

## TÍTULO DE PATENTE NO. 324200

**Titular(es):** CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

**Domicilio:** Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de La Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MEXICO

**Denominación:** BIOMARCADOR Y ANTÍGENO ASOCIADO A TUMOR: ALFA 1-ANTITRIPSINA PARA EL DIAGNÓSTICO E INMUNODIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA EN ETAPAS TEMPRANAS

**Clasificación:** Int.Cl.8: G01N33/561; G01N33/564; G01N33/574

**Inventor(es):** RODOLFO HERNANDEZ GUTIERREZ; ENEIDA ARACELI LOPEZ ARIAS

### SOLICITUD

Número:	Fecha de presentación:	Hora:
MX/a/2010/014331	20 de diciembre de 2010	15:54

### PRIORIDAD

País:	Fecha:	Número:
-------	--------	---------

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 20 de diciembre de 2030

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso iii) 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso iii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 18 de septiembre de 2014

DIRECTOR DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS  
ELÉCTRICA Y DE REGISTROS DE DISEÑOS INDUSTRIALES Y MODELOS  
DE UTILIDAD

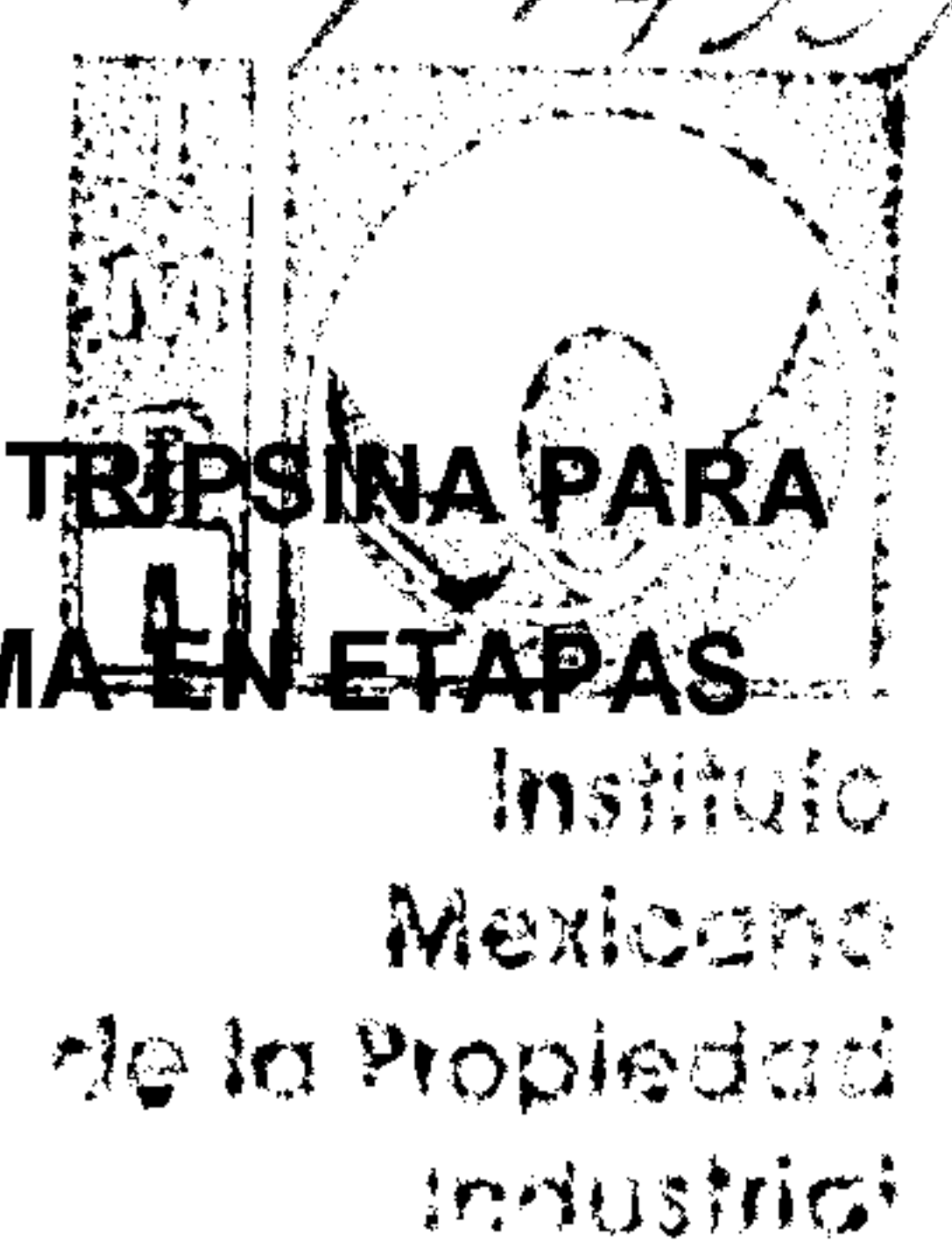
PEORO DAVID ERAGOSO LOPEZ





324200  
18-09-2017

2010 / 1433



**BIOMARCADOR Y ANTÍGENO ASOCIADO A TUMOR: ALFA 1-ANTITRIPSINA PARA EL DIAGNÓSTICO E INMUNODIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA EN ETAPAS TEMPRANAS.**

5

**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención tiene aplicación dentro del área de la biotecnología biomédica y trata sobre un biomarcador que clasifica e identifica un estado de cáncer en pacientes. En particular permite detectar autoanticuerpos en pacientes con cáncer de mama en etapa temprana y distinguirlos de personas sanas. El biomarcador es utilizado como auto-antígeno para detectar autoanticuerpos en suero de pacientes mediante inmunoensayos. El uso de este biomarcador permitirá evitar que las personas lleguen a un estado avanzado de cáncer (etapas III y IV) incrementando así las posibilidades de sobrevivida y la reducción de los índices de morbilidad y mortalidad y por consecuencia los costos económicos.

10

15

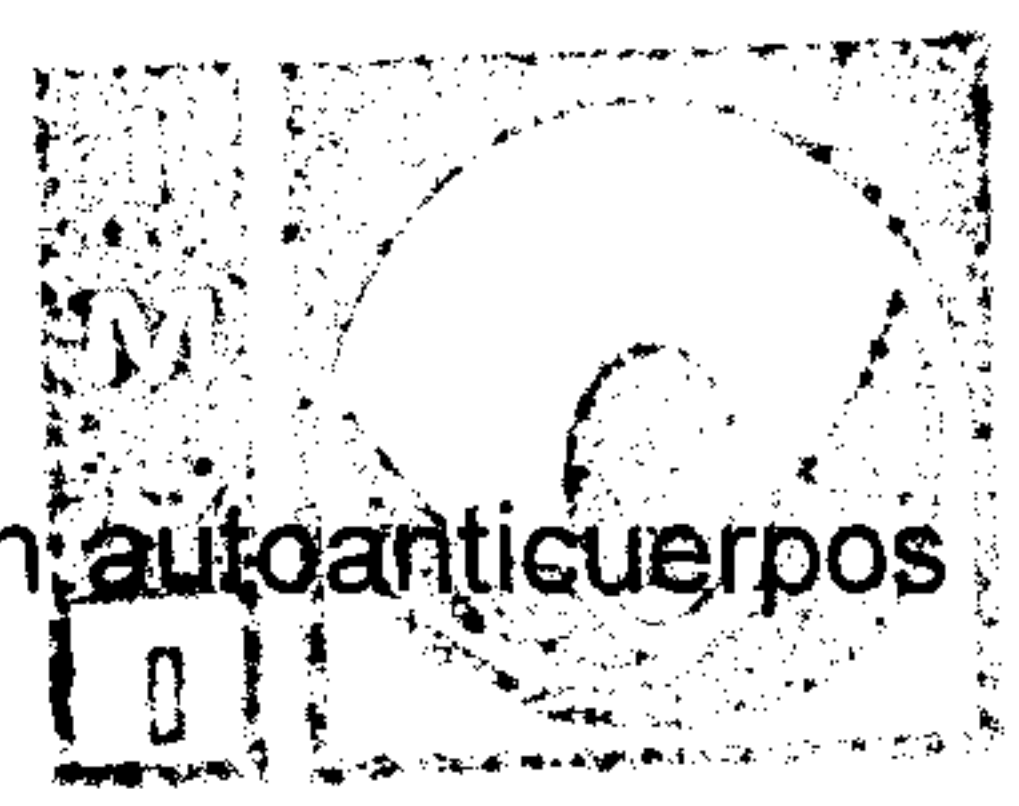
**ANTECEDENTES**

El cáncer de mama es una de las neoplasias más comunes en las mujeres y es la principal causa de muerte en el mundo por cáncer, con una incidencia de 1,1 millones de casos anuales. La detección temprana del cáncer de mama es de gran importancia. El uso de la mastografía ha demostrado su eficacia puesto que se ha observado una reducción de la mortalidad entre un 20 y 35% en mujeres con edades entre 40 y 69 años. Sin embargo, el valor predictivo de la mastografía disminuye cuando los pacientes presentan tejido mamario denso, lesiones pequeñas y en mujeres pre-menopausicas. La sensibilidad de la mastografía es alrededor del 70%-80% y su especificidad del 5%-10%, estos porcentajes dependen del personal que opera e interpreta los resultados. Si el cáncer de mama se diagnóstica y se trata cuando aún está confinado exclusivamente a la mama, es decir en etapas I y II, la tasa de recuperación después de un tratamiento es cercana al 100%. Pero el incremento en la efectividad del tratamiento en etapas tempranas depende del diagnostico temprano. Se han reportado la presencia de autoanticuerpos en personas con diferentes tipos de cáncer: cáncer de pulmón, de páncreas, de hígado y de ovario. En el caso de cáncer de mama se han reportado autoanticuerpos contra c-erbB-2/HER2/neu, RS/DJ-1, la mucina, y más recientemente otras como PPIA, PRDX2 y FKBP52, Ciclofilina A, y contra la Alfa 2-glicoproteína

