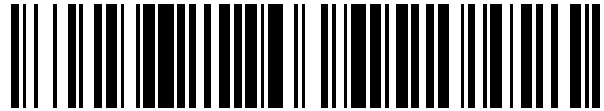


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 730**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2007 E 07725949 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 2024748**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-anexina A3 para la detección de carcinoma de próstata**

30 Prioridad:

09.06.2006 US 812089 P
17.11.2006 US 859489 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2013

73 Titular/es:

PROTEOSYS AG (100.0%)
CARL-ZEISS-STRASSE 51
55129 MAINZ, DE

72 Inventor/es:

SCHRATTENHOLZ, ANDRÉ

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 396 730 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

Anticuerpos monoclonales anti-anexina A3 para la detección de carcinoma de próstata

5 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de carcinoma de próstata, que comprende la determinación de anexina A3, particularmente de anexina A3 extracelular con anticuerpos altamente específicos, particularmente con anticuerpos monoclonales. La presente invención se refiere, además, a un reactivo de ensayo que comprende este tipo de anticuerpos.

10 En los hombres, el carcinoma de próstata figura primero entre las incidencias malignas y, a pesar de una agresividad biológica moderada en comparación con otras entidades tumorales, en segundo lugar entre muertes inducidas por el cáncer (Greenlee et al., 2000). Existen excelentes opciones curativas para fases localmente limitadas, a saber cirugía (Huland, 2001a) y/o terapia de radiación (Wiegel, 1998), mientras que en el caso de fases avanzadas se pueden utilizar métodos de ablación hormonal, meramente eficaces temporalmente. Al progreso que se produce recientemente de la enfermedad inicial durante la terapia de ablación hormonal, habitualmente al cabo de 2-3 años, se le alude como estado homono-refractario. Actualmente existen sólo opciones de terapia paliativa para el carcinoma de próstata homono-refractario (Knox y Moore, 2001).

20 Por consiguiente, es de importancia crucial diagnosticar el carcinoma de próstata en una fase temprana. Con PSA, el antígeno prostático específico, está disponible un marcador tumoral en suero altamente sensible para el diagnóstico inicial (Stamey et al., 1987) y la acción posterior (Haese et al., 1999) del carcinoma de próstata.

25 Dado que el PSA es, en gran medida, específico para el órgano, pero no específico para tumores, la enfermedad benigna de la próstata puede asociarse también con un aumento de PSA que excede el intervalo de 4 ng/ml, considerado como límite superior. La producción posterior invasiva de al menos 10 biopsias por sacabocado de próstata obtenidas de modo transrectal representa actualmente el patrón de oro en el diagnóstico definitivo de carcinoma de próstata en esta situación (Miller y Weißbach, 1999a,b). Sin embargo, hasta el 25% de los pacientes que padecen complejidades relevantes hacen necesaria una consulta adicional (13% de los pacientes) y una hospitalización (aproximadamente 6% de los pacientes afectados) (Lujan et al., 2001; Djavan et al., 2001). Aparte del riesgo de una infección del tracto urinario o el riesgo de la prostatitis, predominan una hemorragia y el dolor de la operación como incidencias indeseadas adicionales, las cuales son contrarrestadas en algunas pocas instituciones solamente llevando a cabo medidas de anestesia local (Irani et al., 1997; Issa et al., 2000; Alavi et al., 2001). Una biopsia por sacabocado, llevada a cabo en el caso de aproximadamente el 75% de los pacientes con valores de PSA en el intervalo entre 4-10 ng/ml mostrará hallazgos diagnósticos negativos, es decir, benignos (Huland, 2001b). Si la indicación para llevar a cabo biopsias por sacabocado de próstata se derivó ya de valores de PSA que partían de 2,5 ng/ml, tal como se sugiere actualmente por algunos autores (Djavan et al., 1999; Okihara et al., 2001), sería de esperar que este método invasivo de examen físico lo padecieran cada cuarto hombre de edades comprendidas entre 50 y 75 años (Huland, 2001b).

40 Por lo tanto, son de elevado interés para el diagnóstico de carcinoma de próstata nuevos marcadores con una especificidad potenciada frente a PSA, incluidas sus sub-formas (Jung et al., 2001; Makinen et al., 2001), ya que éstos podrían definir mejor las indicaciones para llevar a cabo biopsias por sacabocado invasivas y, así, podrían reducir el número de pacientes que se vieran sometidos a este examen. Un marcador de tumores adecuado también para material de sonda, obtenido de forma no invasiva tal como plasma u orina exprimida con un espectacular especificidad, podría así ser el marcador de anexina A3 (ANXA3) recientemente caracterizado (Wozny et al., 2006).

50 ANXA3 es un representante más bien raro de la familia de anexinas, una clase de proteínas efectoras de Ca^{2+} que llevan a cabo sus efectos versátiles uniéndose a fosfolípidos particulares. Pueden formar redes sobre la superficie de la membrana y, así, organizan microdominios de la membrana y reclutan focos para proteínas interactuantes (Gerke et al., 2005).

