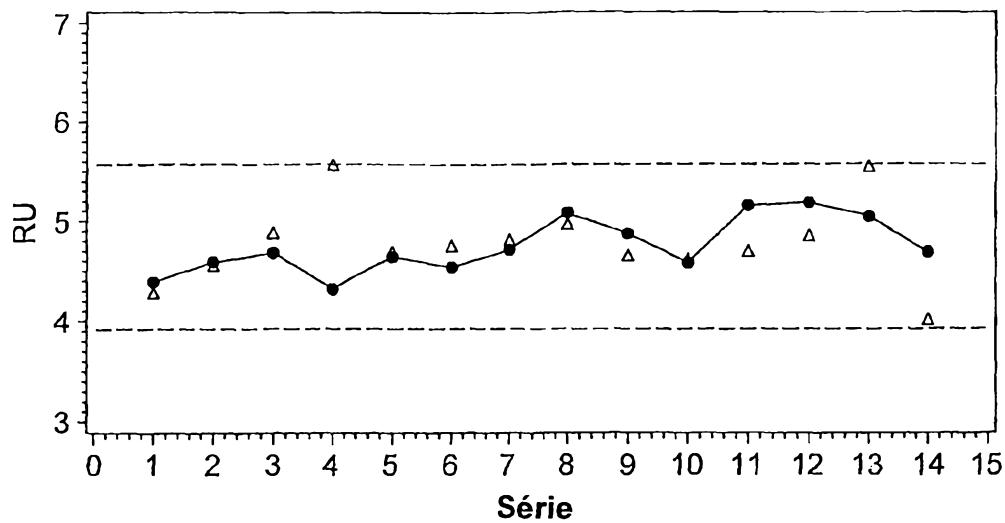


FIG. 23b

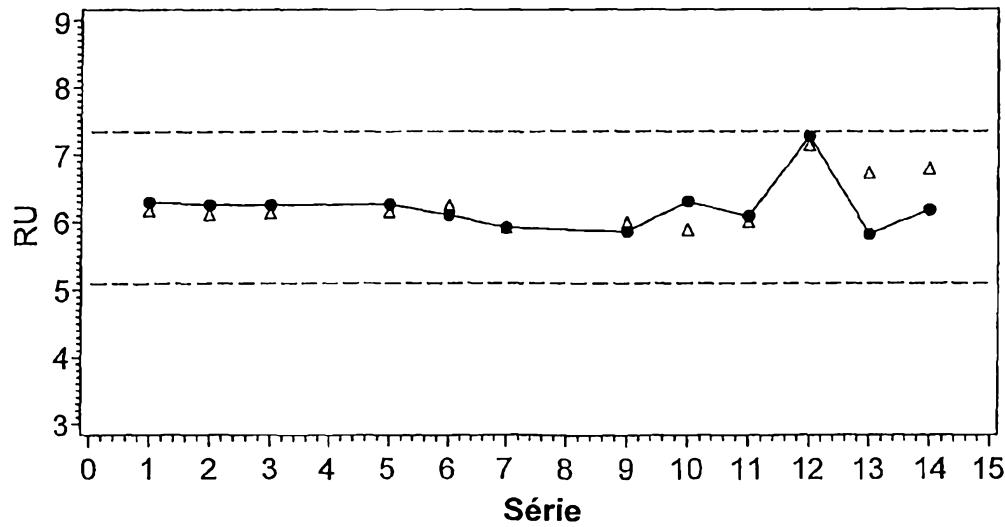


FIG. 23c

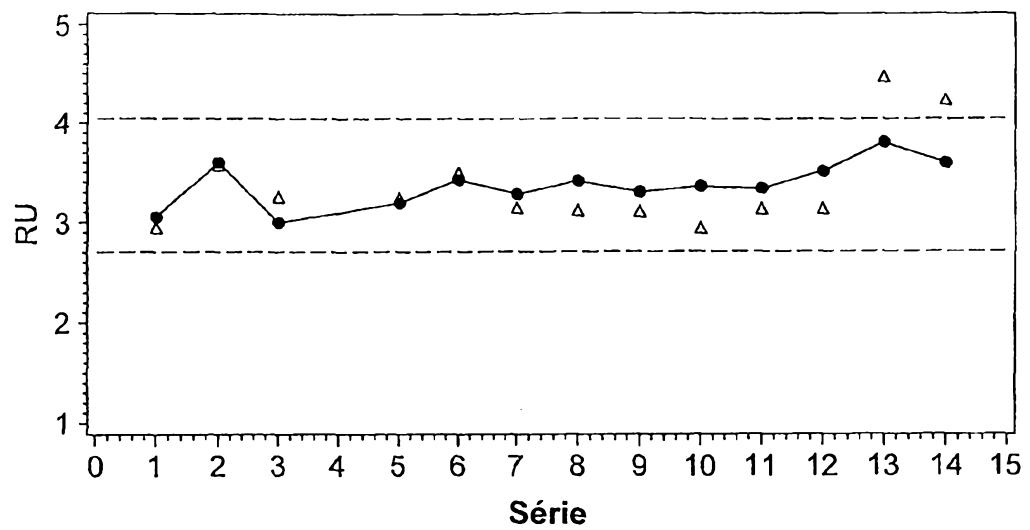


FIG. 23d

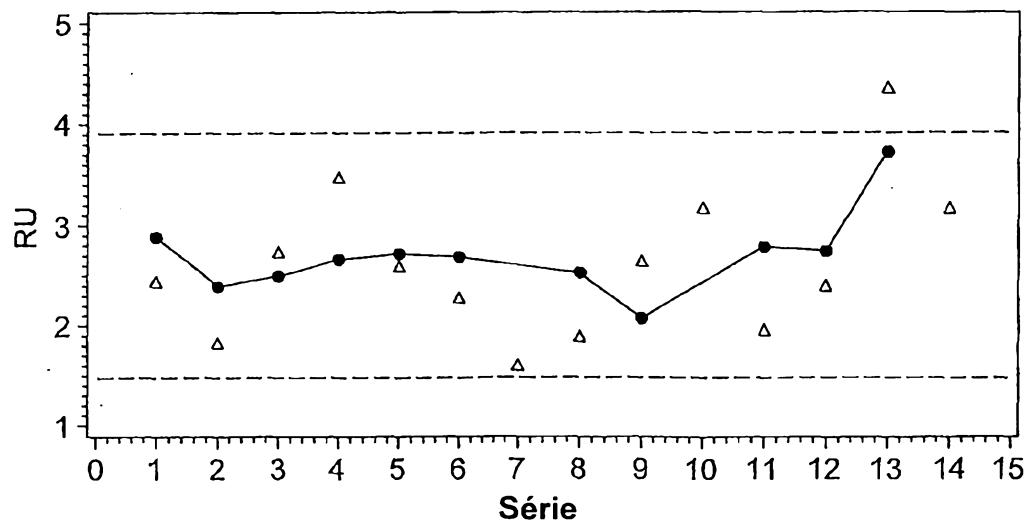


FIG. 23e

