



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 976**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **95940906 .1**
96 Fecha de presentación : **18.09.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **0782709**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.1997**

54 Título: **Detección de cáncer.**

30 Prioridad: **19.09.1994 US 308141**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2010

73 Titular/es: **Ricardo J. Moro**
2475 Queens Avenue
West Vancouver, British Columbia V7V 249, CA

72 Inventor/es: **Moro, Ricardo J.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 336 976 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de cáncer.

5 **Esfera del invento**

El presente invento está relacionado con la detección del cáncer. Mas específicamente, el presente invento utiliza la existencia de un receptor AFP como base para detectar cáncer en un paciente.

10 **Antecedentes del invento**

Hace veinte años atrás, Abelev *et al.* reportaron la existencia del primer antígeno oncofetal, alfa-fetoproteína (AFP) [Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A. e Irlin, I. S., *Transplante* 1. 174 (1963)]. Aunque esta es la proteína de mayor circulación durante la vida fetal, casi desaparece después del nacimiento, siendo su concentración normal de suero como adulto menor de 50 ng/ml [Rouslahti, E. y Seppals, M., *Int. J. Cáncer* 8, 374 (1971)]. Sin embargo, en ciertas enfermedades malignas tales como hepatocarcinomas o teratocarcinomas, los niveles de plasma pueden ser mil veces superiores [Rouslahti, E. y Seppals, M., *M. Adv. Cáncer Res.* 29, 275 (1979)]. Este descubrimiento no solo llamó la atención de clínicos, quienes vislumbraron un nuevo medio para detectar malignidad y monitorear pacientes de cáncer, sino también el interés de investigadores que estudiaban la fisiología de esa proteína durante la vida fetal.

Uno de los primeros parámetros estudiados fue la distribución del AFP dentro del embrión. Utilizando métodos de inmunoperoxidasa, Benno y Williams describieron la distribución de AFP en el cerebro de la rata en desarrollo [Benno, R. H. y Williams, T. H., *Brain Res.* 142, 1982 (1978)]. Poco después, una serie de ensayos reportaron la localización de proteínas de plasma dentro de las células nerviosas en desarrollo de varias especies incluyendo pájaros y humanos [Trojan, J. y Uriel, J., *J. Oncodevelop. Biol. Med.* 1, 107 (1980); Uriel, J., Trojan, J., Dubouch, P. y Pieiro, A., *Path. Biol. Med.* 2, 391 (1981); Dziegielewska, K. M., Evans, C. A. N., Lorscheider, E. L., Malinowska, D. H., Mollgard, K., Reynolds, M. L. y Saunders, N. R., *J. Physiol.* 318, 239 (1981); Mollgard, K., Jacobsen, M., Krag-Jacobsen, G., Praetorius-Claussen, P. y Saunders, N. R., *Neurosci. Lett.* 14, 85 (1979)]. Para un tejido u órgano dado, la cinética de tinción de la AFP y SA sigue un patrón bastante constante en distintas especies [Uriel, J., Trojan, J., Moro, R. y Pieiro, A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 417, 321 (1983)]. Cuando una estructura nerviosa en muy inmadura, no se detecta ninguna AFP o SA intercelular. Luego, repentinamente, y por un cierto período de tiempo dependiendo de las especies, ambas proteínas son observadas simultáneamente, aún dentro de la misma célula [Torand-Allerand, C. D., *Nature* 286, 733 (1980)]. Subsecuentemente, la intensidad de tinción se desvanece y las células positivas se tornan escasas, primero para la AFP y luego para la SA. Las estructuras maduras son negativas para ambas proteínas. Otros constituyentes del suero, tales como IgG, u ovoalbúmina en embriones de pollos, nunca son encontrados durante la vida fetal dentro de células neurales, a pesar de estar presente en el fluido cerebroespinal [Fielitz, W., Esteves, A. y Moro, R., *Dev. Brain Res.* 13, 111 (1984)].

40 **Incorporación de AFP por parte de células embrionicas**

Una pregunta que surge de estas observaciones iniciales es si la AFP y SA fueron incorporadas de fuentes extracelulares o sintetizadas *in-situ*. Mientras no es claro aún si células neurales son capaces de sintetizar plasma proteínas [Ali, M., Raul, H. y Sahib, M., *Dev. Brain Res.* 1, 618 (1981); Ali, M., Mujoo, K. y Sahib, M., *Dev. Brain Res.* 6, 47 (1983); Schachter, B. S. y Toran-Allerand, C. D., *Dev. Brain Res.* 5, 95 (1982); Pieiro, A., Calvo, M., Iguaz, F., Lampreave, F. y Naval, J., *Int. J. Biochem.* 14, 817 (1982)], ha sido demostrado, tanto *in-vitro* [Uriel, J., Faivre-Bauman, A., Trojan, J. y Foiret, D., *Neurosci. Lett.* 27, 171 (1981); Hajeri-Germond, M., Tojan, Uriel, J. y Hauw, J. J., *Dev. Neurosci.* 6, 111 (1984)] como *in-vivo* [Villacampa, M. J., Lampreave, F., Calvo, M., Pieiro, A. y Uriel, J., *Dev. Brain Res.* 12, 77 (1984); Moro, R., Fielitz, W., Grunberg, J. y Uriel, J., *Int. J. Dev. Neurosci.* 2, 143 (1984)], que neuroblastos pueden fácilmente incorporar AFP y suero albúmina de fuentes extracelulares. Los experimentos *in-vivo* fueron realizados con proteínas homólogos y heterólogos. En el primer caso [Villacampa, M. J., Lampreave, F., Calvo, M., Pieiro, A. y Uriel, J., *Dev. Brain Res.* 12, 77 (1984)], fue demostrado que al ser inyectado en ratas grávidas, 125I-AFP se localizó en el cerebro fetal, como así también en otros órganos fetales tales como el intestino, la piel y la lengua, órganos en los cuales ya había sido reportado la existencia de AFP intracelular nativa [Trojan, J. y Uriel, J., *Oncodev. Biol. Med.* 3, 13 (1982)]. El segundo juego de experimentos [Moro, R., Fielitz, W., Grunberg, J. y Uriel, J., *Int. J. Dev. Neurosci.* 2, 143 (1984)] mostró que cuando se inyectaba suero de rata neonata en la cavidad mesencefálica de embriones de pollo, se podía detectar AFP de rata y SA de rata en el mismo lugar que sus contrapartes nativas. Esto también indicó que la AFP y SA de una especie fue asumida por células de otra especie, así apuntando a estructuras y mecanismos conservadas a lo largo de la evolución. Esto, a su vez, sugiere que un principio biológico básico está involucrado.