20

25

30



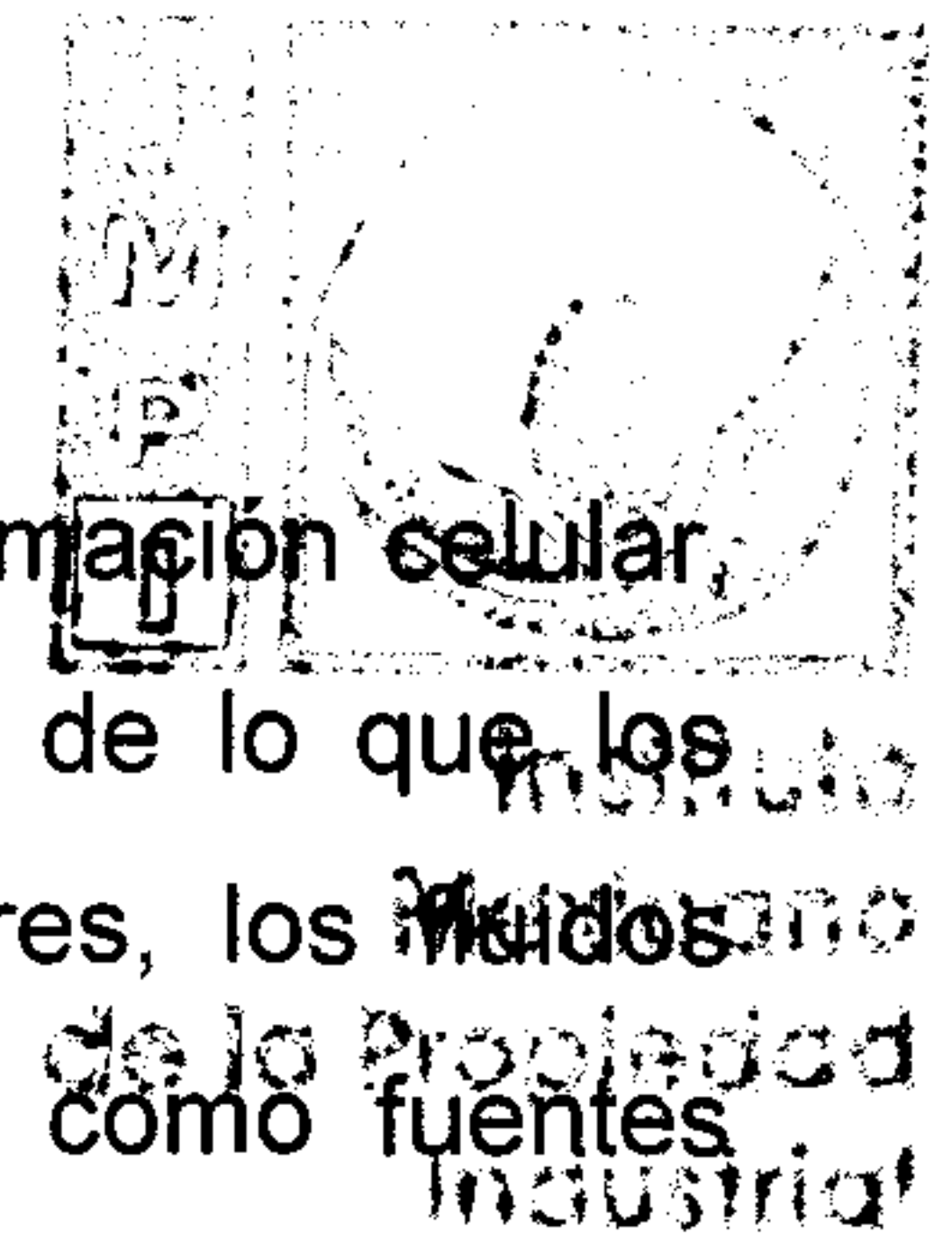
(AHSG). El porcentaje de personas con cáncer de mama que presentan autoanticuerpos contra las proteínas ya señaladas se encuentra entre un 20% y un 79%.

Se han reportado biomarcadores candidatos que han sido identificados y evaluados. Y continúan los esfuerzos para el hallazgo de nuevos biomarcadores. Pero un problema frecuente es que los ensayos de detección de biomarcadores no logran ser lo suficientemente sensibles o específicos para ser confiables para el diagnóstico temprano.

En la solicitud de patente US 2009/0227692 A1, se describen tres biomarcadores para la detección de pacientes con cáncer de mama en etapa I y II, uno de estos biomarcadores son fragmentos de la proteína Alfa 1 Antitripsina, sin embargo, estos fragmentos fueron detectados por medio de Espectrometría de Masas (SELDI), la cual, es una técnica muy cara debido a que se requiere de un equipo especial muy costoso, en esta invención describen solo dos fragmentos que corresponden a la Alfa 1 Antitripsina: el fragmento C-terminal 1 y el fragmento C-terminal 2, la solicitud de patente US 2009/0227692 A1 establece claramente que los tres biomarcadores no pueden ser utilizados para detectar el cáncer de mama mediante un método de cuantificación de estos fragmentos de la proteína y que esta proteína provenga de algún paciente.

La presente invención describe un biomarcador para el diagnóstico del cáncer de mama en etapas tempranas mediante la proteína Alfa 1 Antitripsina, la cual fue reconocida por anticuerpos presentes en el suero de pacientes con cáncer de mama en etapas tempranas y por lo que se identificó como un Antígeno Asociado a Tumor (AAT). La proteína Alfa 1 Antitripsina es un antígeno para el Diagnóstico e Inmunodiagnóstico oportuno de Cáncer de Mama. La proteína Alfa 1 Antitripsina detecta autoanticuerpos en pacientes con cáncer de mama en etapas tempranas (etapa II) y esto a su vez permite distinguir pacientes con cáncer de personas sanas, con las siguientes ventajas: (1) la proteína Alfa 1 Antitripsina en ensayos de Inmuno-Blot presenta una sensibilidad del 96% en pacientes con cáncer y con un margen de error del 10%. (2) La proteína alfa 1-antitripsina se identificó como un (AAT) en pacientes con cáncer de mama, lo cual permite ser un (AAT) en el Diagnóstico e Inmunodiagnóstico oportuno de cáncer de mama, ya que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con tumores que expresan una variedad de proteínas aberrantes (antígenos) capaces de provocar una respuesta inmune (producción de autoanticuerpos) frente a tales antígenos asociados a tumor (AAT), esta respuesta inmune parece surgir meses o años antes del diagnóstico clínico de un tumor (4, 6-8), los (AAT) y sus anticuerpos específicos pueden proporcionar





una amplificación *in vivo* de una señal temprana al inicio de una transformación celular, esto puede dar lugar a la detección temprana del cáncer, a diferencia de lo que los métodos ordinarios no permiten. (3) Para la búsqueda de biomarcadores, los fluidos corporales como sangre, saliva y orina entre otros, son considerados como fuentes ideales para evaluar la presencia de estas moléculas indicadoras de cáncer. El suero contiene varios antígenos circulantes y anticuerpos relacionados con la presencia y progresión del cáncer.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los detalles característicos de esta invención que se refiere a un **Biomarcador y antígeno asociado a tumor: Alfa 1-Antitripsina para el Diagnóstico e Inmunodiagnóstico de cáncer de mama en etapas tempranas**, se muestran claramente en las siguientes figuras, las cuales se mencionan a manera de ejemplo y no deben de considerarse como limitativas a la presente invención:

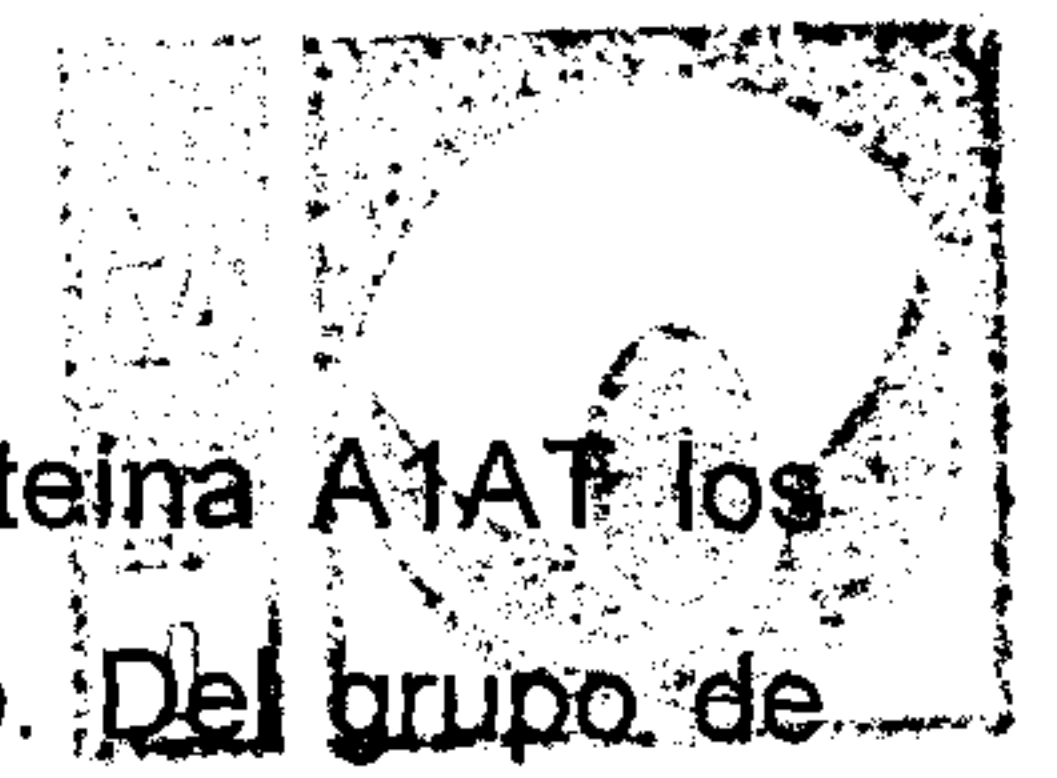
**Figura 1.-** Es un patrón electroforético en 2D, en el cual se observan las proteínas provenientes de sueros, las flechas indican a la proteína Alfa 1 Antitripsina.

**Figura 2.-** Inmuno-blot en 2D, en el que se observa señalada por las flechas la proteína Alfa 1 Antitripsina (A1AT), la cual fue reconocida por anticuerpos presentes en los pacientes con cáncer de mama en etapa II.

**Figura 3.-** Inmuno-Blot en 2D de sueros de personas sanas, en el cual, no se encontró reconocimiento alguno de la proteína Alfa 1 Antitripsina. PMP: marcadores de Peso Molecular, pH: rango de pH de las tiras IPG, Flechas: Proteínas Reconocidas = A1AT.