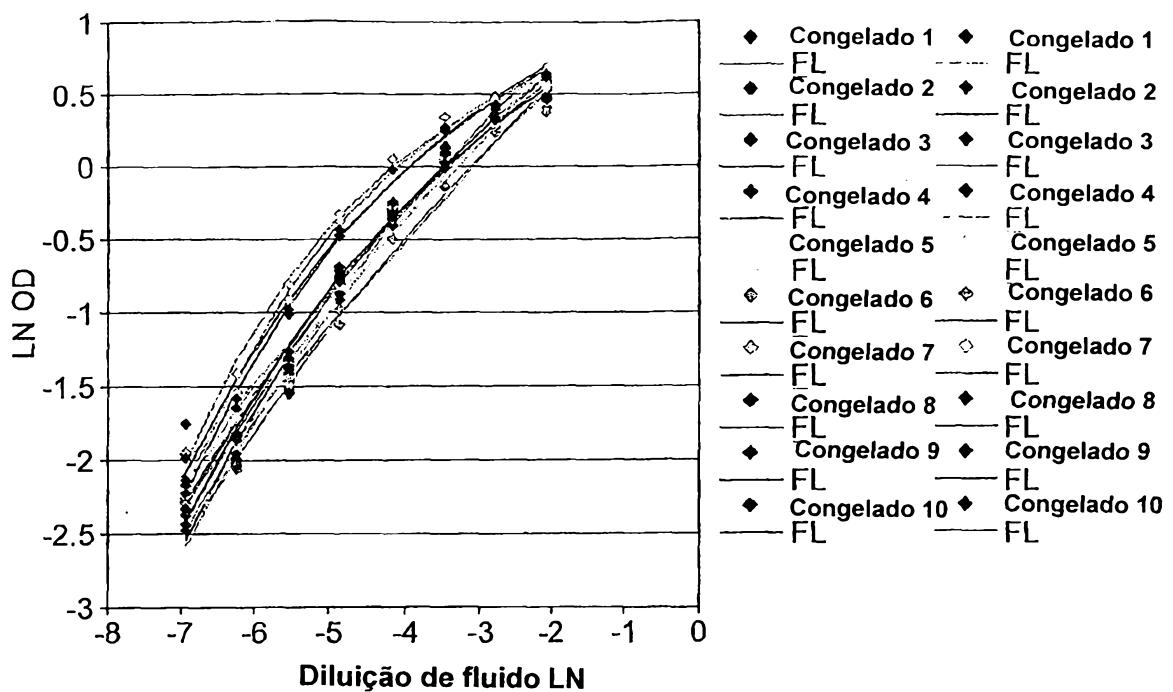


FIG. 24a

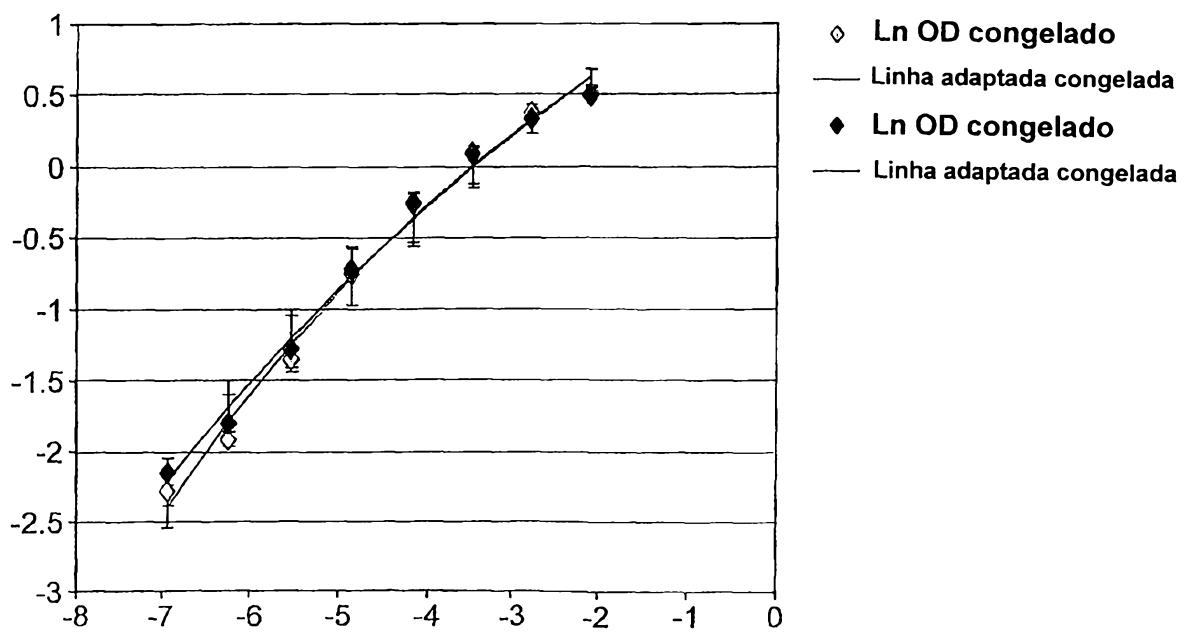


FIG. 24b

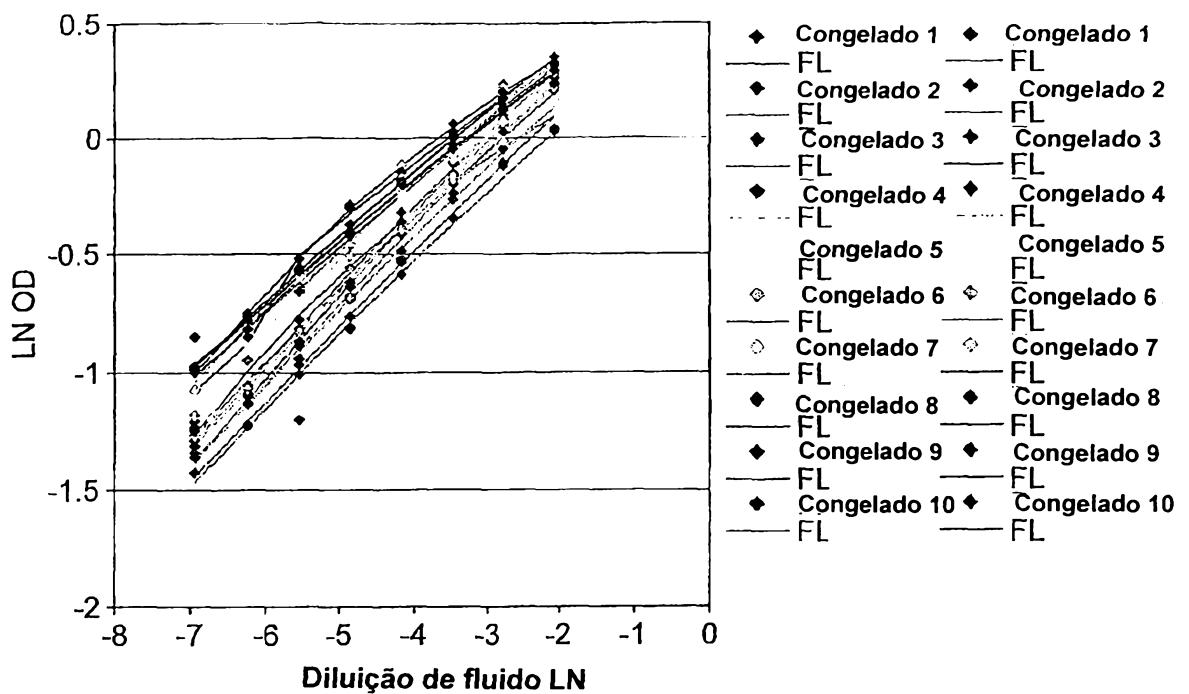


FIG. 25a

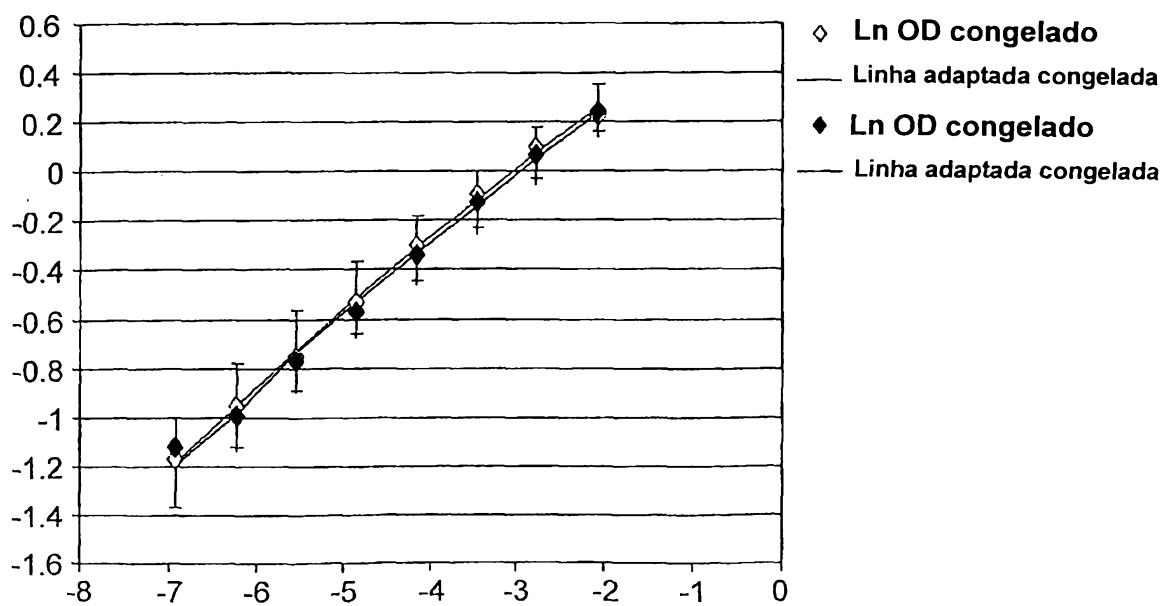


FIG. 25b