55 Con ello, las anexinas juegan importantes papeles en la diferenciación celular, la migración de células y también en la inmunomodulación. Aparte de la estructura de la membrana y del transporte de la membrana, existen también interacciones proteína-proteína independientes de la membrana y de fosfolípidos de las anexinas (Rescher y Gerke 2004; Gerke y Moss, 2002). Las anexinas participan como componentes principales de vesículas de la matriz en la formación del cartílago y la mineralización de los huesos (Wang et al., 2003). La expresión diferencial de ANXA3 es particularmente interesante con respecto a la frecuencia inusual de la aparición de metástasis en los

huesos osteoblásticas en el caso del carcinoma de próstata (Keller et al., 2001).

ANXA3 se produce de modo intracelular así como extracelular (Carlson et al., 2004), por ejemplo en exosomas en la orina (Pisitkun et al., 2004). Los exosomas son derivados de los denominados "cuerpos multivesiculares" y pueden jugar un papel alternativo, pero decisivo en la presentación de antígenos de células inmunes (Schartz et al., 2002). Los exosomas detectados en la orina son posiblemente idénticos a los denominados prostasomas descritos ya en una fecha anterior (Arienti et al., 2004; Utleg et al., 2003), en cualquier caso, ambos contienen ANXA3.

Biomarcadores de proteínas para la terapia o el diagnóstico de cáncer de próstata y otros cánceres epiteliales del tracto urogenital se describe en los documentos US 2005 130 876, WO 03 086 461, WO 2005 078 124, EP 05 011 042.8 y EP 05 026 092.6.

El documento WO 2005/078124 describe el uso de proteína ANXA3 como marcador diagnóstico para el cáncer de próstata. Además de ello, el documento WO 2005/078124 describe el uso de antagonistas o agonistas para el tratamiento de cáncer de próstata. El antagonista o agonista puede ser un anticuerpo.

El documento WO 03/009814 describe marcadores para el cáncer de próstata, entre ellos también se menciona a ANXA3.

Diakonova et al. (Journal of Cell Science 1997, 110:1199-1213) describe la localización de anexinas en macrófagos y fagosomas. Con ello, se utiliza un antisuero que es monoespecífico para ANXA3.

Le Cabec et al. (1992, 189(3):1471-1476) describe la expresión diferencial de dos formas de ANXA3 en neutrófilos y monocitos humanos detectados mediante un suero inmune dirigido contra ANXA3.

Sin embargo, métodos previos para la determinación de ANXA3 adolecen de la baja especificidad de anticuerpos disponibles que muestran una reactividad cruzada considerable hacia otras anexinas. Así, el objeto de la presente invención era proporcionar un método para determinar carcinoma de próstata que permitiera un diagnóstico muy específico en una fase temprana de la enfermedad.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de cáncer de próstata, en el que se analiza una muestra en cuanto a la presencia y/o cantidad de anexina A3 que, esencialmente, no tiene ninguna reactividad cruzada contra otras anexinas, en donde el anticuerpo se produce por la línea de células de hibridoma tgc 7 ProVII5C5 o un anticuerpo que se une al mismo epítipo sobre anexina A3.

La línea de células de hibridoma tgc 7 ProVII5C5 ha sido depositada el 5 de mayo de 2006 con el número de acceso DSM ACC2780 en la DSMZ, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, de acuerdo con el Tratado de Budapest.

Otro aspecto es un anticuerpo específico para anexina A3 que no tiene esencialmente reactividad cruzada alguna contra otras anexinas, en donde el anticuerpo se produce por la línea de células de hibridoma tgc 7 ProVII5C5 (DSM ACC2780) o un anticuerpo que se une al mismo epítipo sobre anexina A3.

Un aspecto adicional de la presente invención es un reactivo de ensayo para el diagnóstico del cáncer que comprende al menos un anticuerpo de la presente invención, específico para anexina A3, que tiene una baja reactividad cruzada contra otras anexinas.

Todavía un aspecto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende, en calidad de agente activo, un anticuerpo de la presente invención, específico para anexina A3 que tiene una baja reactividad cruzada contra otras anexinas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Todavía un aspecto adicional de la invención es un anticuerpo de la presente invención específico para anexina A3 que tiene una baja reactividad cruzada contra otras anexinas.

Todavía un aspecto adicional de la presente invención es una célula, particularmente una célula de hibridoma que produce un anticuerpo según se describe arriba.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente solicitud, comprende también fragmentos de anticuerpo que tienen al menos un dominio de unión a antígenos tales como fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂, o anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de los mismos tales como fragmentos Fv.

5 El anticuerpo no tiene reactividad cruzada detectable alguna contra otras anexinas tales como anexina 5, anexina 6 y/o anexina 8, según se determina mediante análisis densitométrico de borrones de transferencia Western después de tinción con plata. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales. El anticuerpo monoclonal puede ser también un anticuerpo monoclonal quimérico o un anticuerpo monoclonal humanizado, obtenible al humanizar regiones de marco no humanas, constantes y opcionalmente variables.