**Figura 4.-** Es un gel de poliacrilamida en 1D. Electroforesis unidimensional de la proteína identificada, aislada de los geles de 2D y caracterizada mediante espectrometría de masas como A1AT, la cual se puede observar con un peso molecular aproximado de 50 kDa. MPM: Marcadores de Peso Molecular, Carril 1: Electroforesis de la A1AT, Flecha: Proteína A1AT.

**Figura 5.-** Ensayos de Inmuno-Blot en 1D. En esta figura se puede observar el análisis realizado con los sueros de pacientes con cáncer de mama que fueron incubados en la membrana de Nitrocelulosa conteniendo únicamente a la proteína A1AT aislada de los geles de 2D. los carriles 1-25 indican los diferentes sueros de pacientes con cáncer de



Instituto  
Mexicano  
de Diagnóstico  
y Referencia  
Epidemiológicos

mama incubados con la membrana de nitrocelulosa conteniendo la proteína A1AT los sueros mostraron los diferentes niveles de intensidad de reconocimiento. Del grupo de pacientes con cáncer de mama solo uno dio resultado negativo (carril 15)

**Figura 6.-** En esta figura se muestra el mismo análisis que la figura anterior, pero con sueros de pacientes sanos incubados en la membrana de Nitrocelulosa (carriles 1-20), en la cual solamente se observa reconocimiento de la proteína A1AT por parte de dos pacientes sanos (carril 6 y 12); en los demás no hubo tal reconocimiento. MPM: marcadores de Peso Molecular, Flechas: Proteína A1AT reconocida por los anticuerpos de los pacientes.

10

**Tabla 1.-** Muestra el rango y el promedio de edad de los pacientes con cáncer de mama y personas sanas. El análisis estadístico de los datos refleja que no existe diferencia significativa entre los dos grupos de estudio y por lo tanto la edad no es un factor influye en la detección de anticuerpos contra la proteína Alfa 1 Antitripsina.

15

<b>Edad</b>	<b>Sanos</b>	<b>Cáncer</b>
<b>Rango</b>	<b>34 - 60</b>	<b>38 - 61</b>
<b>Promedio</b>	<b>44.85</b>	<b>48.72</b>
<b>Total de Muestras</b>	<b>20</b>	<b>25</b>
<b>T Student</b>	<b>P = 0.088, <math>\alpha = 0.05</math></b>	

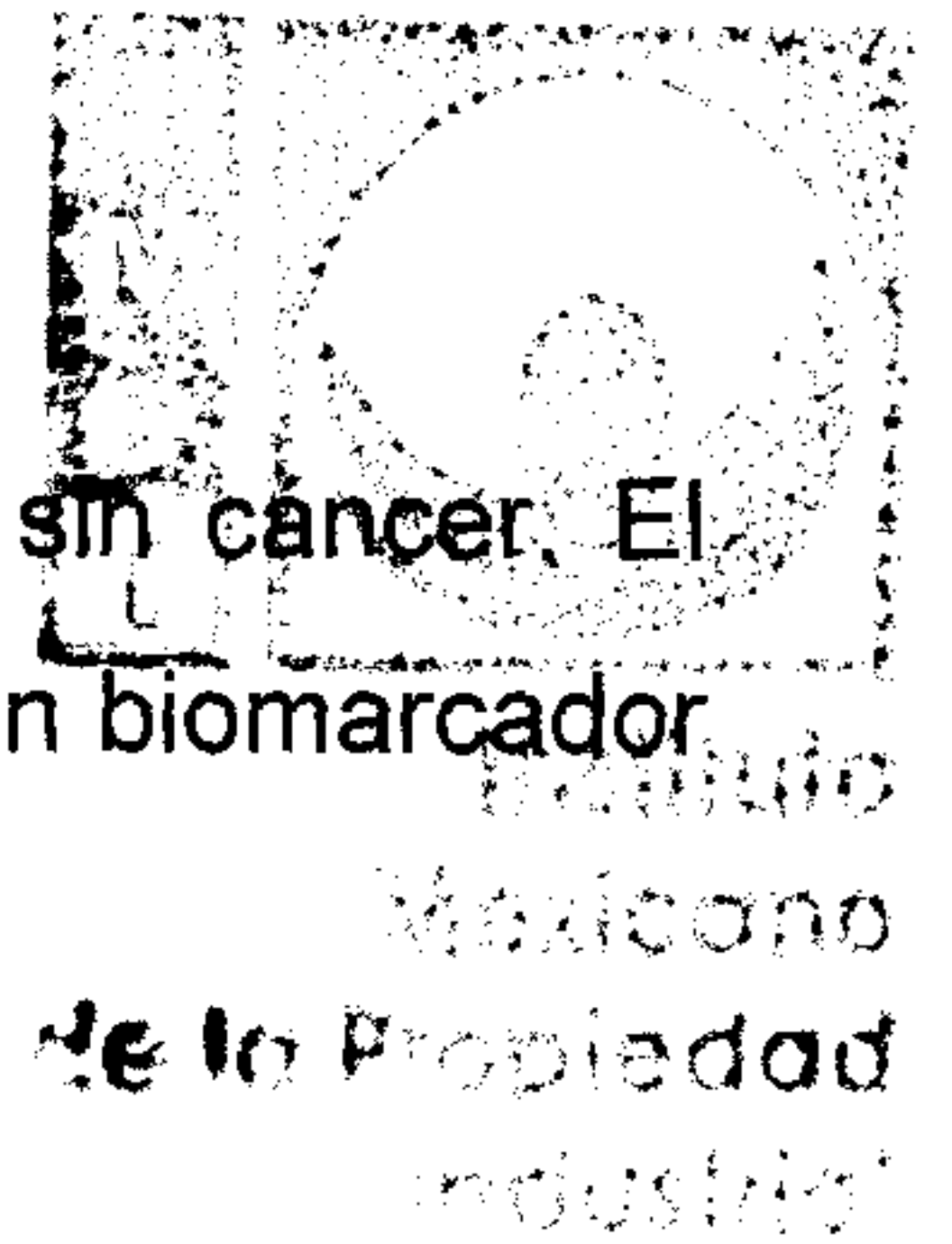
20

**Tabla 2.-** Muestra el número de personas con cáncer y sin cáncer analizadas, y el número pacientes cuyos sueros presentaron anticuerpos contra la Alfa 1 Antitripsina.

25

<b>GRUPOS</b>			
<b>Abs vs A1AT</b>	<b>Sanos</b>	<b>Cáncer</b>	<b>Total</b>
<b>Negativos</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>19</b>
<b>Positivos</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>26</b>
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>45</b>

30



**Tabla 3.-** Muestra el porcentaje de detección de personas con cáncer y sin cáncer. El análisis estadístico de los resultados indican que la Alfa 1 Antitripsina es un biomarcador para el diagnóstico del cáncer de mama en etapas tempranas.

5

	Grupos		Total	
	Sanos	Cáncer	Positivos	Negativos
Detección	10 %	96 %	92.3 %	5.2 %
Prueba de X <sup>2</sup>	P = 0.0000			

10

La invención describe un método para identificar y caracterizar a un autoantígeno o Antígeno Asociado a Tumor (AAT) de cáncer de mama proveniente de sueros de pacientes y que es reconocido por autoanticuerpos séricos presentes en pacientes con cáncer de mama en etapa II, mediante ensayos de Inmuno-Blot.

15

De igual manera la invención detalla un método para la identificación del AAT (Alfa 1 Antitripsina = A1AT) y el uso de esta proteína para el Diagnóstico e Inmunodiagnóstico de cáncer de mama: a) la identificación de la presencia de autoanticuerpos anti-A1AT y b) la correlación de la presencia de los autoanticuerpos contra la A1AT y la presencia de cáncer de mama en etapas tempranas (etapa II).

20

La invención consiste en la identificación, aislamiento y caracterización de la proteína Alfa-1-Antitripsina (A1AT) obtenida de diferentes sueros de pacientes con cáncer de mama y personas sanas.

### **MEJOR METODO CONOCIDO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION**

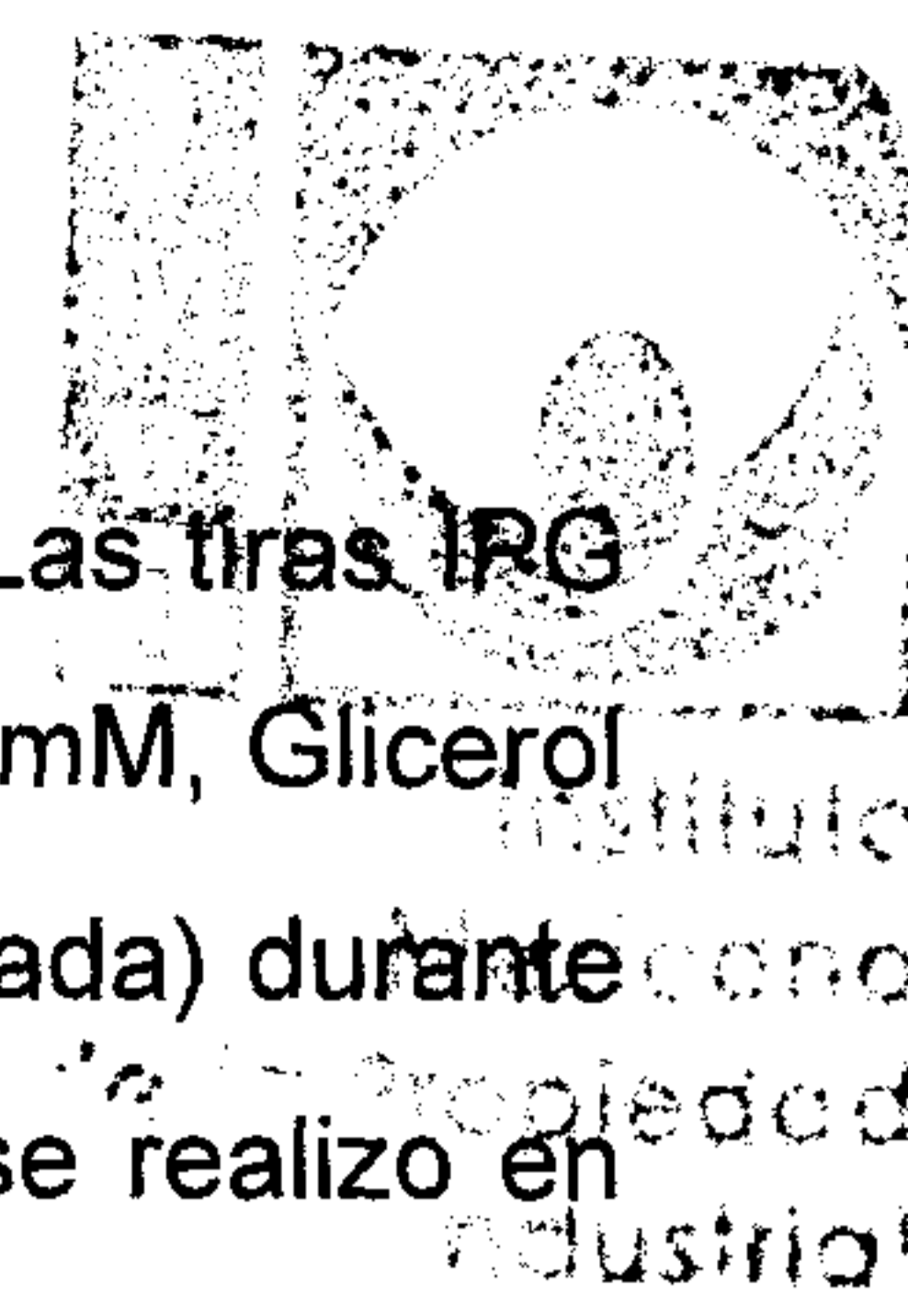
25

**El Biomarcador y antígeno asociado a tumor: Alfa 1-Antitripsina para el Diagnóstico e Inmunodiagnóstico de cáncer de mama en etapas tempranas,** constan de las siguientes tres fases para su identificación, aislamiento y caracterización.