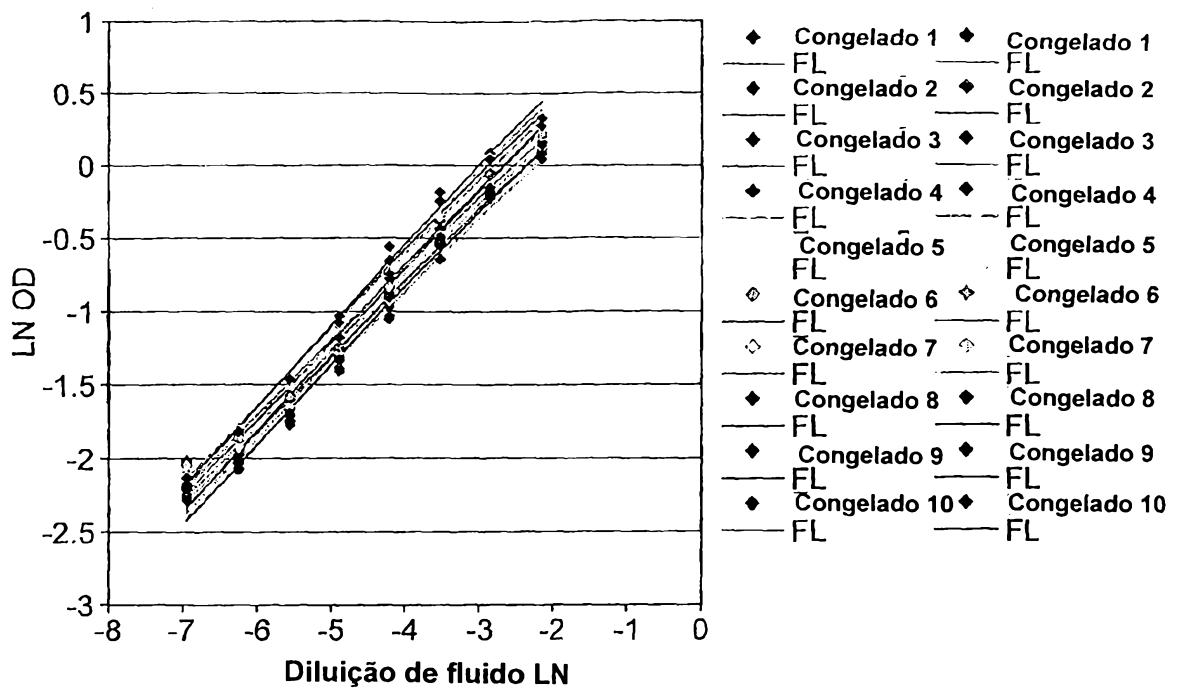


FIG. 26a

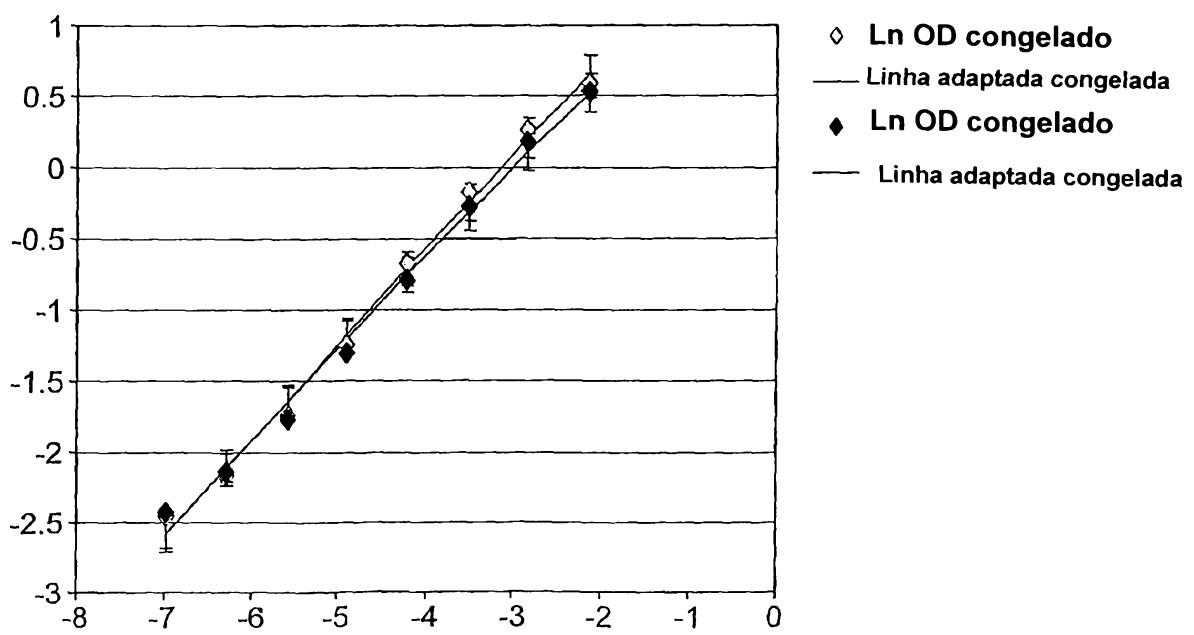


FIG. 26b

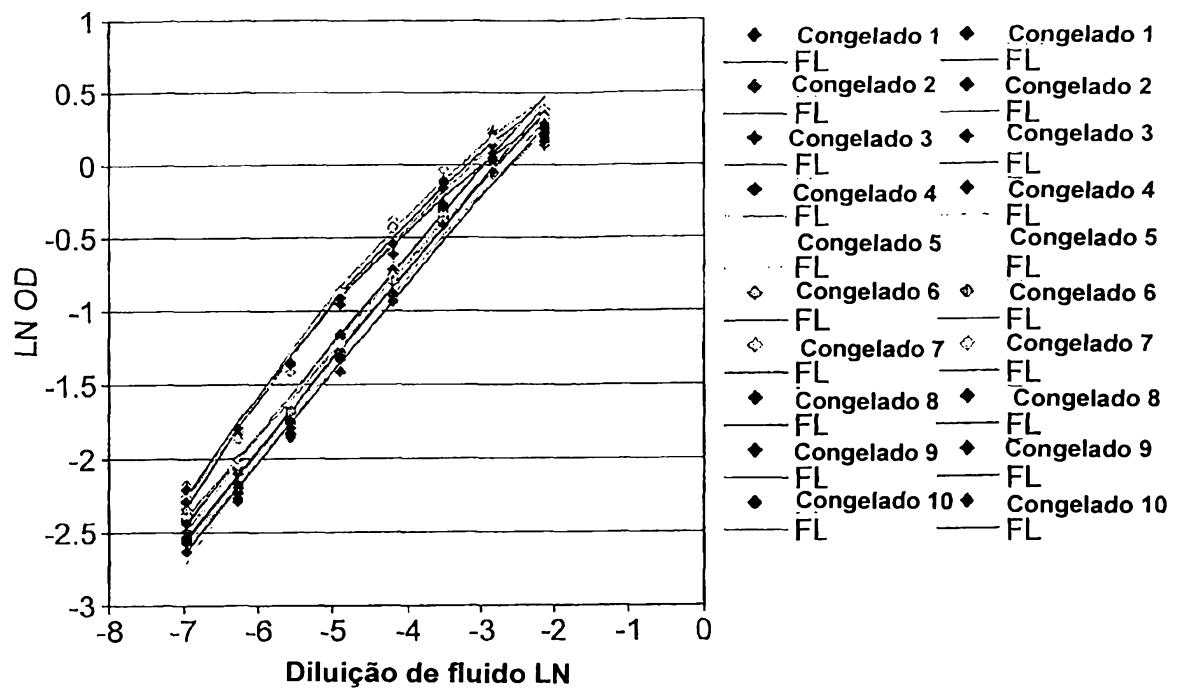


FIG. 27a

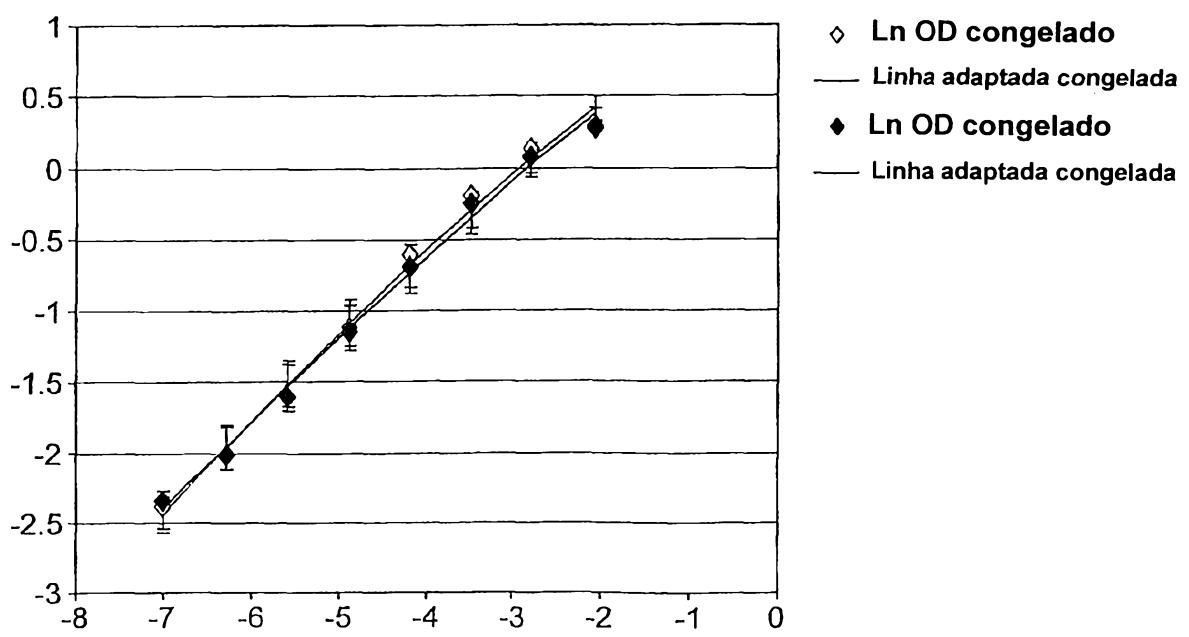


FIG. 27b