A pesar de alta concentración de IgG de rata inyectada, la tinción de esta proteína fue negativa. Esto no fue el resultado de su alto peso molecular (150,000) que podría dificultar una difusión pasiva, ya que tampoco se pudo detectar ovoalbúmina (peso molecular=43,000), aún cuando fuera inyectado a doble de la concentración molar normal de AFP en el fluido cerebroespinal embrionario [Fielitz, W., Esteves, A. y Moro, R., *Dev. Brain Res.* 13, 111 (1984)]. Esta selectividad favoreció la hipótesis de un mecanismo de endocitosis mediador receptor específico [Moro, R., y Uriel, J., *J. Oncodevelop. Biol. Med.* 2, 391 (1981); Moro, R., Fielitz, W., Grunberg, J. y Uriel, J., *Int. J. Dev. Neurosci.* 2, 143 (1984)].

La incorporación de AFP depende de la diferenciación de células

Sin embargo, hasta este momento no era claro si la absorción de AFP y SA era un fenómeno célula-dependiente, o si la tinción desaparecía como resultado de una disponibilidad baja de proteína extracelular debido al cierre de la barrera entre cerebro y sangre o debido a la baja concentración de AFP en circulación al final de la vida fetal. Fue demostrado, primero en pollos [Moro, R., *Neurosci. Lett.* 41, 253 (1983)] y luego en embriones humanos [Jacobsen, M., Lassen, L. C. y Mollgard, K., *Tumor Biol.* 5, 55 (1984)], que las células ganglionares neurales espinales realizan el ciclo completo de tinción negativo-positivo-negativo de AFP antes de lograrse el pico máximo de suero. Mas aún, cuando el AFP se torna detectable, la SA continúa presente por un tiempo, así indicando que estas proteínas de suero tiene acceso a neuroblastos ganglionares

Receptores de AFP en células inmaduras

La absorción de AFP por las células sugiere la existencia de un receptor específico cuya expresión esta regulada de acuerdo con el grado de diferenciación de la célula. [Uriel, J., Trojan, J., Moro, R. y Pieiro, A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 417, 321 (1983); Moro, R., *Neurosci. Lett.* 41, 253 (1983)]. Un informe previo [Uriel, J., Bouillon, D., Russel, C. y Dupiers, M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1452 (1976)] mostró la presencia de dos fracciones de ultracentrifugación conteniendo AFP en el medio líquido del citoplasma [citosol] uterino de ratas inmaduras; una fracción 4s, correspondiendo íntegramente a AFP, y una fracción 8s en la cual la detección inmunológica de AFP fue solamente posible luego de un tratamiento con 0.4 M KCl. Este tratamiento transformó la fracción 8s en una fracción 4s. Es muy probable que la fracción 8s correspondió a un complejo receptor-AFP, que fue desasociado a altas concentraciones de KCl, aunque el concepto de receptor-AFP aún no había sido concebido en ese tiempo. Esta disociación del complejo receptor-AFP con KCl también fue observado por Smalley y Sarcione [Smalley, J. R. y Sarcione, E. J., *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 94, 1429 (1980)] quien también proveyó evidencia que la molécula AFP podía ser sintetizada por células uterinas inmaduras de ratas.

La expresión del receptor de AFP en células cancerígenas

Ya que las células cancerígenas comparten un número de características bioquímicas y antigénicas con las células fetales [Uriel, J., *Adv. Cáncer Res.* 29, 127 (1979)], es posible que células malignas, derivadas de tejidos que incorporan AFP durante su vida fetal, puedan re-expresar el correspondiente receptor y así absorber AFP nuevamente. En apoyo de esta hipótesis, Sarcione *et al.* [Sarcione, E. J., Zloty, M., Delluomo, D. S., Mizejewski, G. y Jacobson, H., *Cáncer Res.* 43, 3739 (1983)] encontraron AFP en un complejo 8s derivado de carcinomas mamarias humanas que pudo ser disociado mediante un tratamiento KCl de la misma forma que en los experimentos utilizando citosol de rata inmadura. Mas recientemente, estos autores han demostrado que AFP es sintetizado por la línea MCF-7 de células cancerígenas de pecho humano como un complejo que necesita ser disociado a fin de hacer que el AFP sea detectable inmunológicamente [Sarcione, E. J. y Hart, D., *Int. J. Cáncer* 35, 315 (1985)]. Por otro lado, esta línea de células [Uriel, J., Faily-Crepin, C., Villacampa, M. J., Pieiro, A. y Geuskens, M., *Br. J. Cáncer* 48, 263 (1983)] demostró absorber AFP *in vitro*. Como confirmación de estos resultados indirectos, se detectaron receptores superficiales de AFP en la línea MCF-7 [Villacampa, M. J., Moro, R., Naval, J., Faily-Crepin, Ch., Lampreave, F. y Uriel, J., *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 122, 1322 (1984)]. Los parámetros necesariamente apuntan a un modelo receptor de dos sitios exhibiendo una cooperación positiva. La alta afinidad del sitio posee un Kd de 1.5×10^{-9} M con una manifestación de cooperación positiva. El sitio de alta afinidad posee un Kd de 1.5×10^{-9} M con un n-2,000/célula. El sitio de baja afinidad, presente a 320,000/célula posee un Kd de 2.2×10^{-7} M. Estudios posteriores mostraron la presencia de un sistema receptor similar en la superficie de las células YACT linfoma de rata, que se encuentra ausente en células T de ratas normales [Naval, J., Villacampa, M. J., Goguel, A. F. y Uriel, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3301 (1985).