30

**Fase 1.- Electroforesis en 2D.** Una vez depletadas las muestras fueron precipitadas en acetona (1:4, -20°C) 1h. La pastilla se resuspendió en 125µl de Buffer de hidratación (Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS), DTT 1M e IPG Buffer (4-7) 20mM. Se utilizaron IPG tiras de 7cm, gradiente pH 4-7. La muestra se dejó hidratando durante 16 horas. Las condiciones de Isoelectroenfoque (IEF) fueron dispuestas en 4 pasos: 1 Stp 300V/2:30

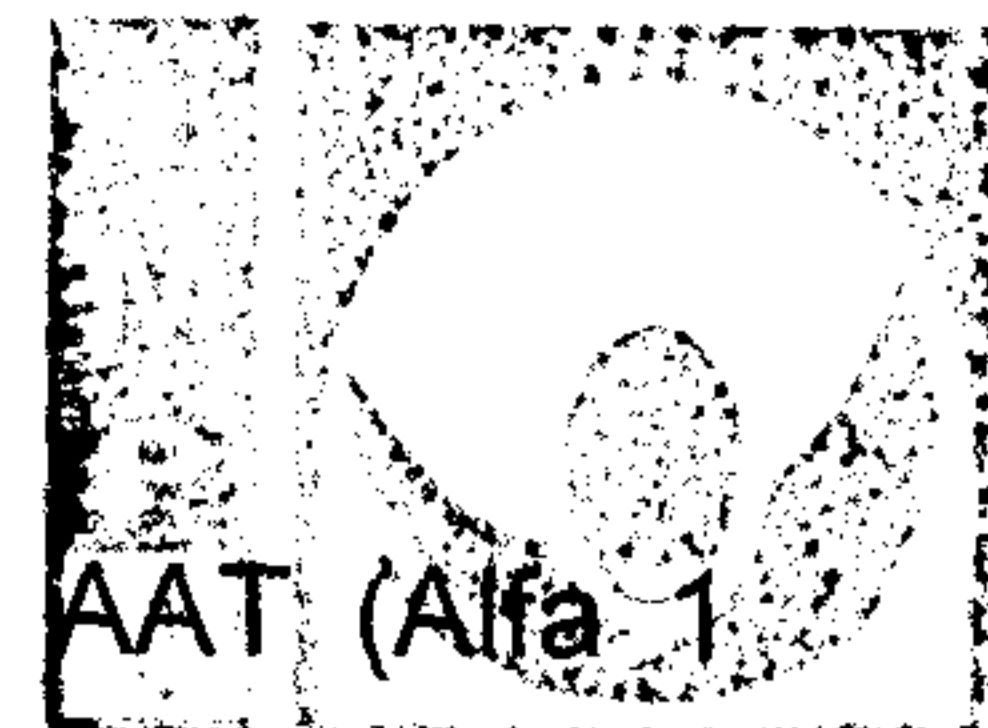




min, 2 Grd 1000V/0:30 min, 3 Gd 5000V/1:30 min, 4 Stp 5000V/0:35 min. Las tiras IPG fueron equilibradas con DTT (1% w/v) buffer de equilibrio (tris HCl pH 8.8 75mM, Glicerol 29% (v/v), SDS 2%(v/v), 1% azul de bromofenol 0.002% (w/v), Agua bidestilada) durante 20 min, Yodoacetamida (2.5% w/v) buffer de equilibrio. La electroforesis se realizo en geles de poliacrilamida a una concentración 12% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%; 4X Tris-Cl/SDS pH8.8; Agua destilada; Persulfato de amonio 10%, TEMED). Finalmente fueron teñidos con plata (Proteo Silver Silver Stain Kit). Las imágenes de electroforesis bidimensional fueron capturadas utilizando Molecular Imager Gel Doc XR y analizados por Quantity One Software para calcular el peso molecular de las proteínas.

**Fase 2.- Inmuno-Blot en 2D.** Se realizaron ensayos de Immuno-Blot de doble dimensión, geles 2-DE que contienen las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas posteriormente se incubaron de 6 a 48h, preferentemente 18 horas de 2°C -6°C preferentemente a 4°C con sueros de pacientes sanos y con cáncer de mama (1:25 - 1:500 preferentemente 1:200 las diluciones), se lavó de 3 a 6 veces preferentemente cinco con solución de lavado PBS-Tween20 0,1%.

**Fase 3.- Aislamiento de la proteína A1AT e Immuno-Blot en 1D.** Para la validación individual, se realizaron ocho geles 2-DE; geles que contienen la manchas de proteína correspondientes a Alfa 1 Antitripsina fueron removidos de los geles 2-DE y usados para realizar la electro-elución de las proteínas de 2-8 h preferentemente por 4 horas a 10 mA. Al purificado Alfa 1-antitripsina se le realizo electroforesis en gel preparativo de poliacrilamida 11%. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear, pequeñas fracciones se obtuvieron de la membrana de nitrocelulosa de preparación y se incubó de 6 a 48h, preferentemente durante 18 horas, de 2°C - 6°C preferentemente a 4 ° C con sueros de 20 controles sanos y 25 pacientes con cáncer de mama de manera individual (1:25 - 1:500 preferentemente 1:100 dilución), las membranas fueron lavadas de 3 a 6 veces preferentemente cinco con PBS-Tween20 0,1%. La membrana se incubó de 30 min. a 5 h preferentemente 3 horas con un anticuerpo cabra anti IgG (H + L) de humano acoplado a Biotina a una dilución de 1:2500 - 1:10000 preferentemente 1:5.000, se realizaron lavados de 3 a 6 veces preferentemente cinco con PBS-Tween20 0,1%, y posteriormente se incubaron con HRP-estreptavidina peroxidasa (KPL) por 30 minutos y se visualizaron por quimioluminiscencia con solución una solución reveladora de color HRP. Figuran 3, Tablas 2 y 3.



Para una mejor comprensión, del mejor método para la identificación del AAT (Alfa-1 Antitripsina = A1AT) y el uso de esta proteína para el Diagnóstico e Inmunodiagnóstico de cáncer de mama para la identificación de la presencia de autoanticuerpos anti-A1AT y para la correlación de la presencia de los autoanticuerpos contra la A1AT y la presencia de cáncer de mama en etapas tempranas (etapa II), se muestra a continuación en el:

### EJEMPLO DE APLICACIÓN DE LA INVENCION

1.- Obtención de sueros cáncer de mama y de personas sanas.

Se obtuvo sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y personas sanas, la sangre se centrifugó (4°C, 3000 g/15 minutos), una vez obtenido el suero, se sometió a microfiltración (poro de 0,2 µm) y se almacenó en alícuotas de 100µl a -80°C (hasta su uso).

En total se analizaron 45 casos: 25 pacientes con cáncer de mama recién diagnosticados sin haber sido sometidos a tratamiento, incluyendo cirugía, quimioterapia y tratamiento hormonal provenientes de la División de Oncología y Hematología, Instituto Nacional del Seguro Social (IMSS) a partir de junio 2008 a julio 2009, y 20 personas controles sanos, que fueron los donantes voluntarios en el IMSS y el CIBO (Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente) a los cuales se les realizaron los estudios de rutina para demostrar su estado de salud, de septiembre 2008 a febrero 2009, los resultados de todas las revisiones, incluyendo la mastografía, no mostraron nada que pudiera ser considerado como evidencia de malignidad. La edad media de las 20 mujeres voluntarias sanas en el momento de toma de muestras de sangre fue de 37 años de edad. A las 20 mujeres voluntarias, se les explico el objetivo de este estudio y también firmaron el consentimiento informado, se elaboro y preparo de la misma manera que de los 25 pacientes con Cáncer de Mama. Las muestras de suero que se obtuvieron de los pacientes con cáncer de mama recién diagnosticado fueron clasificadas como carcinoma ductal infiltrante antes de la extirpación del tumor primario o un tratamiento. En ninguno de los pacientes controles sanos había otros tumores malignos o cualquier otra enfermedad autoinmune. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar en el estudio (Tabla 1).

2.- Pre-clarificación y precipitación de proteínas de sueros.