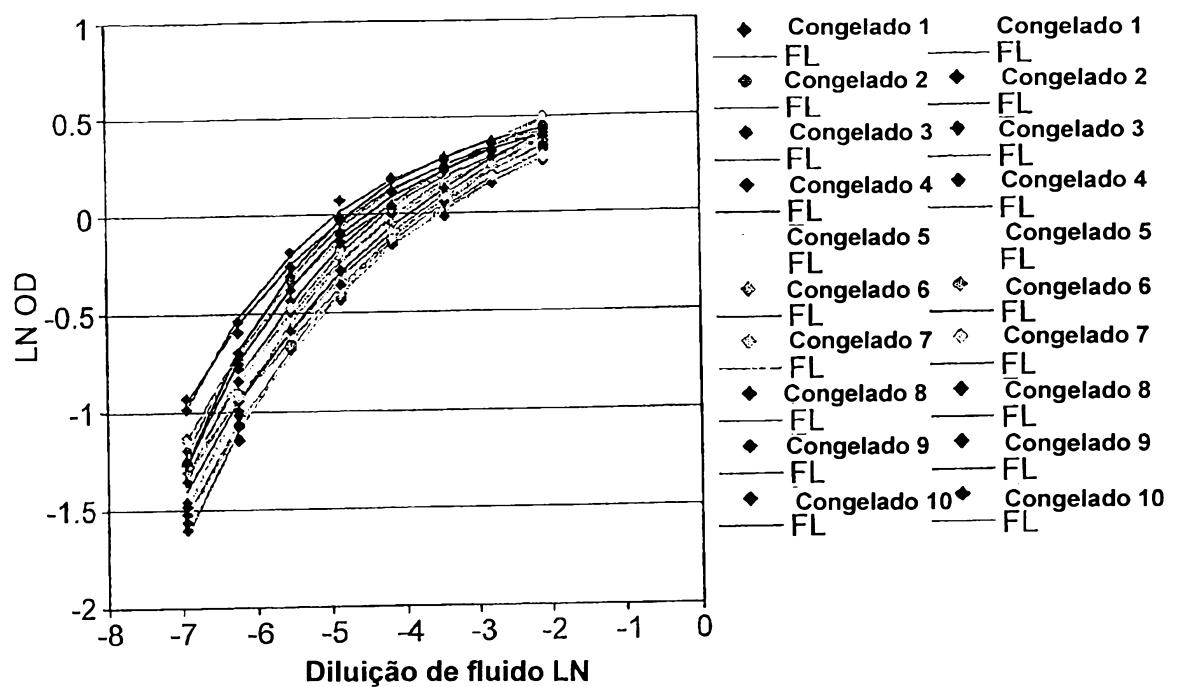


FIG. 28a

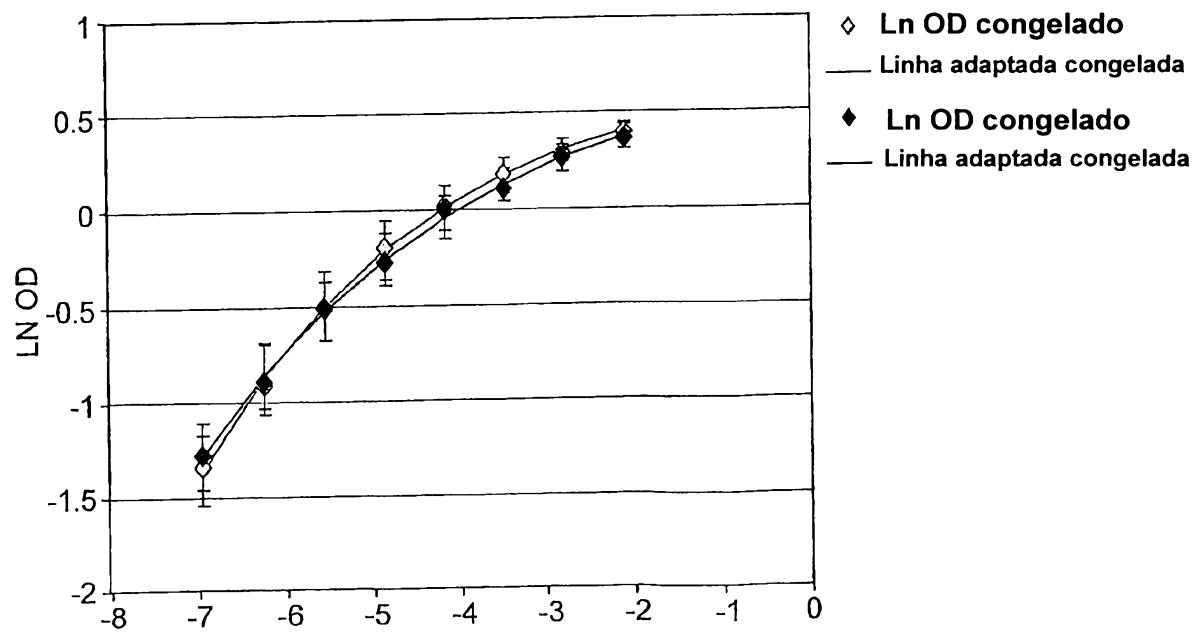


FIG. 28b

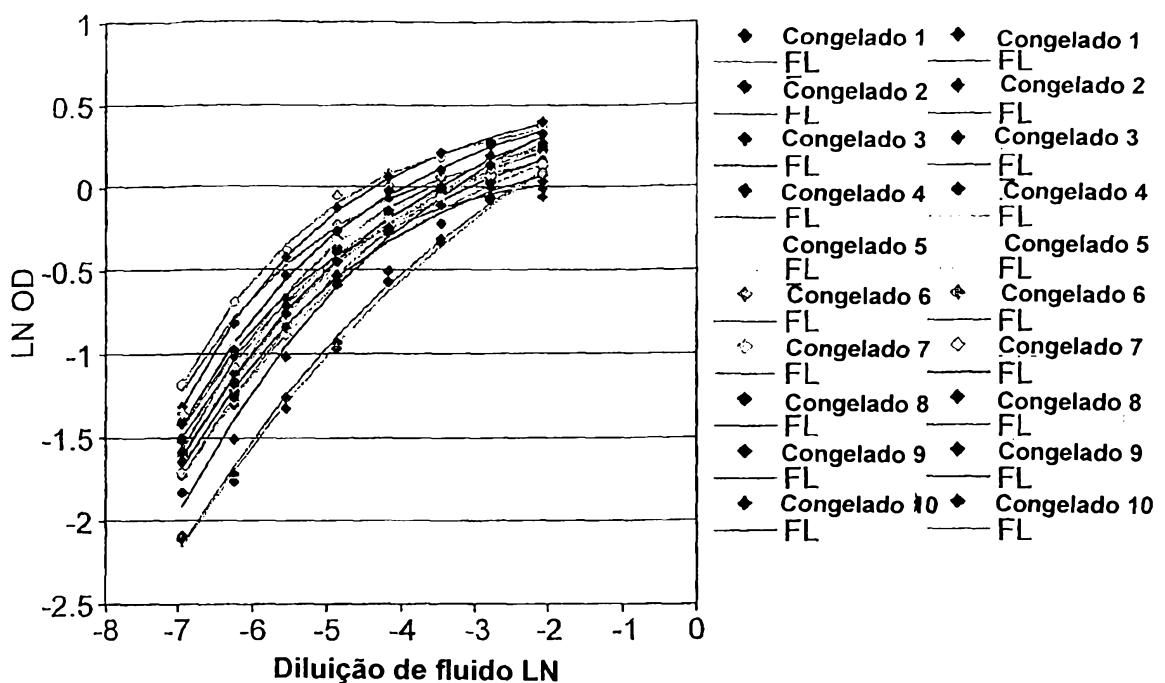


FIG. 29a

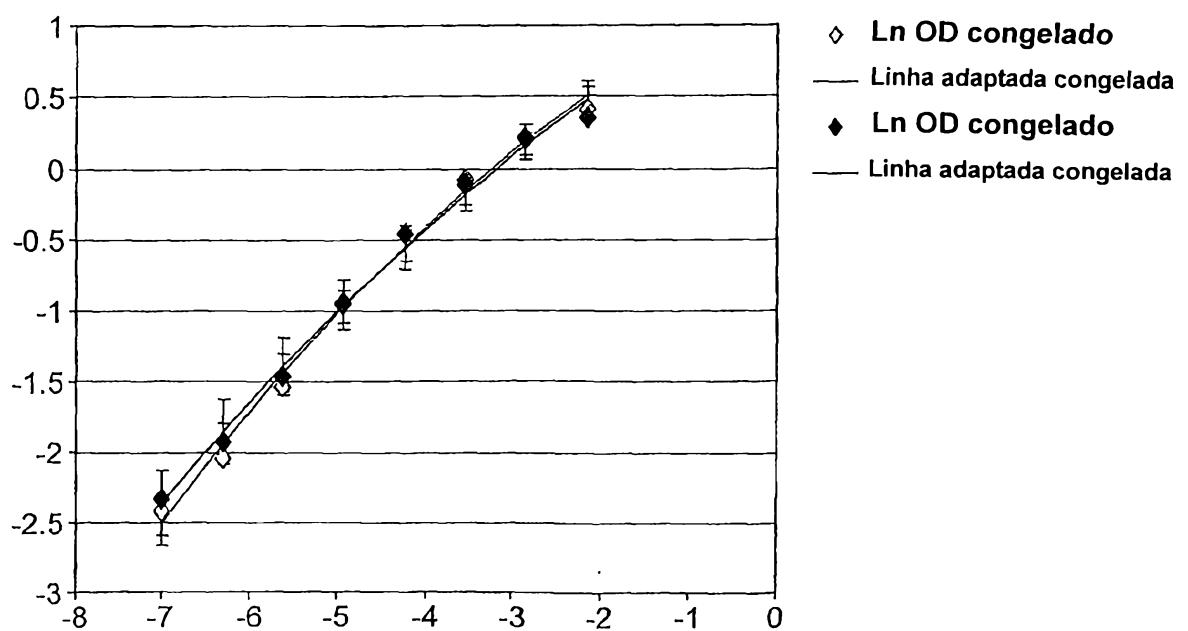


FIG. 29b

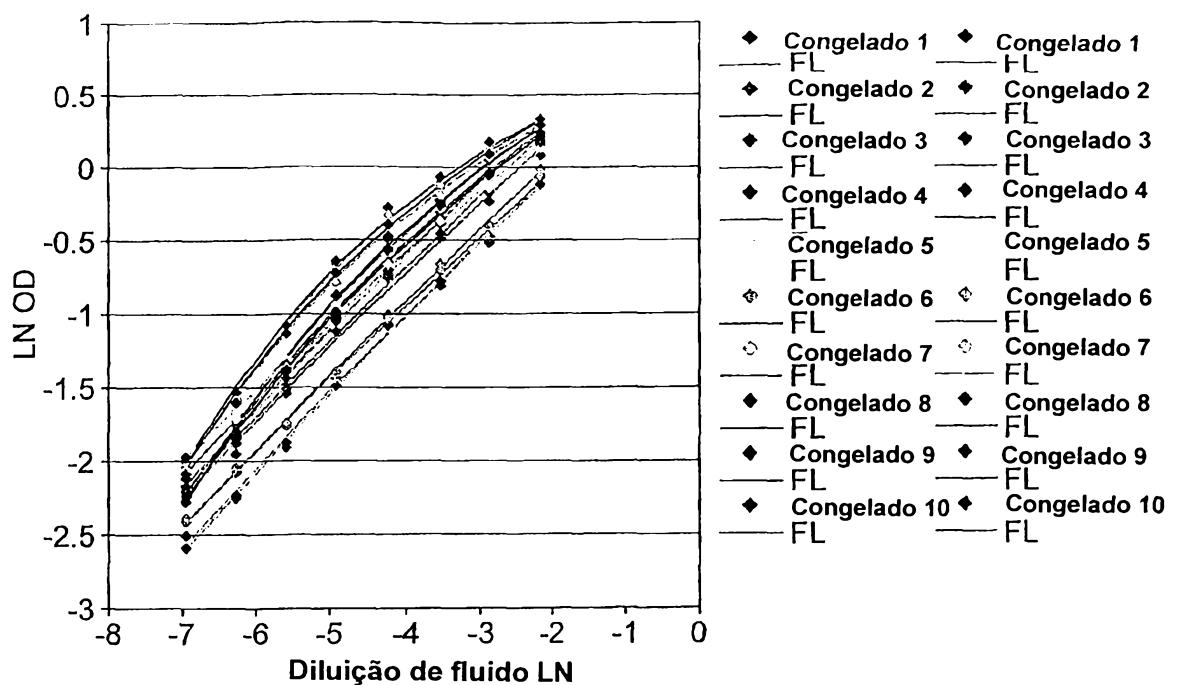