Estos estudios fueron realizados en paralelo con experimentos *in-vivo* en los cuales ratones que ostentaban tumores mamarias espontáneos fueron inyectados con AFP radiado. La distribución de radioactividad en el tejido mostró una razón de tejido tumor/normal (hígado) de 3.6 [Uriel, J., Villacampa, M. J., Moro, R., Naval, J. y Faily-Crepin, Ch., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 297, 589 (1983); Uriel, J., Villacampa, M. J., Moro, R., Naval, J. y Faily-Crepin, C., *Cáncer Res.* 44, 5314 (1984)]. Una autorradiografía de secciones tumorosas de estos animales mostraron una acumulación significativa de granos plateados alrededor de la membrana nuclear de células malignas pero no de células normales [Uriel, J., Villacampa, M. J., Moro, R., Naval, J. y Faily-Crepin, C., *Cáncer Res.* 44, 5314 (1984)].

Imágenes escintigráficas de tumores en ratones utilizando ¹³¹I-AFP

Utilizando ¹³¹I-AFP, imágenes escintigráficas positivas de tumores mamarias de ratones tan pequeñas como 3-4 mm han sido obtenidas [Uriel, J., Villacampa, M. J., Moro, R., Naval, J. y Faily-Crepin, C., *Cáncer Res.* 44, 5314 (1984); Moro, R., Heuguerot, C., Vercelli-Retta, J., Fielitz, W., López, J. J. y Roca, R., *Nuclear Med. Comm* 5, 5 (1984)]. De hecho once de doce tales tumores fueron detectables con una cámara gamma estándar ligada a una computadora. Otro tumor de ratón, una neuroblastoma, también pudo ser escaneado de forma similar [Hajeri-Germond, M., Naval, J., Trojan, J. y Uriel, J., *Br. J. Cáncer* 51, 791 (1985)].

La expresión de absorción de AFP o evidencia directa del receptor AFP ha sido demostrado en varios tipos diferentes de tumores algunos de los cuales son: una rhabdomyosarcoma de rata [Uriel, J., poupon, M. F., y Geuskens, M., Br J. Cáncer 48, 263 (1983)], una neuroblastoma de ratón [Hajeri-Germond, M., Naval, J., Trofan, J., y Uriel, J., Br J. Cáncer 51, 791 (1985)], carcinomas mamarias humanas y de ratón [Villacampa, M. J., Moro, R., Naval, J., Faily-Crepin, Ch., Lampreave, F. y Uriel, J., Bioch, Biophys. Res. Commun. 122, 1322 (1984); Naval, J., Villacampa, M.J., Goguel, A. F., y Uriel, J., J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 3301 (1985); Uriel, J., Villacampa, M. J., Moro, R., Naval, J., y Faily-Crpin, Ch., C. R. Acad. Sci (Paris) 297, 589 (1983); Uriel, J., Villacampa, M. J., Moro, R., Naval, J., y Faily-Crpin, Ch., Cáncer Res. 44, 5314 (1984); Noro, R., Heuguerot, C., Vercelli-Retta, J., Fielitz, W., López, J. J. y Roca, R., Nuclear Med. Comm 5, 5 (1984); Biddle, W. y Sarcione, E. J., Breast Cáncer Res. Treat. 10, 281 (1987)], linfomas T de ratón [Naval, J., Villacampa, M. J., Goguel, A. F. y Uriel, J., J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 3301 (1985)], linfomas de células humanas T y B [Laborda, J., Nava, J., Allouche, M., Calvo, M., Georgoulas, V., Mishal, Z., y \sqrt{J} . Int. J. Cáncer 40, 314 (1987); Calvo, M., Laborda, J., Naval, J., Georgoulas, V., y Uriel, J., presentado en la Asamblea XIII del ISOBM (Paris 1985); Torres, J. M., Abel, A., y \sqrt{J} . Cell. Physiol. 150, 458 (1992); Torres, J. M., Gueskens, M. y Uriel, J., Int. J. Cáncer 47, 112 (1991)], como así también linfocitos T humanos fitohemaglutinina activado [Torres, J. M., Laborda, J., Naval, J., Darracq, N., Calvo, M., Mishal, Z., y Uriel, J., J. Mol. Immunology 26, 851 (1989)], la línea U937 de células monocitos malignas humanas [Suzuki, Y., Zeng, C. Q., Alpert, E. J., Clinic. Invest. 90, 1530 (1992)], y la línea HT29 de células carcinoma de colon humano [Esteban, C., Gueskens, M. y Uriel, J., Int. J. Cáncer 49, 425 (1991)].

Estos encuentros colocan al receptor AFP como un antígeno oncofetal disperso, relacionado mas bien con el estado maligno que el tipo de tumor.

Anticuerpos monoclonales contra el receptor de AFP

AFP etiquetado (FITC, trazador radioactivo) no se liga a células tumorales en secciones de tejido parafinado, probablemente debido a la desnaturalización parcial del sitio de liga del receptor durante la fijación y a la relativa baja afinidad que demuestra hacia su receptor. Así, anticuerpos monoclonales (Mabs) contra el receptor AFP fueron producidos utilizando un recipiente de carcinomas mamarias humano como el inmunógeno [Moro, R., Tamaoki, T., Wegmann, T. G., Longenecker, B. M., y Laderoute, M. P., Tumour Biol. 14, 116 (1993), incorporado por referencia].

Dos IgM produciendo Mabs reconocen una banda doble de 67 KD en gels PAGE bajo condiciones no-reductores. Las bandas de 67 KD también son reactivos con ^{125}I -AFP. Estos Mabs reaccionan con el sitio de liga del receptor AFP, ya que inhiben la liga del AFP a células tumorales, y a la inversa están inhibidos de ligarse a las células en la presencia de un gran exceso de AFP. Los Mabs no reaccionan con el AFP. Reconocen células fetales y carcinomas mamarias en secciones de tejido, pero no adenomas mamarias o la mayoría de otros tejidos normales adultos.

Durante las últimas décadas, los científicos han tratado de caracterizar antígenos relacionados con la malignidad. El receptor AFP, que debería ser considerado como un antígeno oncofetal puede satisfacer muchos de los requerimientos de un marcador tumoral de utilidad clínica. Trabajos adicionales utilizando anticuerpos monoclonales contra este antígeno ampliamente relacionado con el cáncer permitirá determinar su utilidad clínica como así también estudiar el rol fisiológico del receptor AFP.