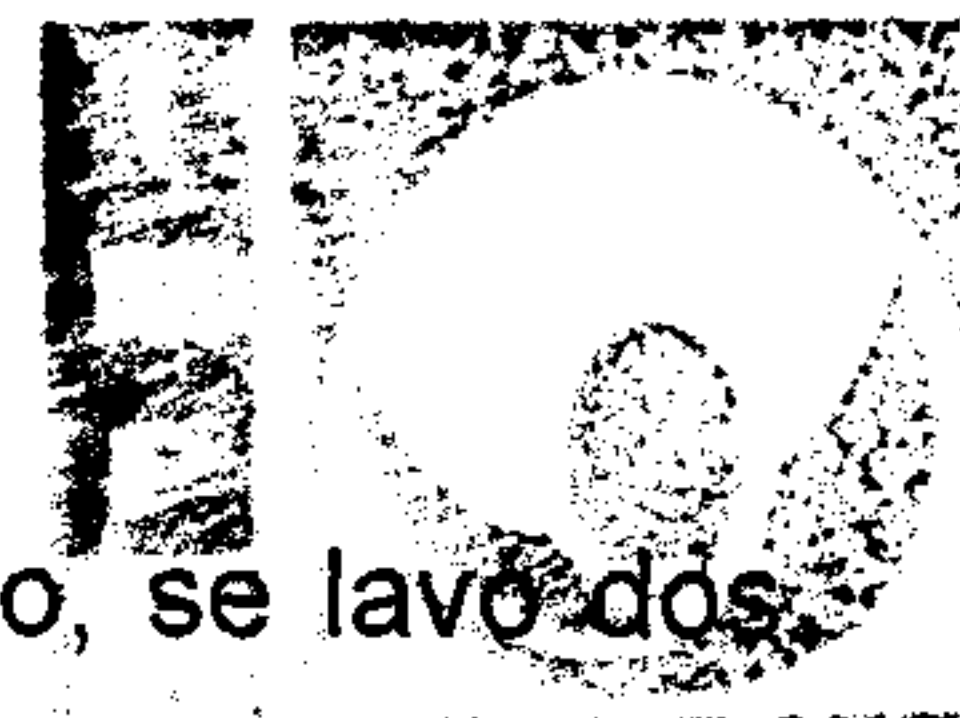




Los sueros se obtuvieron después de él diagnóstico por mastografía. Los diagnósticos definitivos se realizaron por medio de biopsia. El suero de 25 pacientes con cáncer de mama y de 20 individuos sanos son los que se utilizaron posteriormente. Los sueros se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  se procesaron para su análisis en 2-DE. Para este análisis se realizó una depleción de proteínas abundantes del suero por medio de Proteoprep 20 Plasma Immunodepletion Kit (Sigma-Aldrich) se siguió el protocolo de fabricante. Los volúmenes de  $30\mu\text{L}$  de suero fueron pasados a través de las columnas. Las muestras de sueros depletadas de proteínas (fracciones a flujo continuo) se precipitaron con acetona fría ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) por 2 h (volumen muestra-acetona, 1:4). Las muestras se centrifugaron a  $8000\text{ g}$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , y los "pellets" de proteínas se resuspendieron en solución de rehidratación para electroforesis bidimensional Figura. 1.

### 3.- Caracterización de la A1AT por Espectrometría de Masas.

Del gel de poliacrilamida de dos dimensiones (2-DE) teñido con ProteoSilver Silver Stain Kit fueron extraídas las manchas de proteínas correspondientes a los puntos positivos identificados por Western-blot. Las manchas de los geles fueron digeridas con tripsina Gharahdaghi et al (1999). electroforesis de 1999, 20, 601-605, y se lavo con varios cambios de agua hasta que no se vio el color amarillo. El agua fue eliminada y reemplazada con  $100\mu\text{l}$   $0.01\text{M}$  DTT/ $0.1\text{M}$  Tris, pH 8,5, y el tubo fue colocado en un calentador a  $55^{\circ}$  para 1-2h. Tras enfriar el tubo a temperatura ambiente, el líquido fue eliminado y reemplazado con  $100\mu\text{l}$   $0.015\text{M}$  iodoacetamide/ $0.1\text{M}$  Tris, pH 8,5. Esto se dejó reaccionar durante 30 min. en oscuridad, después el líquido se retiró y el gel se lavo con acetonitrilo/ $0.05\text{M}$   $2 \times 30\%$  Tris, pH 8,5 durante 15 min con agitación. El gel se deshidrató durante unos minutos luego se remojó en  $200\mu\text{l}$  acetonitrilo. El acetonitrilo se retiró y el gel se secó completamente durante 30 minutos en el concentrador Vacufuge. Los geles se rehidrataron con  $0.020\mu\text{g}$  de tripsina y  $0.1\mu\text{g}$  Lys-C en la cantidad mínima de  $0.025\text{M}$  Tris, pH 8,5, y los tubos fueron colocados en un bloque de  $32^{\circ}\text{C}$  de calentamiento durante toda la noche. Los péptidos se extrajeron con  $2 \times 50\mu\text{l}$   $50\%$  acetonitrilo /  $2\%$  TFA y los extractos combinados se secaron, y después se resuspendió en una solución matriz. La solución Matrix fue elaborada tomando de  $10\text{ mg / ml}$  de solución de ácido 4-hidroxi- $\alpha$ -cyanocinnamic en  $50\%$  acetonitrilo/ $0.1\%$  TFA y la adición de dos normas internas, la angiotensina y la insulina bovina, a la solución de la matriz. El secado para digerir fue disuelto en  $3\mu\text{l}$  de matriz / solución de referencia y  $0,7\mu\text{l}$  fue

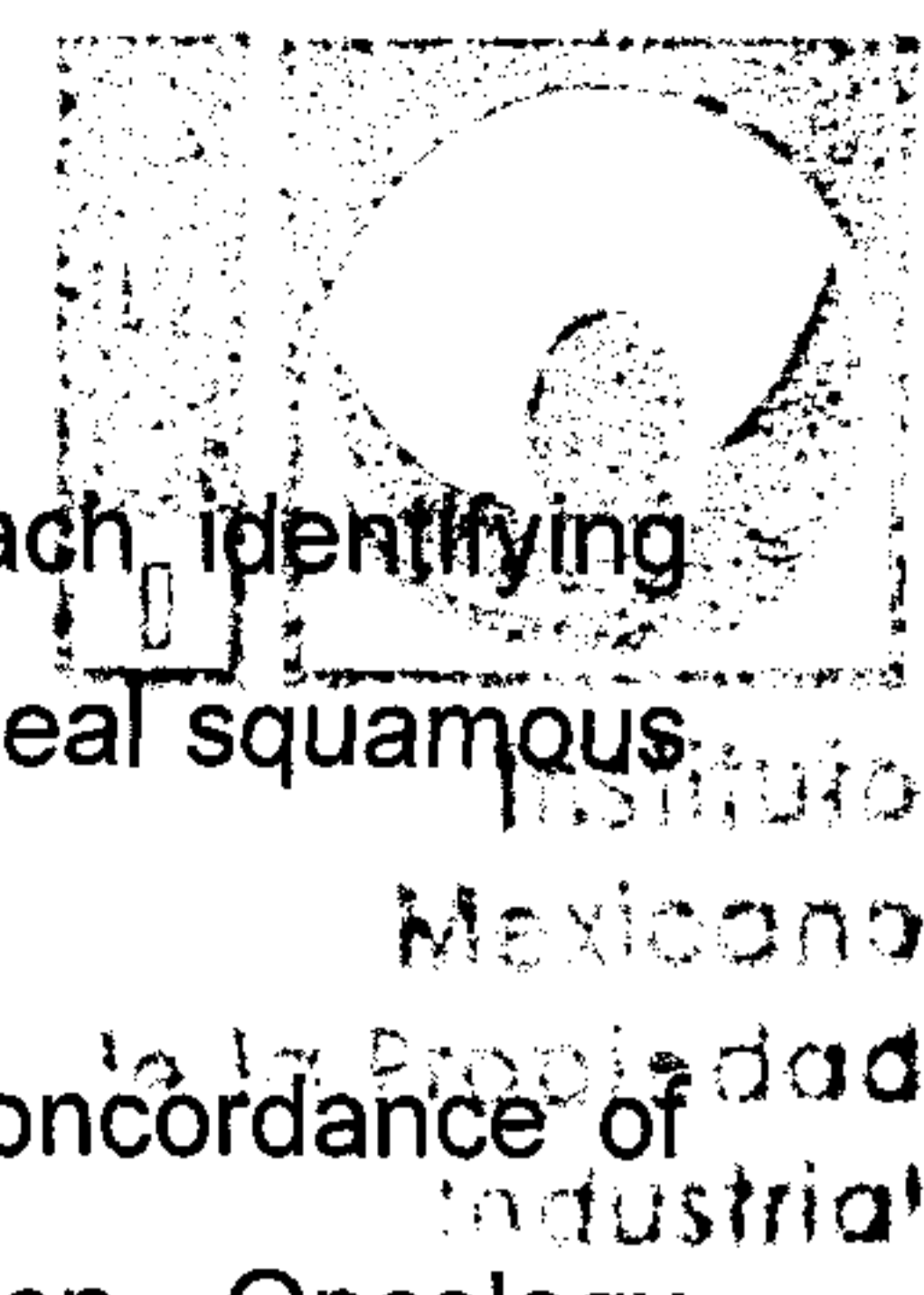


captada en la placa de muestra. Cuando la mancha se secó por completo, se lavó dos veces con agua. Brevemente, el análisis de espectrometría de masas MALDI se realizó usando un espectrómetro de masas PerSeptive Voyager DE-Pro en modo lineal. La búsqueda de los mapas peptídicos se realizó con la ayuda de programas y en la base de datos GenPept (<http://129.85.19.192/profound-bin/WebProFound.exe> y MS-Fiten <http://prospector.ucsf.edu>), Figura. 2.

### DOCUMENTOS CITADOS

- 1.- Chapman C, Murray A, Chakrabarti, Thorpe A, Woolston C, Sahin U, Barnes A. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Ann Oncol* 2007; 18:868-73.
2. Tabar L, Fagerberg CJ, Gad A, et al. Reduction in mortality from breast cancer after mass screening with mammography. Randomised trial from the Breast Cancer Screening Working Group of the Swedish National Board of Health and Welfare. *Lancet* 1985;1: 829 – 32.
- 3.- Desmetz C, Bibeau F, Boissiere Proteomics based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in early stage breast cancer and ductal carcinoma *in situ*. *J Proteome Res* 2008;7:3830-7.
4. Pereira-Faca SR, Kuick R, Puravs, et Identification of 14-3-3  $\theta$  as an antigen that induces a humoral response in lung cancer. *Cancer Res* 2007;67:12000-6.
- 4.- Park BW, Oh JW, Park SH, Kim KS, Lee KS. Preoperative CA15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes. *Ann Oncol* 2008;19:675-81.
5. Downes MR, Byrne JC, Dunn MJ, Fitzpatrick JM, Watson RW, Pennington SR. Application of proteomic strategies to the identification of urinary biomarkers for prostate cancer: a review. *Biomarkers* 2006;11:406 – 16.
- 6.- Chang JW, Kang UB, Kim DH, et al. Identification of circulating endorepellin LG3 fragment: potential use as a serological biomarker for breast cancer. *Proteomics Clin Appl* 2008;2:23 – 32.
- 7.- Caron M, Choquet-Kastylevsky G, Joubert-Caron R. Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1115 – 22.
- 8.- Fernández-Madrid F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer letters* 2007;230:187-98.