FIG. 30a

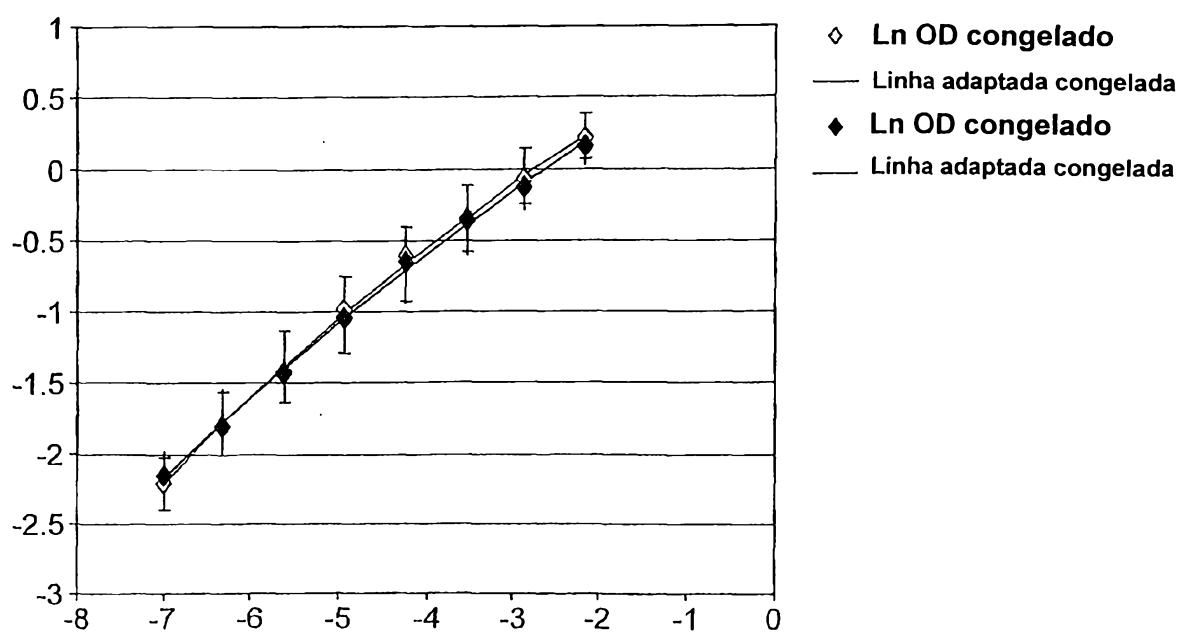


FIG. 30b

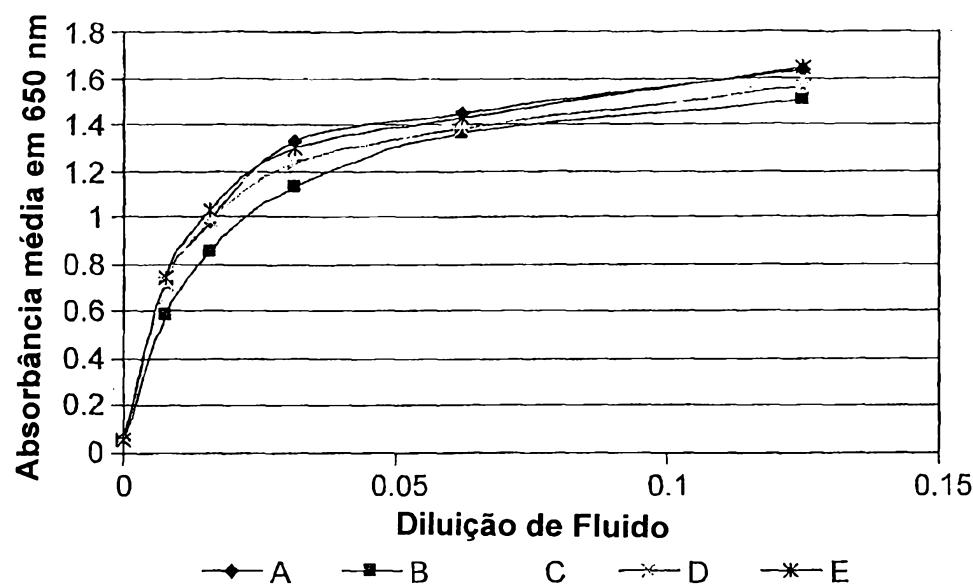


FIG. 31a

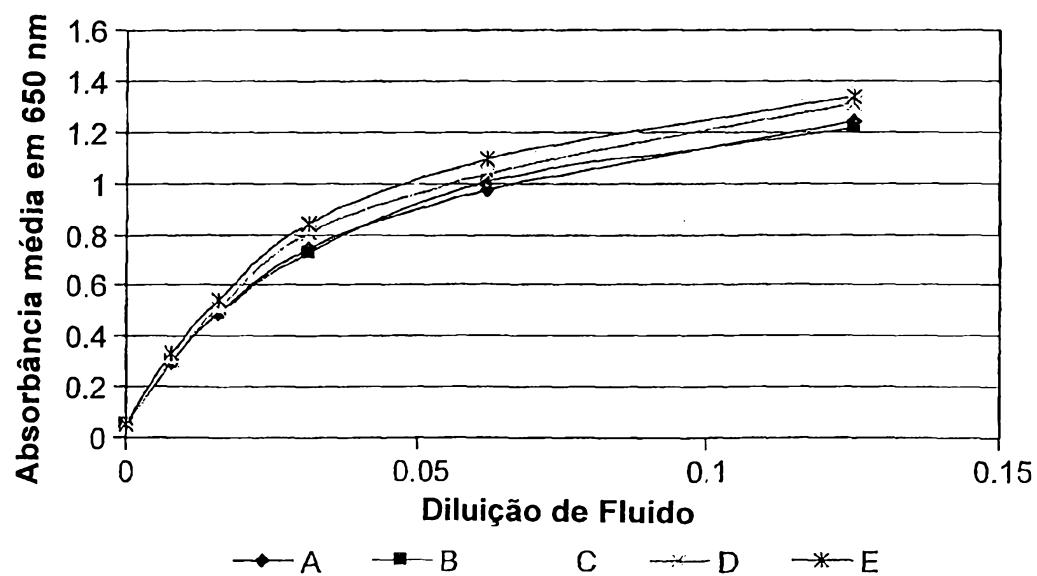


FIG. 31b

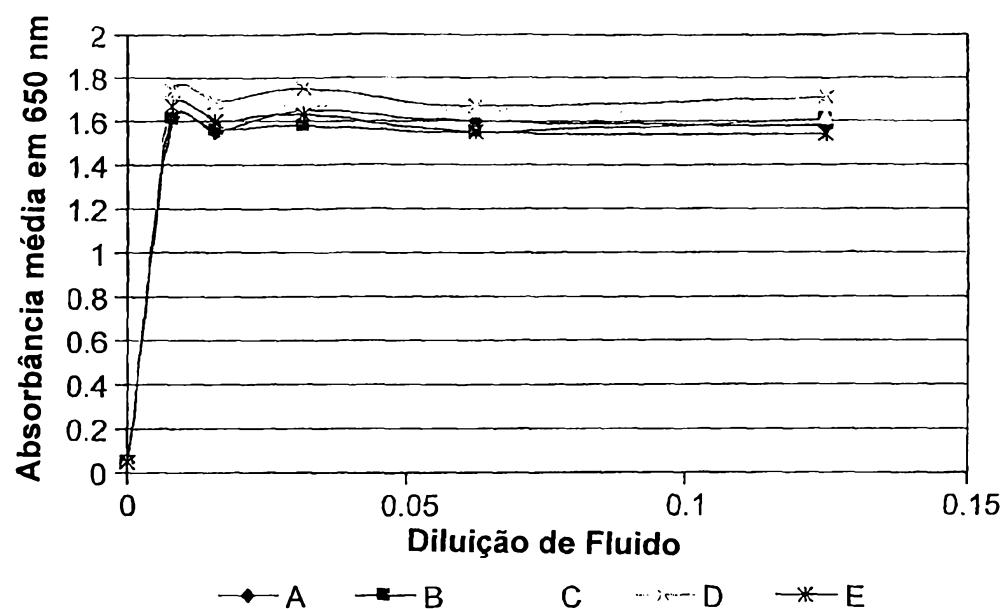