Resumen del invento

Este presente invento es definido en los reclamos adjuntos. El presente invento corresponde a un método para detectar cáncer en un paciente. El método comprende los pasos para introducir anticuerpos marcados en una muestra biológica del paciente para que los anticuerpos marcados o AFP marcado reaccionen con los sitios de liga del AFP receptor en la muestra biológica. Le sigue luego el paso de identificar los sitios de liga del AFP receptor en el material biológico que reaccionaron con los anticuerpos marcados o AFP marcado para determinar la presencia de cáncer. Antes del paso introductorio, existe el paso de obtener una muestra biológica del cuerpo del paciente.

El invento puede ser utilizado para diagnosticar y hacer un seguimiento de enfermedades de cáncer mediante la detección del receptor alfa-fetaproteína (AFP receptor) en fluidos corpóreos.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos, el procedimiento preferido del invento y los métodos preferidos de poner en práctica el invento quedan ilustrados en lo siguiente:

Figura 1 es un cuadro de enfermedades cancerígenas y no-malignas.

Descripción del procedimiento preferido

El presente invento corresponde a un método para detectar cáncer en un paciente. El método comprende los pasos para introducir anticuerpos marcados en una muestra biológica del paciente para que los anticuerpos marcados reaccionen con los sitios de liga del AFP receptor en la muestra biológica. La muestra biológica puede ser sangre, saliva o

ES 2 336 976 T3

siero. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales. Le sigue luego el paso de identificar los sitios de liga del AFP receptor en el material biológico que reaccionaron con los anticuerpos marcados para determinar la presencia de cáncer. Antes del paso de introducción de anticuerpos, existe el paso de obtener una muestra biológica del cuerpo del paciente.

5

El paso de introducción puede incluir el paso de introducir los anticuerpos marcados con radioisótopo a la muestra biológica del paciente para que los anticuerpos marcados reaccionen con el AFP receptor en la muestra biológica. El paso de identificación incluye el paso de identificar la radioactividad presente en la muestra biológica. Más específicamente, el paso de identificación puede incluir el paso de medición de 1 recuento radioactivo de la muestra biológica. O el paso de identificación puede incluir los pasos de recubrir la muestra biológica con emulsión fotográfica, revelar la emulsión fotográfica y observar la muestra biológica recubierta.

10

En un procedimiento alternativo, el paso de introducción incluye el paso de introducir el anticuerpo marcado con una enzima a la muestra biológica del paciente para que los anticuerpos marcados o AFP marcado reaccione con los sitios de ligado receptores de AFP en la muestra biológica. El anticuerpo marcado con enzima cambia el color del espécimen biológico, y el paso identificador puede incluir el paso de comparar el color del espécimen biológico con un color conocido para determinar la presencia de cáncer. La enzima puede peroxidarse, y el paso de introducción puede incluir el paso de introducir el anticuerpo marcado con peroxidada al tejido del paciente. Alternativamente, el paso de introducción puede incluir los pasos de colocar una gota de la muestra biológica sobre un lugar sobre nitrocelulosa o nylon, y agregar el anticuerpo marcado con peroxidada en ese lugar. El paso identificador entonces incluye el paso de determinar si el lugar sobre la nitrocelulosa o nylon ha cambiado de color.

15

20

En otro procedimiento, el anticuerpo marcado con enzima libera iones que cambian la conductividad eléctrica de la solución en la cual ha sido colocado la muestra biológica. El paso identificador entonces incluye el paso de medir la conductividad eléctrica de la solución para determinar la presencia de cáncer en la muestra biológica.

25

En aún otro procedimiento, el paso introductorio puede incluir el paso de introducir los anticuerpos marcados con fluorocromo a la muestra biológica del paciente para que los anticuerpos marcados reaccionen con el AFP receptor en la muestra biológica. El paso identificador entonces puede incluir los pasos de irradiación de la muestra biológica con luz UV, y medir la emisión de fotones de la muestra biológica irradiada.

30

En general, salvo para la aplicación o uso de AFP, el AFP o anticuerpos modificados que reaccionan con el receptor AFP, las técnicas descritas anteriormente son generalmente conocidos por aquellos diestros en el arte.

35

Operación del invento

En líquidos corpóreos:

Ya sea por secreción o por difusión pasiva luego de la muerte de la célula, el receptor AFP de tejidos cancerosos o fetales/embrionarios pueden ser liberados en la corriente sanguínea y de allí en muchos fluidos corpóreos como orina, lágrimas, saliva, etc. De acuerdo con el invento, el fluido corpóreo a ser utilizado es sangre, saliva o suero. La concentración del AFP receptor en fluidos corpóreos (incluyendo suero) sería por ende significativamente diferente entre individuos sanos y pacientes con cáncer o embarazadas. Esto a su vez podría ser utilizado con propósitos de diagnóstico. También, la evolución de la concentración del AFP receptor en estos fluidos corpóreos puede ser utilizado con propósitos de seguimiento. Por ejemplo: Un paciente es diagnosticado con adenocarcinoma mamaria y la concentración de suero del AFP receptor es alta/El paciente es operado y se extrae el tumor. Determinaciones subsiguientes del AFP receptor en suero muestra una reducción pronunciada inmediatamente después de la operación, seguido de un plateau. Sin embargo, seis meses después la concentración del AFP receptor en suero comienza a crecer nuevamente. Esto indica una recurrencia o metástasis del cáncer que probablemente preceda los métodos tradicionales clínicos y otros medios de diagnóstico. Alertado por una prueba de bajo costo como el propuesto el médico ahora busca la masa maligna métodos invasivos mas refinados y costosos si fuera necesario. La detección del AFP receptor en fluidos corpóreos será tratado más abajo.