9.- Fujita Y, Nakanishi T, Hiramatsu M, et al. Proteomics-based approach identifying autoantibody against peroxiredoxin VI as a novel serum marker in esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2006;12:6415 – 20.

10. Volkmann M, Sinn HP, Gaugel D, et al. Anti-p53 in breast cancer: concordance of different assay procedures and association with p53 antigen expression. Oncology 5 2002;63:297 – 305.

11. Douglas DT, Cicek GT, Lynn PP. Patient-derived tumor-reactive antibodies as diagnostic markers for ovarian cancer. Gynecol Oncol 2009;115:112-120.

12. Disis ML, Pupa SM, Gralow JR, Dittadi R, Menard S, Cheever MA. High-titer HER-10 2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. J Clin Oncol 1997;15:3363–7.

13. Desmetz C, Bascoul-Mollevi C, Rochaix P, Lamy PJ, Kramar A, Rouanet P, Maudelonde T, Mangé A, Solassol J. Identification of a New Panel of Serum Autoantibodies Associated with the Presence of *In situ* Carcinoma of the Breast in 15 Younger Woman. Clin Cancer Res 2009;15:4733-41.

14. Tamesa MS, Kuramitsu Y, Fujimoto M, Maeda N, Nagashima Y, Tanaka T, Yamamoto S, Oka M, Nakamura K. Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. Electrophoresis 2009;30:2168-2181.

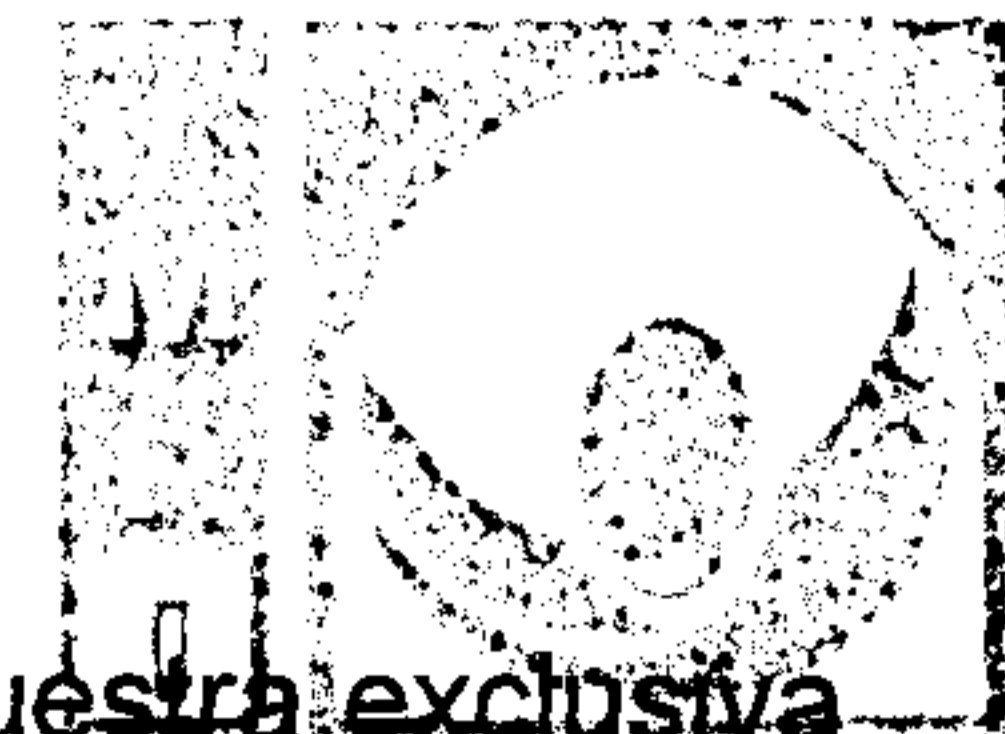
20 15. Yi JK, Chang JW, Han W, Lee JW, Ko E, Kim HD, Bae JY, Yu J, Lee Ch, Yu MH, Noh DY. Autoantibody to Tumor Antigen, Alpha 2-HS Glycoprotein: A Novel 2 Biomarker of Breast Cancer Screening and Diagnosis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009;18:1357-64.

25 16. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol 2007;25:5287 – 312.

30

## REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficientemente nuestra invención, consideramos de nuestra exclusiva propiedad lo contenido en las siguientes cláusulas:



Instituto  
Mexicano

de Propiedad  
Industrial

- 5 1. Un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de mama en etapas I y II, el cual presenta una sensibilidad de 96% y una especificidad de 90% y cuyo método se caracteriza porque se detectan, en una muestra de suero, autoanticuerpos contra un solo antígeno asociado a tumor (AAT) que es la proteína A1AT.
- 10 2. Un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de mama en etapas I y II, el cual presenta una sensibilidad de 96% y una especificidad de 90% de acuerdo a reivindicación 1, caracterizado porque el diagnóstico es carcinoma ductal.
- 15 3. Un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de mama en etapas I y II, el cual presenta una sensibilidad de 96% y una especificidad de 90% de acuerdo a reivindicación 1, donde la sensibilidad y especificidad es obtenida porque los sueros de los pacientes con cáncer de mama presentan anticuerpos que reconocen a la proteína A1AT presente sobre las membranas de nitrocelulosa.
- 20 4. Un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de mama en etapas I y II, el cual presenta una sensibilidad de 96% y una especificidad de 90% de acuerdo a reivindicación 1, donde la detección de autoanticuerpos es por ensayos tipo Western Blot a partir de proteína A1AT purificada de suero sanguíneo de pacientes con cáncer de mama en las etapas I y II.
- 25 5. Un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de mama en etapas I y II, el cual presenta una sensibilidad de 96% y una especificidad de 90% de acuerdo a reivindicación 1, donde la proteína es usada para la identificación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos específicos (contra ella misma) y permite identificar la persona con cáncer en etapa temprana (Etapa I y II) y personas sin cáncer.
- 30 6. Un kit que comprende la proteína A1AT soluble o inmovilizada sobre tiras de NC o PVDF para detectar cuantitativa y cualitativamente autoanticuerpos séricos específicos o de algún otro fluido corporal contra la proteína A1AT.
7. El uso de un kit que comprende la proteína A1AT de acuerdo a reivindicación 6 para la identificación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos contra ella misma en muestras biológicas como orina, fluidos orales, sangre, suero sanguíneo,





secreciones de glándula mamaria, lavados vaginales, de individuos/pacientes con cáncer de mama.

- 5
8. Un kit que comprende la proteína A1AT de acuerdo a reivindicación 6 caracterizado porque la proteína es usada como antígeno para la identificación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos contra ella misma en orina, lavados vaginales, lágrimas y secreciones de glándula mamaria.
- 10
9. Un kit que comprende la proteína A1AT de acuerdo a reivindicación 6 caracterizado porque la proteína es usada como antígeno para la identificación cualitativa y cuantitativa de autoanticuerpos contra ella en fluidos orales de pacientes con cáncer de mama en etapas I y II.
- 15
10. Un kit que comprende la proteína A1AT de acuerdo a reivindicación 6, caracterizado porque comprende un soporte sólido para unir a la proteína A1AT y las instrucciones para utilizar el soporte sólido con la A1AT unida para detectar cuantitativa y cualitativamente autoanticuerpos séricos específicos o de algún otro fluido corporal contra la proteína A1AT.

20

## RESUMEN



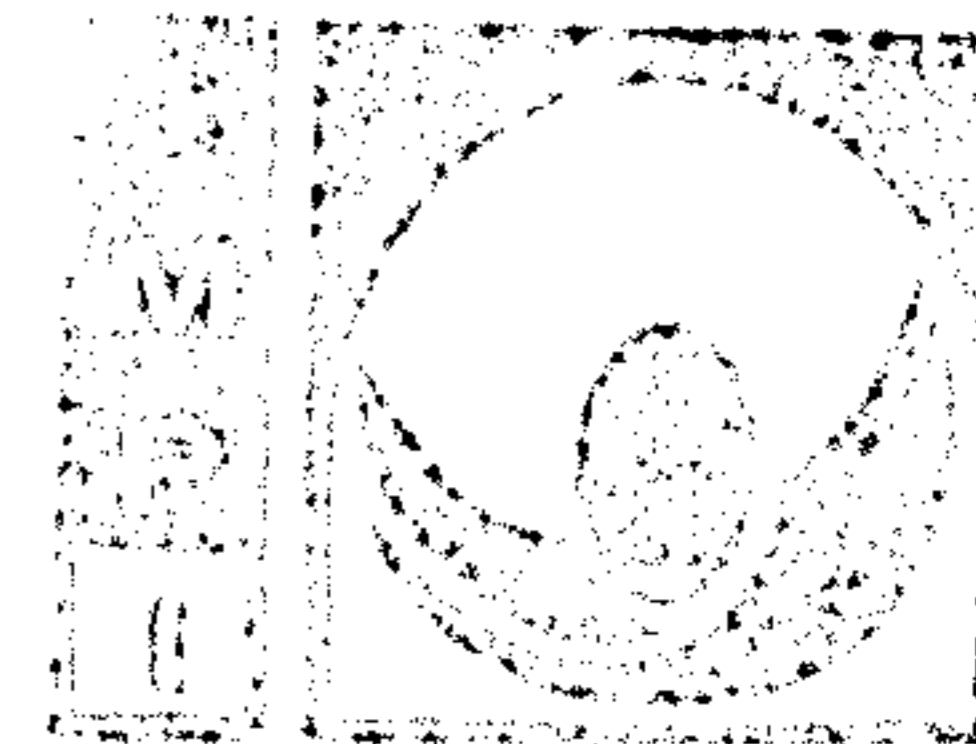
Se ha demostrado que sueros de pacientes con cáncer contienen anticuerpos que reaccionan con autoantígenos llamados antígenos asociados a tumor (AAT). En el presente estudio se realizó inmunoproteómica de sueros de 25 pacientes con cáncer de mama en etapa II, y sueros de 20 donantes sanos para la detección de AATs. Las muestras de suero pre-clarificadas se sometieron a 2DE y transfirieron a membrana de nitrocelulosa (NC), estas se incubaron con sueros de pacientes con Cáncer de Mama y donantes sanos. Comparando los patrones de Western-Blot de 2D, tres proteínas fueron reconocidas por anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con cáncer y no por los de personas sanas. Las tres proteínas se obtuvieron de los geles de 2D, se analizaron por MALDI-MS. Los resultados mostraron que la proteína es la alfa-1-antitripsina (A1AT). Un análisis 1DE de Western-blot se realizó con la proteína purificada confirmando la presencia de anticuerpos anti-A1AT (contra la A1AT) en el suero de los pacientes, detectándose estos anticuerpos en 24 de 25 con cáncer de mama (96%) y en 2 de 20 controles (10%). Nuestros resultados sugieren que la A1AT y anticuerpos contra esta proteína son útiles como marcadores para la detección del cáncer de mama y el diagnóstico en etapas tempranas (etapas I y II).