FIG. 31c

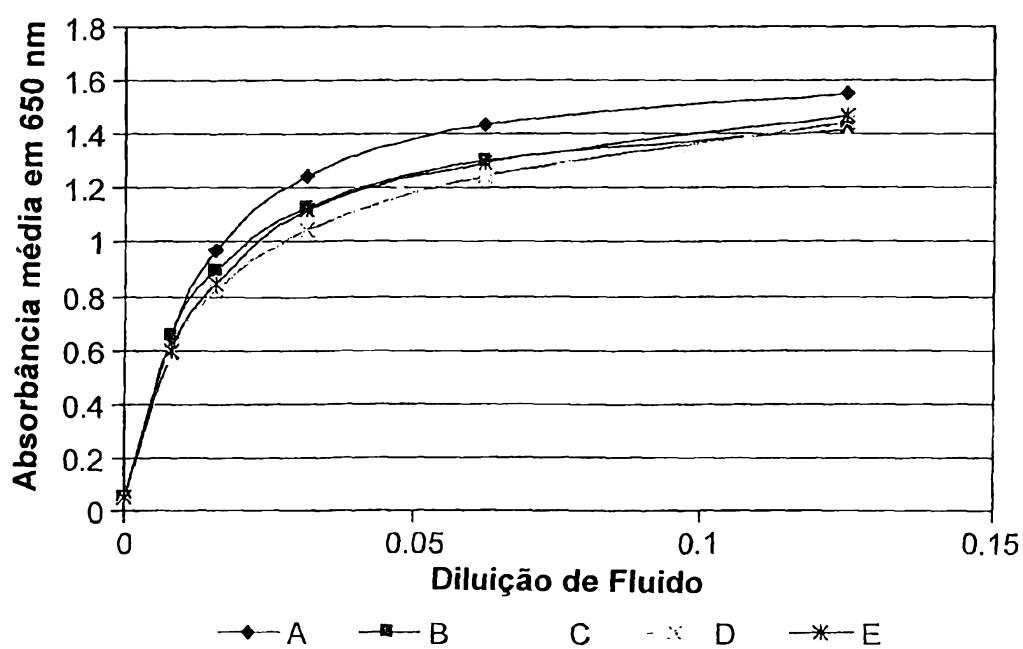


FIG. 31d

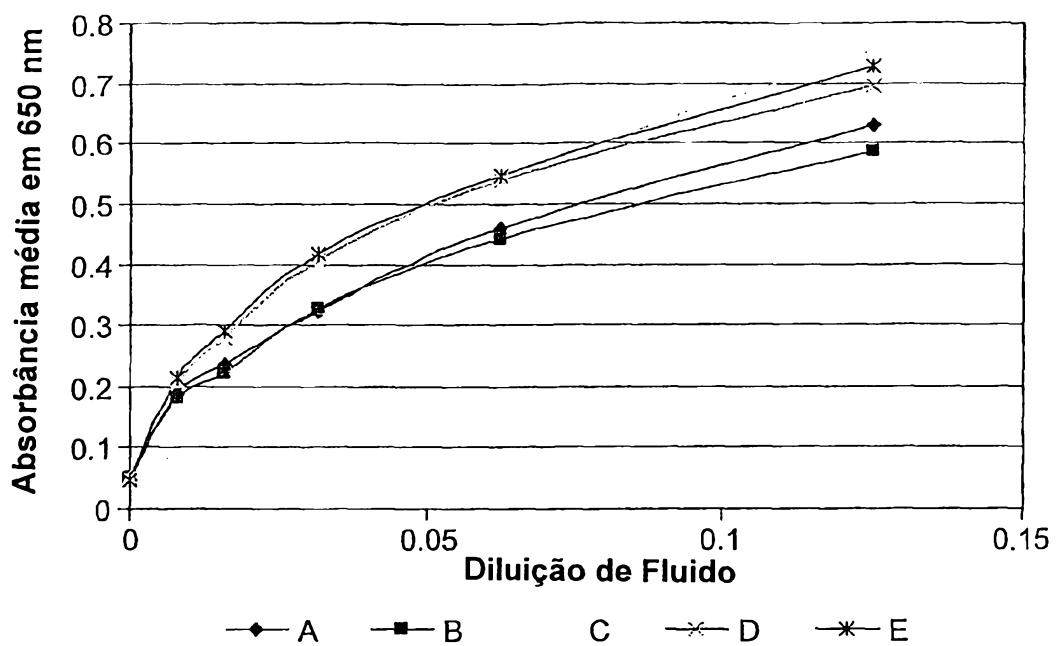


FIG. 31e

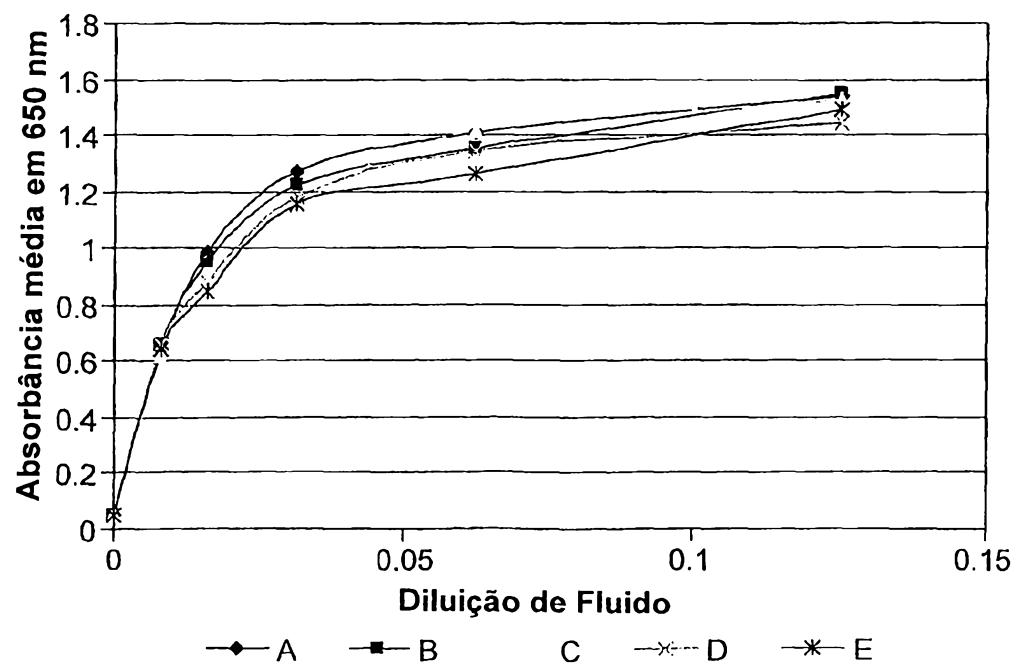


FIG. 31f

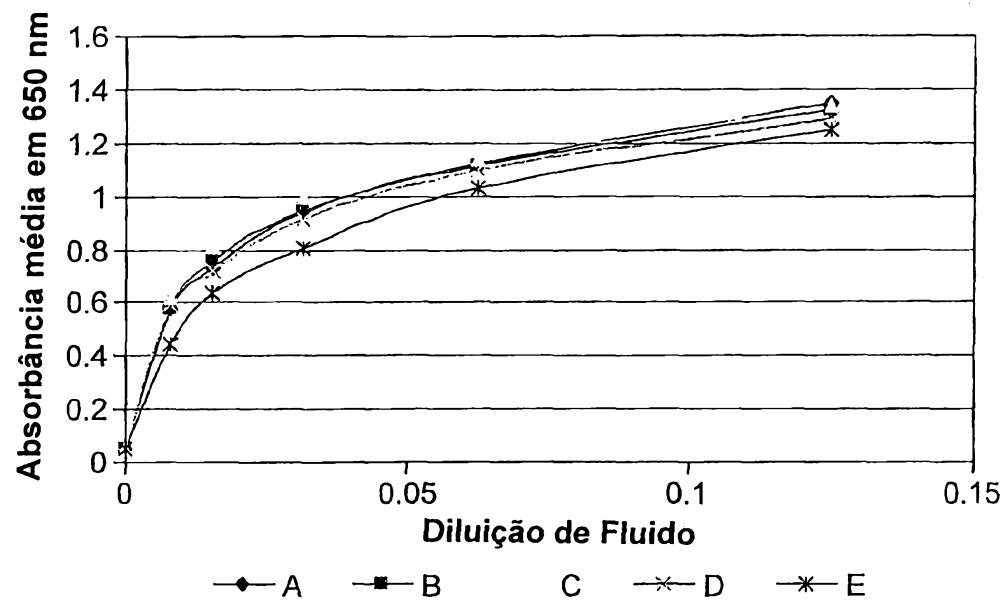