50

Líquidos corpóreos

Ejemplo #1

En un ejemplo, 22 muestras de suero de pacientes no-cancerígenos y 17 muestras de pacientes cancerígenos su concentración del AFP receptor fueron analizado mediante una enzima inmuno-análisis (EIA). La técnica fue lo siguiente: Placas receptáculos EIA 96 fueron recubiertos de 1 hora hasta el día siguiente con muestras de suero, de los grupos descritos más arriba, diluidos 1/16384 en fosfato salino amortiguado (PBS) (0.05 M PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.5). Algunos receptáculos fueron recubiertos de forma similar con efusión pleural de un paciente con metástasis pulmonar de una carcinoma mamaria a una dilución de 1/256. Este material, nombre código P89 fue utilizado como estándar debido a la gran cantidad disponible. Esto permitió que el P89 fuera utilizado como el mismo estándar para comparar todas las muestras entre si en todos los experimentos. Luego de tras lavados con PBS, sitios no-específicos de liga fueron bloqueados con 1% ovoalbúmina o gelatina por 1 hora. Luego de tres lavados, 100 ul con una dilución de 1/200

60

65

ES 2 336 976 T3

5 en 1% ovoalbúmina en PBS de una ascitis de un anticuerpo monoclonal (Mab) producido en ratones y dirigido contra el AFP receptor (Mab 167H.4 según descrito en [Moro, R., Tamaoki, T., Wegmann, T., G., Longenecker, B. M., y Laderoute, M. P., Tumour Biol. 14, 116 (1993)], incorporado como referencia) fue incubado en un receptáculo para 3 horas. Luego los receptáculos fueron lavados 3 veces con PBS y un conjugado IgM comercial de peroxidada-anti-
 10 ratón fue agregado a la concentración recomendada por el proveedor (Sigma Chemicals, St. Louis). Luego de 1 hora, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS y el sustrato colorante para peroxidada (ABTS) fue agregado a la concentración recomendada por el proveedor (Sigma). Todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente. Luego de 30 minutos, la densidad óptica (O.D.) en cada receptáculo fue registrado a 405 nm utilizando el lector de placas estándar Titertek. Los resultados se expresan en la Tabla I y la figura 1.

15 La tabla muestra el paciente, tipo de tumor y relación entre la muestra y P89 utilizado como estándar a través del estudio. Los resultados indican que todos los pacientes cancerígenos excepto uno fueron positivos cuando el umbral entre positivo y negativo fue fijado en 54% de P89. Pacientes no-cancerígenos fueron todos negativos excepto uno utilizando el mismo umbral.

TABLA I

	Órgano	Tipo de Tumor
20	1 Ovario	Adenocarcinoma Mucin.
	2	Leucemia linfoidea
25	3 Miembro	Angiosarcoma
	4 Útero	Adenocarcinoma
	5 Tejido blando	Sarcoma
30	6 Ovario	Adenocarcinoma Cística
	7 Recto	Adenocarcinoma
	8 Pelvis	Carcinomatosis
	9	Tumor disperso generalizado
35	10 Cerebro	Astrocitoma
	11 Pulmón	Neoplasia
	12 Hígado	Hepatoma Primaria
40	13 Pelvis	Neoplasia
	14 Riñón	Neoplasia (Metastática)
	15 Colon	Neoplasia
45	16 Hueso	Osteosarcoma

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 336 976 T3

Una prueba T independiente registro los siguientes valores (utilizando el análisis de datos en Excel™):

Prueba-t: Dos muestras asumiendo variaciones desiguales

	Variable 1	Variable 2	
5			
	Promedio	84.74571	33.26582
10	Variación	709.9173	300.2051
	Observaciones	16	22
15	Correlación Pearson	#N/A	
	Variación conjunta	3.5	
20	df	24.02215	
	t	60758736	
25	P(T<=t) un-ciclo	2.72E-07	
	t Crítico un-ciclo	1.710882	
30	P(T<=t) dos-ciclos	5.44E-07	
	t Crítico dos-ciclos	2.063898	

35 Un análisis de dos ciclos dio por resultado $p=0.00000054$, una figura extremadamente significativa aun para el número tan reducido de muestras consideradas.

40 Un paciente (no presente en la tabla) que formaba parte del grupo de control negativo resultó positivo. Alertado por la alta significación de los datos obtenidos, el médico a cargo de este paciente la hizo escanear mediante CAT y encontró un tumor que resultó ser una hipernefoma maligna. Esta malignidad fue primeramente detectada utilizando esta prueba y LUEGO confirmado clínicamente.

45 La figura 1 muestra los mismos resultados expresados como un gráfico en la cual el eje X ha sido dividido en dos secciones (maligno y no-maligno, las unidades son irrelevantes) y el eje Y representa el porcentaje de P89 de cada paciente. La línea horizontal representa el umbral de 54%.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 336 976 T3

Ca so #	Nombre	Se xo	Localiza ción	Diagnóstic o Final	Prueba de D.O./D. O P-89 como porcent aje	Menor de 54% (conside rado como -)
	Pacien tes Cáncer (+)					
1	J. G.	F	Tejido	Sarcoma		
2	O. R.	M	Vejiga	Epitelioma		
6	A. B.	F	Ovario	Adenocarci	89	Prom - . 85
10	M. S.	F		Leucemia	107	-
14	M. B.	F	Miembro	Agiosarcom	83	-
15	G. B.	F	Útero	Adenocarci	92	-
18	J. E.	M	Tejido	Sarcoma	94	Desv - . 26
19	S. F.	F	Ovario	Adenocarci	72	-
24	E. G.	F	Recto	Adenocarci	74	Típi - ca
32	M. C.	F	Pelvis	Carcinomat	118	-
33	E. M.	F	Abdomen	Tumor	74	-
34	H. D.	F	Cerebro	Astrocitom	134	-
35	C. B.	M	Pulmón	Neoplasia	117	-
37	R. F.	M	Hígado	Hepatoma	96	Min. - 34
67	C. D.	M	Pelvis	Neoplasia	61	-
68	C. M.	F	Riñón	Neoplasia	54	-
69	U. D.	M	Colon	Neoplasia	56	-
41	J. B.	F	Hueso	Osteosarco	34	Max. +
	Pacien tes con Cáncer (-)					<54 Neg
39	H. T.	F	Pulmón	Hipoplasia	47	+
40	M. L.	F		Enfermedad	32	+