20

25

30





Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

1/3

FIGURA 1

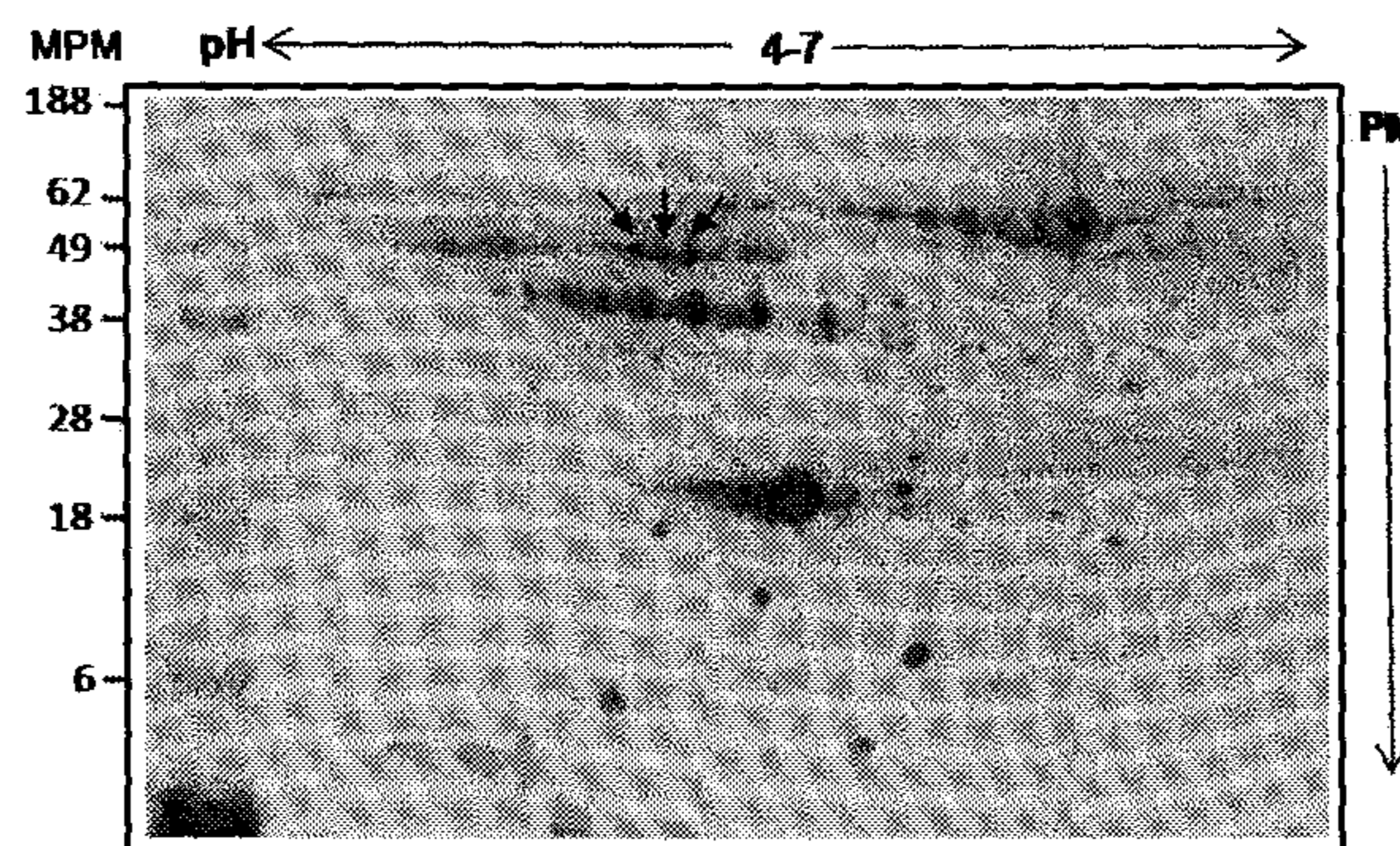


FIGURA 2

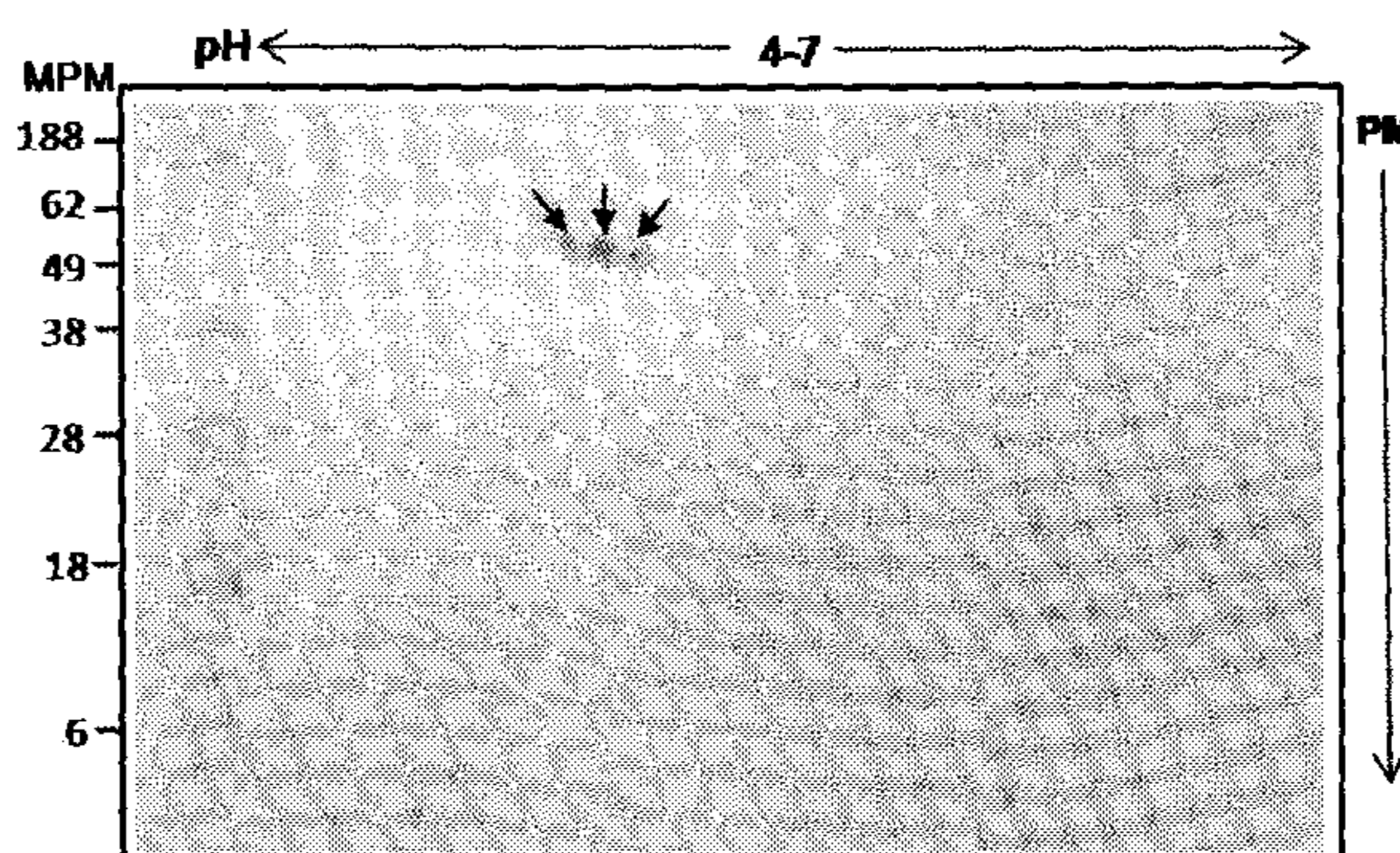
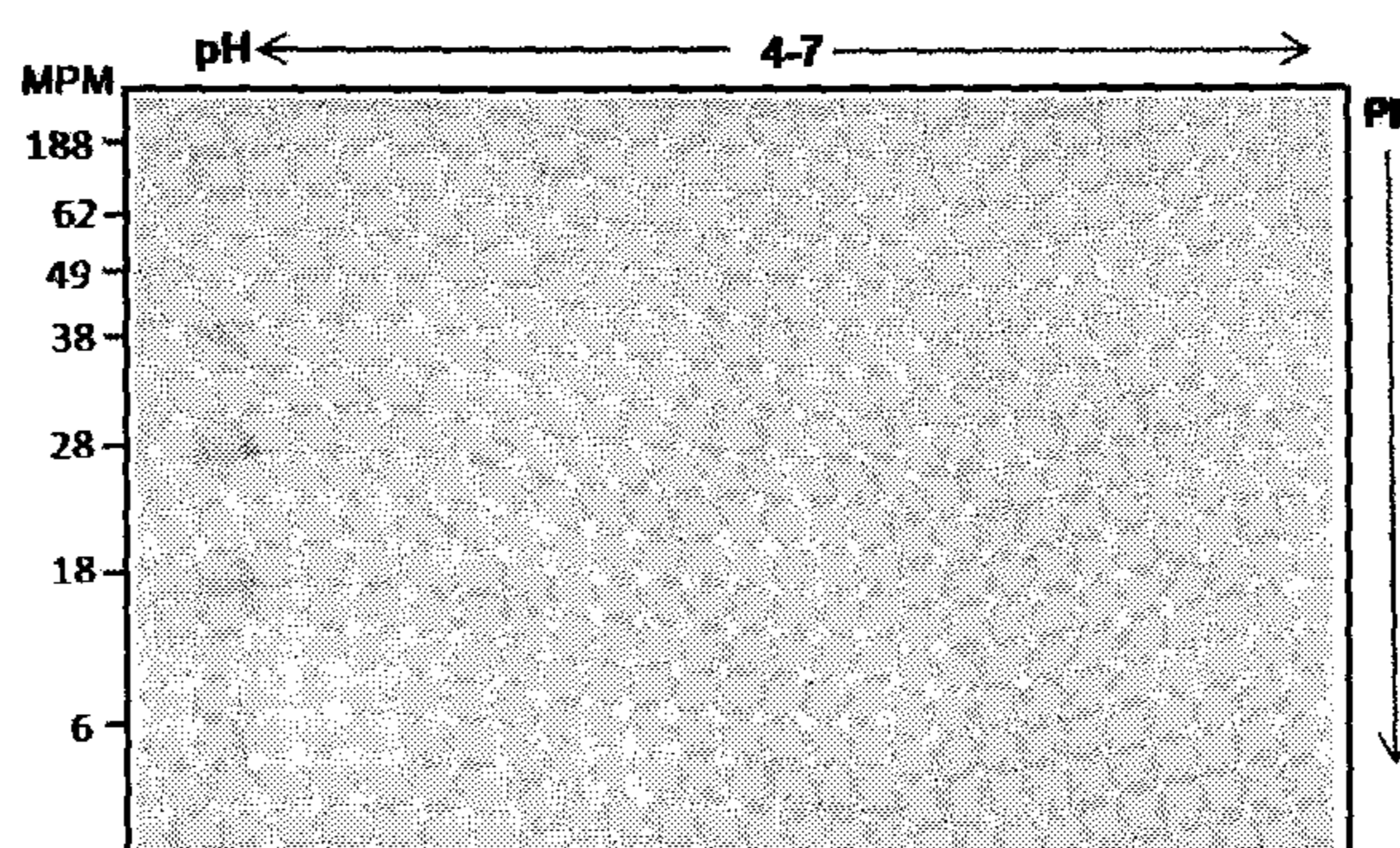
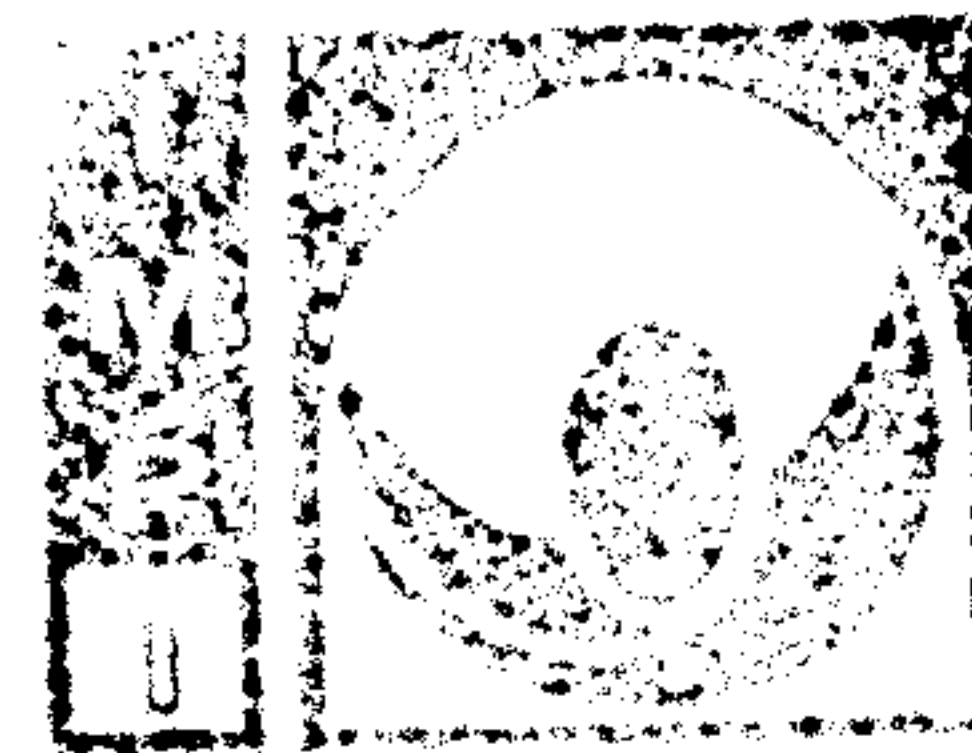