FIG. 31g

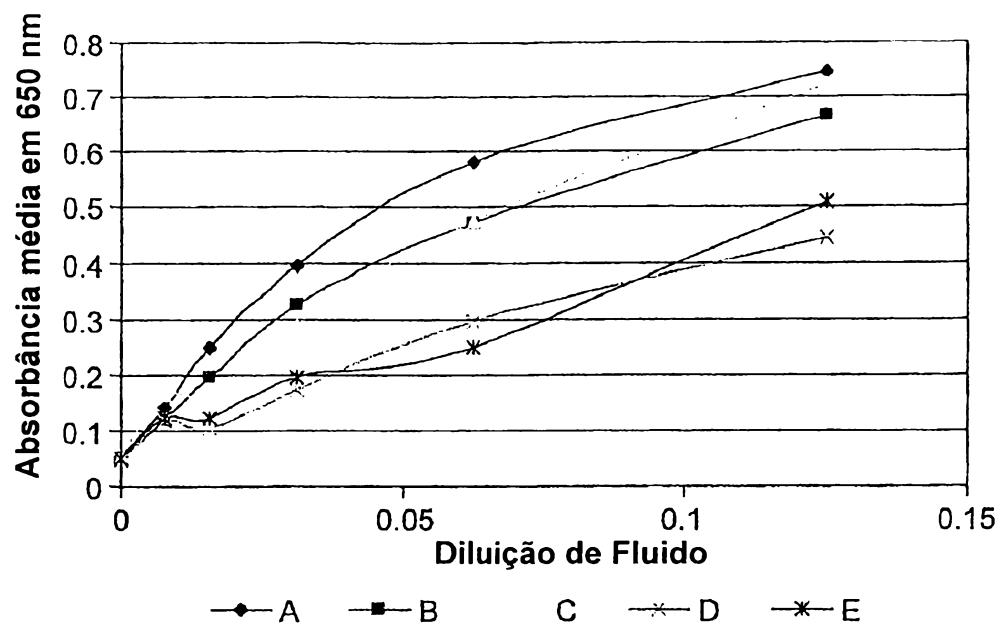


FIG. 32a

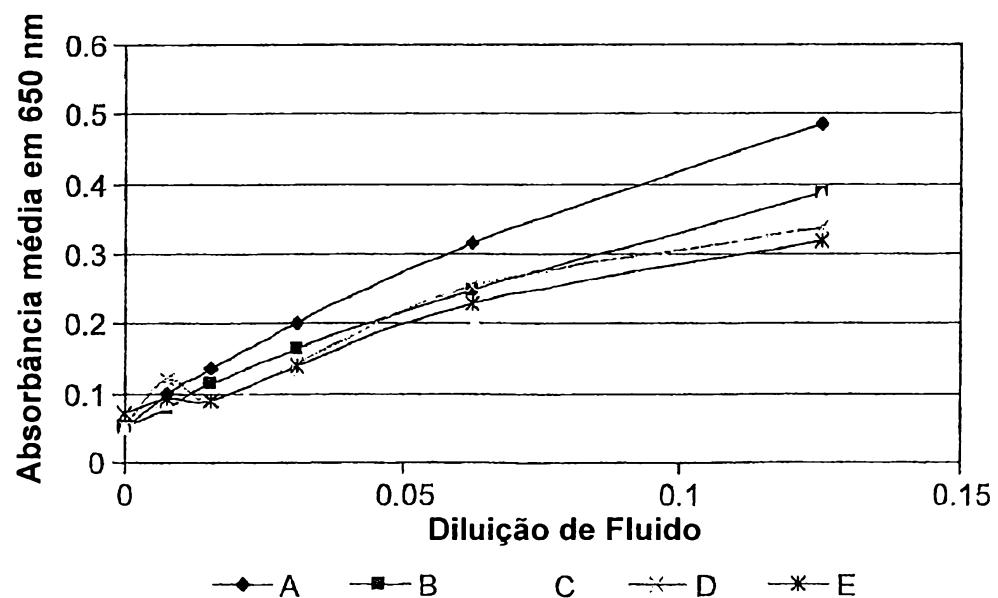


FIG. 32b

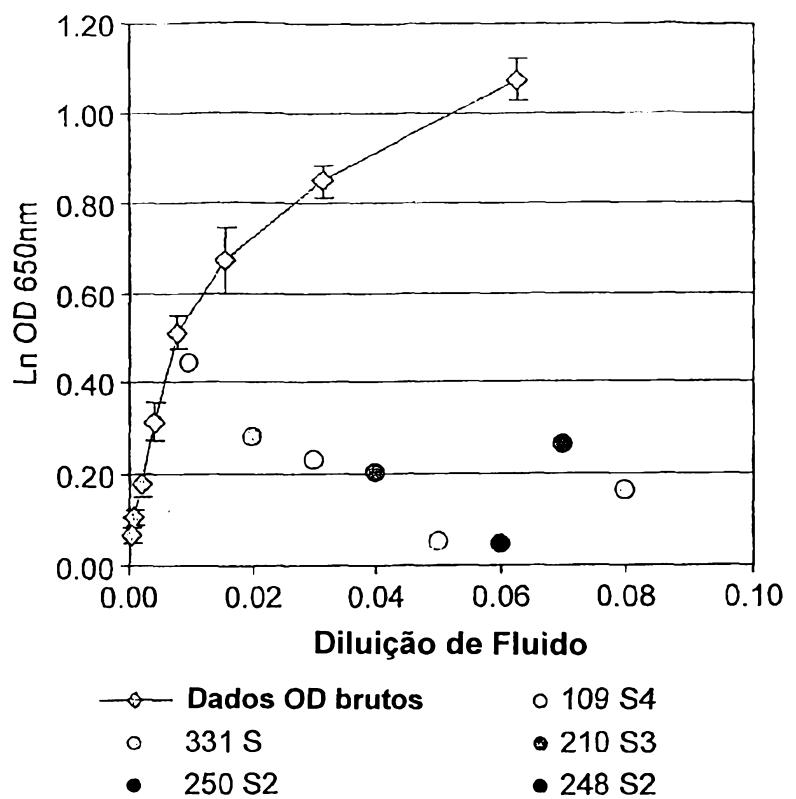


FIG. 33a

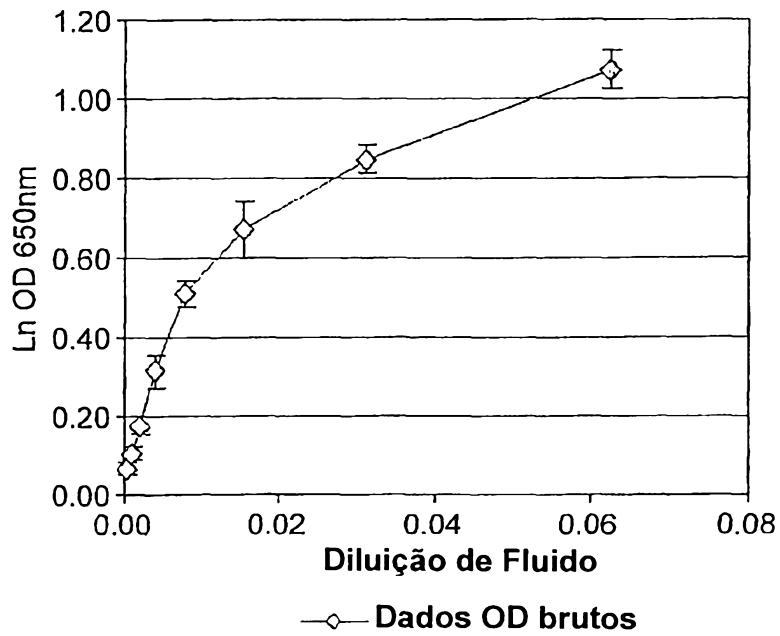