ES 2 336 976 T3

Ca so #	Nombre	Se xo	Localiza ción	Diagnóstic o Final	Prueba de D.O./D. O P-89 como porcent aje		Menor de 54% (conside rado como -)
58	O. H.	M	Cerebro	Meningioma	52	Prom . 33 Desv . 17 Típi ca Max. 62	+
7	S. R.	M	Nodo	Inflamator	62		-
16	S. C.	M	Hígado	Cirrosis	29		+
21	B. P.	M	Próstata	Adenoma	54		+
29	M. B.	F	Cerebro	Hemorragia	44		+
30	H. A.	M		Enfermedad	3		+
44	A. A.	M		Enfermedad	28		+
45	J. F.	M	Cerebro	Accidente	2		+
46	G. N.	M	Riñón	Malformaci	25		+
47	H. P.	M		Enfermedad	13		+
48	M. S.	F		Enfermedad	21		+
51	B. O.	F		Enfermedad	23		+
53	J. G.	M		Hipertensi	10		+
54	J. S.	M		Hipertensi	20		+
55	J. M.	M		Normal	32		+
56	A. T.	M		Enfermedad	48		+
61	F. D.	M	Cerebro	Hemorragia	52		+
N1	J. L.	M		Normal	49	+	
N2	E. V.	M		Normal	46	+	
N3	F. F.	M		Normal	38	+	

Ejemplo #2

En otro procedimiento, un sustrato adecuado de plástico o vidrio (placas EIA o tubos de ensayo) es recubierto con anticuerpos monoclonales (Mab) contra el AFP receptor en una concentración adecuada. Luego de lavar en exceso de Mab, el sustrato es bloqueado con una proteína irrelevante o mezcla de aminoácido para prevenir ligados no específicos y una muestra de dilución adecuada del fluido corpóreo del paciente (suero, saliva, orina, etc.), y es incubado con el sustrato recubierto por un período de tiempo adecuado. Luego del lavado para remover el material de muestra no ligado, un segundo anticuerpo del tipo policlonal es agregado (anticuerpos policlonales se producen mediante la inmunización de un animal y utilizando su suero como la fuente del anticuerpo para la reacción en oposición a los Mabs que son producidos por clones de células de bazo inmortalizadas en una cultura o injertadas en una anfitrión adecuado). Este anticuerpo puede ser conjugado con un marcador adecuado o enzima para desarrollar un color o una reacción detectable o el ensayo puede proceder agregando un anti-segundo anticuerpo marcado con tal marca o enzima. Si la reacción involucra este tercer anticuerpo, entonces el segundo anticuerpo debe ser producido en una especie diferente al primer anticuerpo y no se debe detectar ninguna reacción cruzada entre los anticuerpos primero y segundo. La reacción es entonces leída mediante un detector adecuado respondiendo al tipo de reacción desarrollada (color, conductividad, químico-luminiscencia, etc).

Ejemplo #3

Lo mismo que el Ejemplo #2 pero utilizando dos anticuerpos policlonales diferentes en vez de un monoclonal y un anticuerpo para el primer y segundo anticuerpo, respectivamente.

ES 2 336 976 T3

Ejemplo #4

Lo mismo que el Ejemplo #2 en el cual el sustrato es una membrana de nitrocelulosa o nylon. La reacción no es medida con un aparato pero aparece como un punto de color en el sustrato. La reacción es considerada como positiva o negativa a simple vista.

Ejemplo #5

Lo mismo que el Ejemplo #3 en el cual el sustrato es una membrana de nitrocelulosa o nylon. La reacción no es medida con un aparato pero aparece como un punto de color en el sustrato. La reacción es considerada como positiva o negativa a simple vista.

Ejemplo #6

Uno de los anticuerpos en Ejemplos #2-#5 es substituido por AFP homologo o heterologo que liga al receptor.

Ejemplo #7

KCl en concentraciones superiores a 0.4 M de KCl desasocian el complejo AFP receptor. Esto libera una cantidad adicional de AFP receptor que puede no ser detectable ya que el reconocimiento mediante uno de los gigantes (Mab, policlonales o AFP) descrito en los ejemplos previos puede ser desemparejado por el AFP endógeno que puede estar presente en los complejos circulantes de AFP receptores. Como resultado, la cantidad de AFP receptor puede ser aumentado así aumentando la sensibilidad de la prueba. En este caso, el ejemplo puede ser tratado mediante KCl antes o durante la incubación con la fase sólida del ensayo.

Ejemplo #8

Todos los ejemplos antes mencionados en la cual el marcador es un compuesto radioactivo (para ensayos radioinmunes y técnicas relacionadas).

Ejemplo #9

Todo lo anterior donde la lectura de un ensayo es realizado mediante químico-luminiscencia o fluorescencia.

Ejemplo #10

Todo lo anterior donde la lectura es basada en la conductividad.

Muestras de Líquidos Corpóreos. El AFP receptor está presente en la membrana de la célula pero también en el citoplasma. De hecho cuando se incuban AFP radioactivo con células de cáncer, aproximadamente 2/3 del mismo se encuentra en el citoplasma, muy probablemente asociado con el AFP receptor. (referencia 32. Naval, J., Villacampa, M. J., Goguel, A. F. y Uriel, J., J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82. 3301 (1985) en la Introducción General que le envié). Un método de purificación del AFP receptor de suero del cordón humano ha sido desarrollado [Moro, R., Tamaoki, T., Wegman, T. G., Longenecker, B. M. y Laderoute, M. P., Tumour Biol. 14, 116 (1993)] incorporado por referencia. Este método funciona porque se cree que hay circulación del AFP receptor liberado de las células en proceso de morir o activamente secretada por ellas. El hecho es que el AFP receptor es una proteína soluble que se encuentra en la sangre del recién nacido como uno esperaría.

Lo mismo sucede en un individuo con un tumor, solo que el origen del AFP receptor son las células malignas mas bien que las células fetales en las cuales se expresa fisiológicamente. Así, existe AFP receptor en el líquido extracelular tumoral. Por ejemplo, una carcinomatosis peritoneal (células cancerígenas de cualquier origen que metastatice el peritoneo y se proyecte por toda la cavidad abdominal) normalmente produce ascitis fluido que hemos probado y es rico en AFP receptor (no confunda esto con ascitis inducido en ratones como una fuente de anticuerpos monoclonales, aunque los mecanismos fisiopatológicos son los mismos: células de cáncer (en este caso hibridomas produciendo anticuerpos monoclonales) en la cavidad peritoneal crean una reacción inflamatoria que genera ascitis dentro del cual las células hibridoma liberan el anticuerpo monoclonal).