FIGURA 3



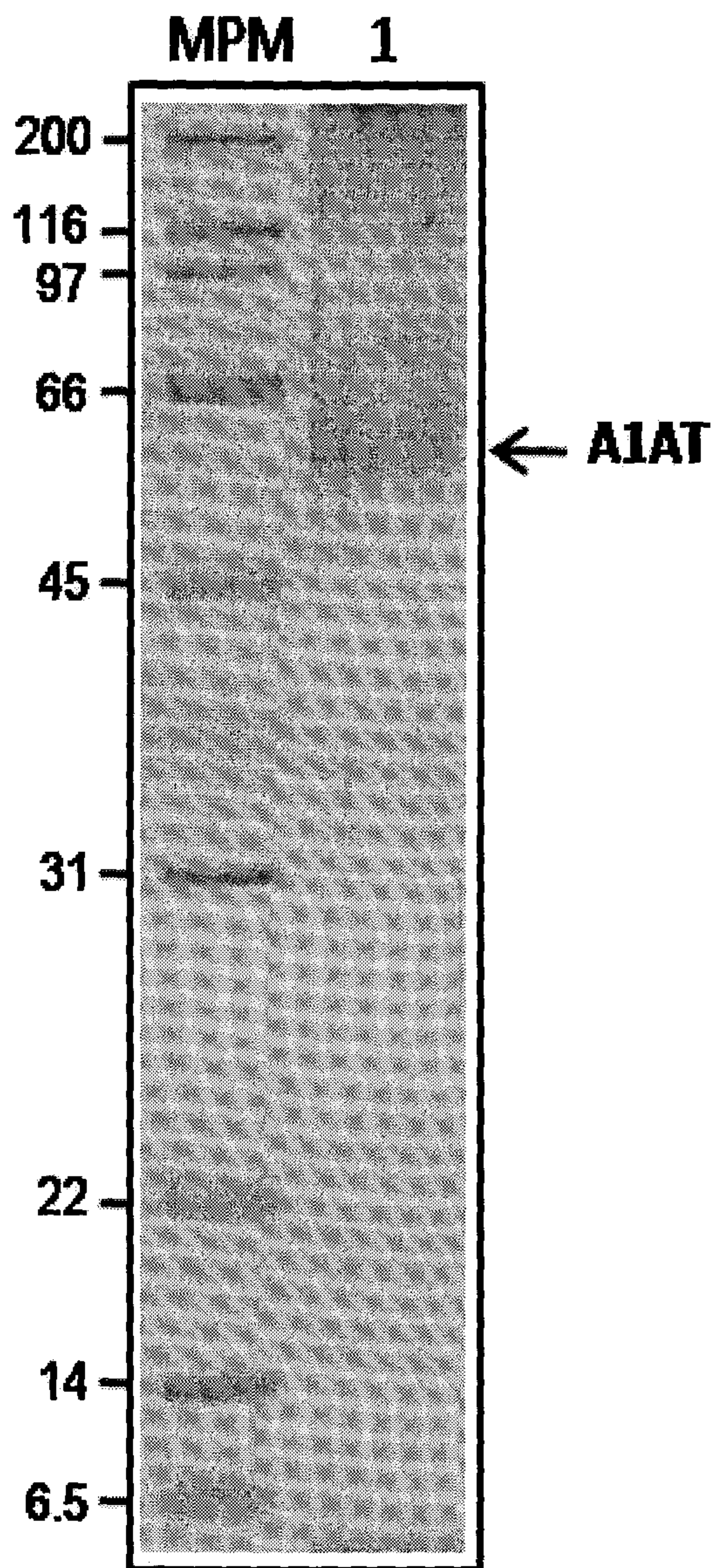




Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad Industrial

2/3

FIGURA 4







Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

FIGURA 5

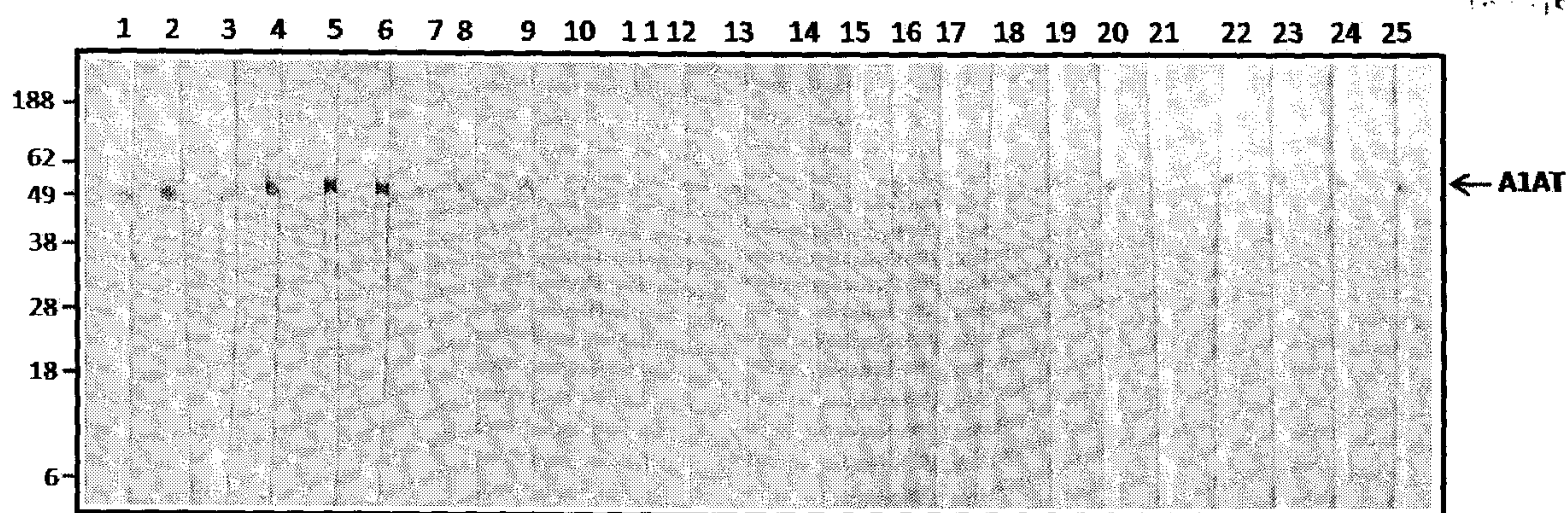


FIGURA 6