FIG. 33b

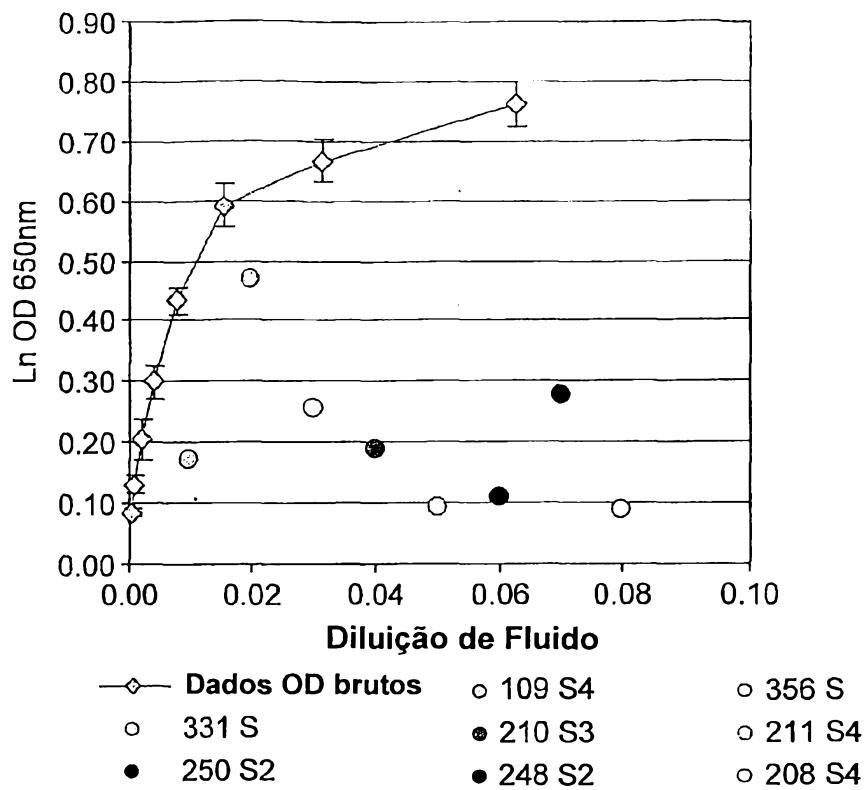


FIG. 34a

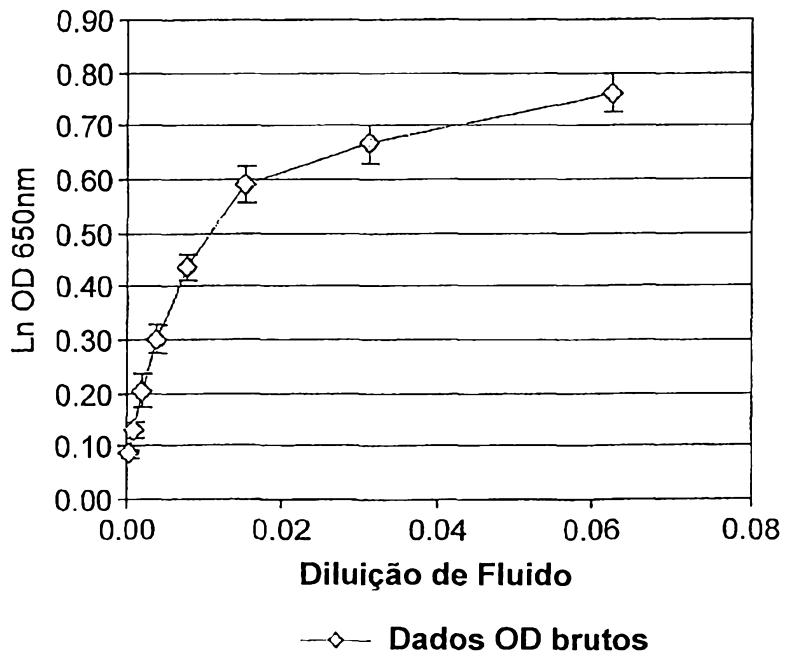


FIG. 34b

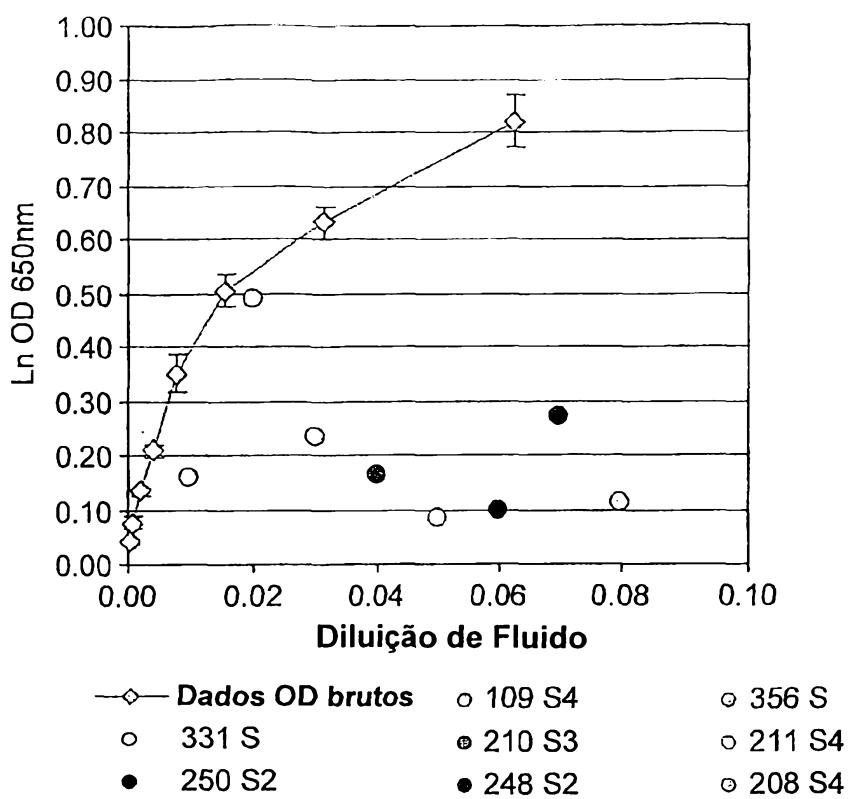


FIG. 35a

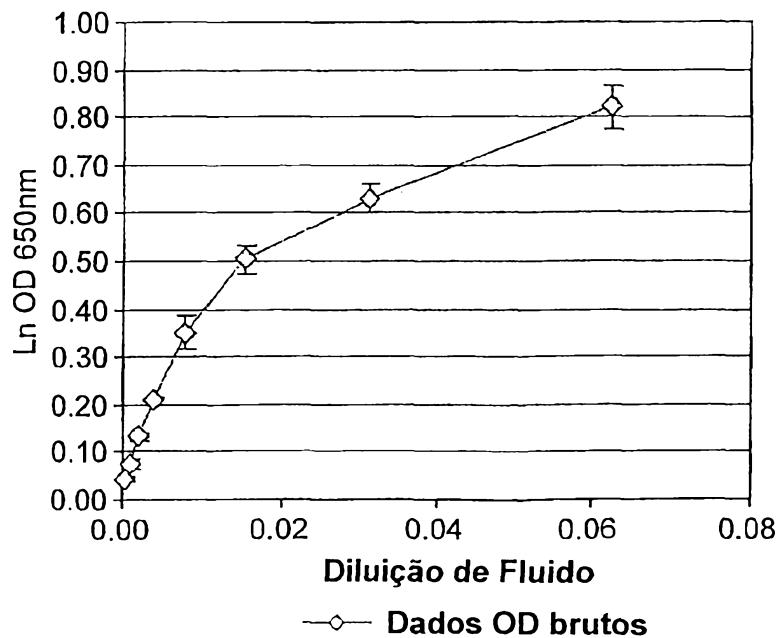


FIG. 35b