P-89, que hemos utilizado como una referencia estándar en nuestros ensayos de enzima inmuno es la efusión pleural de un paciente con metástasis pulmonar de un carcinoma mamario. La situación aquí es que las células del cáncer mamario migraron al pulmón y comenzaron a crecer en el pleura, la membrana que recubre los pulmones. El pleura reacciona contra las células de cáncer de la misma forma que el peritoneo lo hace solo que el líquido es llamado efusión pleural mas bien que ascitis. En estos casos (ascitis y efusión pleural) las células cancerígenas que están en contacto directo con el líquido) o flotando en el) liberan el AFP receptor directamente en el.

ES 2 336 976 T3

Ascitis y efusiones pleurales se recoge mediante una punción con una aguja. En otros casos, la secreción puede aflorar del cuerpo espontáneamente. Por ejemplo, un cáncer de vejiga puede liberar AFP receptor en la orina que entonces puede ser monitoreado. Una carcinoma bronquial libera AFP receptor en la mucosa que puede ser recogida como esputo forzando al paciente a toser.

5

Si las células malignas están en contacto próximo a la sangre, como en el caso de leucemias y algunas linfomas, entonces la concentración mas alta de AFP receptor se encontrará en el suero.

10 Todo lo anterior son situaciones reales, pero no los más probables que sucedan. Los cánceres mas comunes, estómago, mamaria, útero, colon y pulmón liberaran AFP receptor a la corriente sanguínea. Este fluido corpóreo exhibirá la mas alta concentración del marcador de los fluidos disponibles para análisis. Sin embargo, a medida que aumenta la sensibilidad de diferentes técnicas inmuno-químicas, es posible detectar AFP receptor en otros fluidos. Por ejemplo, una pequeña cantidad de la mayoría de las proteínas de sueros aparecen en la saliva. Es obviamente mas práctico obtener una muestra de saliva que de sangre y si la cantidad del AFP receptor es suficientemente alta y la sensibilidad de la reacción utilizada es también suficiente, uno podría utilizar saliva en vez de sangre con propósitos de diagnóstico y seguimiento.

15

En resumen, en algunos casos es conveniente utilizar sangre o suero. Finalmente, en algunos otros casos podría ser mas conveniente por razones prácticas o legales probar otros fluidos corpóreos tales como saliva aunque pueda haber mas AFP receptor que en el suero. Fluidos corpóreos pueden ser recogidos de secreciones espontáneas o por punciones con una aguja adecuada.

20

Métodos inmuno-químicos: Estos métodos pueden ser realizados en probetas o receptáculos de placa en los cuales la fase sólida en la cual la reacción es "pegada" es de una naturaleza artificial. Estos métodos normalmente son conocidos como ensayos inmuno-químicos. Para los ensayos inmuno-químicos la molécula a ser detectada o medida debe estar en una solución.

25

El principio general de estas reacciones es sencilla: Anticuerpos (monoclonales o de sueros de animales inmunizados) son muy específicos en cuanto al reconocimiento de la estructura contra la cual reaccionan. Si un animal es inmunizado con fracciones muy puras de digamos albúmina humana, su suero SOLAMENTE reconocerá la albúmina presente en la muestra que también puede contener muy altas concentraciones de cientos de otras proteínas. Los anticuerpos también tiene gran afinidad hacia las sustancias contra las cuales fueron creadas (llamadas antígenos). Así, muy pequeñas cantidades de estos antígenos pueden ser detectados.

30

La forma en que se realizan las reacciones inmuno-químicos es: La sustancia (antígeno) a ser detectado (en este caso, el AFP receptor) es reaccionado con un anticuerpo que es específico a ese antígeno. Uno de los dos (el anticuerpo o el antígeno) es marcado (etiquetado) de alguna manera. Luego de incubar a los dos juntos, el re-agente excesivo es lavado t la etiqueta es puesta en evidencia de una de varias formas. Si la etiqueta es un radioisótopo entonces el recuento radioactivo es medido mediante un detector adecuado (normalmente, 1251 es utilizado para estas técnicas y la emisión de rayos gamma es medida. Estas técnicas son agrupadas bajo el nombre de ensayos radio-inmunes (RIA). Si la incubación con la etiqueta radioactiva en realizada en una sección de tejido, entonces 3H es preferido y es manifiesto en la diapositiva luego de que ha sido revestido con una emulsión fotográfica. Granos de plata (negras) aparecen donde hay radioactividad. Estos granos pueden ser observados bajo el microscopio.

35

40

Otra técnica muy popular utiliza una enzima como marcador. Una enzima es un catalizador y como tal puede convertir un substrato en un nuevo producto. La característica interesante aquí es que 1 sola molécula de enzima (tal como peroxidada de rábano o fosfatasa alcalina (los 2 mas usados)) pueden procesar 10,000 o más moléculas substratas. Así la sensibilidad se torna enorme ya que existe un factor multiplicador de 10,000 veces. Estas reacciones son conocidas como enzima-inmuno-ensayos (EIA) o ensayos inmuno absorbentes ligados a enzimas (ELISA). Estas enzimas generalmente producen un cambio de color en el substrato. En ensayos solubles (reacciones inmuno-químicas) la solución en un tubo de ensayo o receptáculo de placa cambia de color y por consiguiente al medir el cambio uno puede cuantificar la reacción (utilizando un fotocolorímetro o un espectrofotómetro). En otros casos, la enzima libera iones de una solución non-iónica así cambiando la conductividad eléctrica de la solución que puede ser medida eléctricamente. En una variación de estas técnicas, el marcador es biotina que es reconocido mediante Avidina conjugado a la enzima. La reacción avidina-biotina aumenta la sensibilidad general del ensayo.

45

50

55

Recientemente, otro tipo de marcador fue incorporado. Estos marcadores son fluorocromos que al ser excitados por luz UV emiten fotones del espectro visible. Las reacciones son medidas con una fotocélula inmediatamente luego de la exposición a UV de alta intensidad estimulando el pulso de luz. Estas técnicas son conocidas como inmuno-químico-luminiscencia.

60

Irrespectivo a la forma utilizada para marcar las moléculas o la forma en que son medidas las reacciones, las reacciones se llevan a cabo en secuencias bien conocidas según se describe a continuación:

Ensayos competitivos: En este caso, el antígeno libre (aquí el AFP receptor) necesita ser obtenible en cantidades relativamente elevadas y de una calidad muy pura. El anticuerpo es ligado a la fase sólida (el tubo de ensayo o receptáculo de placa plástico o una membrana adecuada, mas detalles luego). La muestra conteniendo el antígeno es mezclada con una cantidad de antígeno marcado puro. Cuanto mas antígeno en la muestra original, menor cantidad

65

ES 2 336 976 T3

de antígeno marcado puede ligarse a una cantidad conocida de anticuerpos en la fase sólida (el antígeno se encuentra en saturación comparado con la cantidad de anticuerpos). La reacción cuantificada por extrapolación contra una sustancia conteniendo una cantidad conocida de antígeno no marcada. Esta técnica solamente trabaja con antígenos solubles, no es útil para muestras de tejido. La ventaja principal de ensayos competitivos es que requiere solamente un anticuerpo.

Técnicas laminares (sándwiches): Existen muchas variaciones: el ELISA laminar tradicional consiste en adosar un anticuerpo a una fase sólida. Entonces la muestra conteniendo el antígeno a ser medido es agregado. Las diluciones son tales que la reacción procede en exceso de anticuerpos. Luego de un incubado de varios minutos a varias horas, los re-agentes excesivos son lavado y se agrega un segundo anticuerpo. Este segundo anticuerpo debe reconocer un sitio en la molécula del antígeno diferente del reconocido por el primer anticuerpo. Sino, el sitio sería ocupado por el primer anticuerpo y no ocurriría ninguna reacción (a no ser que el antígeno tuviera más de un sitio de ligado idéntico que los dos anticuerpos reconocieran, una instancia muy rara). El segundo anticuerpo solo está presente en exceso para que todo el antígeno sea reconocido. El segundo anticuerpo es marcado. Luego de lavar nuevamente la reacción es leída. Las técnicas laminares poseen una ventaja que es que no es necesario un antígeno puro. Sus desventajas son: Más tiempo para la reacción (mínimo de dos incubaciones son necesarias) y la necesidad de dos tipos de anticuerpos.

La técnica laminar de una sola capa es lo que utilizó en este ejemplo y lo que es utilizado en la mayoría de reacciones inmuno-histoquímicas en tejidos. Aquí, el antígeno es fijado en la fase sólida y el anticuerpo marcado (solamente 1 anticuerpo) es entonces incubado sobre él. La desventaja al utilizar un tubo de ensayo como la fase sólida es que la forma en que el antígeno se pega al tubo de ensayo puede influir la intensidad de la reacción y la "pegajosidad" puede depender de otros componentes en la muestra cuyo suero varía de paciente en paciente (esto es porque las fuerzas que ligan las proteínas al vidrio o plástico en el tubo de ensayo o al receptáculo de placa son de naturaleza débiles electrostáticamente, en contradicción a las reacciones fuertes que ligan un antígeno a su anticuerpo). Para evitar esto es que el doble laminar (sándwiches) descrito más arriba funciona con un exceso del primer anticuerpo. Entonces, si el primer anticuerpo se pega a la fase sólida es más o menos irrelevante, hay mucho, y no existe variación de una muestra a otra ya que el ligado no-específico a la fase sólida siempre utiliza el mismo producto en el ensayo (la preparación de primer anticuerpo). La diferencia en los experimentos en pacientes cancerígenos y no cancerígenos fue tal que no pudieron ser explicados por las diferencias en el recubrimiento de las placas plásticas utilizadas.

Acerca de la fase sólida: Esta puede ser una superficie adecuada a la cual las moléculas se ligarán, generalmente mediante fuerzas electrostáticas (la preparación es generalmente incubada por unas pocas horas en tubos de ensayo que luego son lavadas. Las proteínas permanecen pegadas al vidrio o plástico). Sin embargo, en algunos otros casos, la fase sólida puede ser una membrana generalmente hecha de nylon o nitrocelulosa. Estas membranas son blancas. Si, una vez que las membranas han sido recubiertas con el antígeno o el anticuerpo, entonces un ensayo similar al realizado en secciones de tejido con microscopios es realizado y el color es producido utilizando un substrato más bien que un cambio del color, genera un precipitado coloreado, así al final del proceso un punto de color indicará si una reacción fue positiva o negativa. Si hay color, entonces hay reacción, si no hay color la reacción fue negativa. Este es un ejemplo de un tipo de reacción "todo o nada" como se mencionó anteriormente. Tiene la enorme ventaja de no requerir ningún aparato para ser leída, el ojo es suficiente. La mayor desventaja es que no es muy preciso.

Aunque el invento ha sido descrito en detalle en los textos precedentes con el propósito de ilustración, es de entender que tal detalle es meramente para aquel propósito y que aquellos hábiles en este campo podrán efectuar variaciones sin alejarse del alcance del invento según se describen en los siguientes reclamos.

REIVINDICACIONES

- 5 de
1. Un método para detectar la presencia de un tumor canceroso en un paciente humano, que comprende los pasos
- introducir anticuerpos anti-receptor de α -fetoproteína (anticuerpos anti-AFPr) marcados en una muestra biológica de un fluido corporal obtenido del paciente para que unan receptor de α -fetoproteína (AFPr) soluble en la muestra biológica, y
- 10 determinar el nivel de reacción de AFPr soluble en la muestra biológica con los anticuerpos anti-AFPr para detectar la presencia del tumor canceroso en el paciente;
- en donde el fluido corporal es sangre, saliva o suero y el tumor está en el ovario, ganglio linfático, extremidad, tejido blando, estómago, abdomen, útero, vejiga, próstata, recto, colon, pelvis, cerebro, pulmón, hígado, riñón o hueso.
- 15 2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde los anticuerpos están marcados con un radioisótopo.
- 20 3. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde los anticuerpos están marcados con una enzima.
4. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde los anticuerpos están marcados con un fluorocromo.
- 25 5. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
6. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde los anticuerpos son anticuerpos policlonales.
7. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es sangre.
- 30 8. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es suero.

35

40

45

50

55

60

65