15 Anticuerpos monoclonales preferidos pueden obtenerse inmunizando un animal experimental, p. ej. un ratón, rata, conejo, etc. con ANXA3 purificada o fragmentos de la misma, particularmente fragmentos N-terminales de la misma y obteniendo células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales deseados de acuerdo con métodos convencionales. Más preferiblemente, el anticuerpo está dirigido contra un epítipo en la región N-terminal de anexina A3 humana (también designada Anexina III, Lipocortina III, proteína anticoagulante placentaria III (PAP-III), 35-alfa-calcimedina o inositol-1,2-cíclico fostato-2-fosfohidrolasa), particularmente en la región de los aminoácidos 1-16 de anexina A3 humana (nº de acceso a GenBank P12429). Preferiblemente, el anticuerpo se une a la superficie de células cancerígenas.

20 Anticuerpos monoclonales preferidos se pueden obtener inmunizando un animal experimental, p. ej. un ratón, rata, conejo, etc. con ANXA3 purificada o fragmentos de la misma, particularmente fragmentos que incluyen los 16 aminoácidos N-terminales, p. ej. fragmentos tales como ANX A3 (AA (aminoácidos) 1-324), ANX A3 (AA 1-159) o ANX A3 (AA 1-106); y obteniendo células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales deseados de acuerdo con métodos convencionales. Tal como se ha explicado arriba, anticuerpos monoclonales con una especificidad deseada se pueden obtener mediante procesos de rastreo empleando los fragmentos anteriores o similares para la representación en mapa de epítipos y la correspondiente selección de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a partes N-terminales de ANXA3. Especialmente preferido es también el uso de ANXA3 humana nativa, p. ej. aislada de neutrófilos humanos en calidad de un inmunogen para la generación de anticuerpos monoclonales.

25 Además, anticuerpos humanos monoclonales preferidos dirigidos contra ANXA3 se pueden obtener a partir de individuos humanos, p. ej. pacientes de cáncer humanos u otros individuos. Células B productoras de anticuerpos se pueden aislar de dichos individuos de acuerdo con métodos convencionales.

30 También se describe en esta memoria un anticuerpo monoclonal seleccionado de un anticuerpo producido por las líneas de células de hibridoma tgc 5 ProlI6G7 (DSM ACC2778), tgc 6 ProlIII1G11 (DSM ACC 2779), tgc 8 ProlIII1E1(DSM ACC2781), tgc 13 Prol/5G9, tgc 12 ProlIII/4B11, tgc 14 ProVIII/3D7, o un anticuerpo que se une a los mismos epítipos sobre anexina A3. Anticuerpos que se unen a los mismos epítipos se pueden determinar mediante experimentos competitivos de acuerdo con protocolos convencionales. Las líneas de células de hibridoma anteriores han sido depositadas el 5 de mayo de 2006 (DSM ACC2778, DSM ACC2779 y DSM ACC2781) y el 5 de junio de 2007 (tgc 13 Prol/5G9, tgc 12 ProlIII/4B11, tgc 14 ProVIII/3D7) en la DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, de acuerdo con el Tratado de Budapest.

35 En una realización preferida adicional, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo sobre anexina A3 que comprende una secuencia seleccionada de VRDYPDFSPSVD (SEQ ID NO: 1) o una secuencia contigua parcial de la misma con una longitud de al menos 6 aminoácidos.

40 Una secuencia parcial de SEQ ID NO: 1 especialmente preferida es DYPDFSPSV. Un ejemplo de un anticuerpo dirigido contra un epítipo en la SEQ ID NO: 1 es tgc7 ProVII 5C5 (DSM ACC2780).

45 También se describe en esta memoria un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo sobre anexina A3 que comprende una secuencia seleccionada de

- (i) MLISILTERSNA (SEC ID NO: 2);
- (ii) GDFRKALLTLADGRRDESLKVDEHLAKQ (SEQ ID NO: 3);
- (iii) KLTFDEYRNISQKDIVDSIKGELSG (SEQ ID NO: 4);

(iv) IMVSRSEIDLLDIRTEF (SEQ ID NO: 5);

(v) YSAIKSDTSGDYEITLL (SEQ ID NO: 6);

o una secuencia contigua parcial de la misma, con una longitud de al menos 6 aminoácidos.

5 Una secuencia parcial especialmente preferida de SEQ ID NO: 2 es LISILTERS. Una secuencia parcial especialmente preferida de SEQ ID NO: 3 es FRKALL o SLKVDEHLA. Una secuencia parcial especialmente preferida de SEQ ID NO: 4 es TFDEYRNIS. Una secuencia parcial especialmente preferida de SEQ ID NO: 5 es SRSEIDLLD. Una secuencia parcial especialmente preferida de SEQ ID NO: 6 es AIKSDTSGDEYEI. Ejemplos de anticuerpos dirigidos contra un epítipo en SEQ ID NO: 2 son tgc5 ProlI 6G7 (DSM ACC2778) y tgc6 ProlIII 1611
10 (DSM ACC2779). Ejemplos de anticuerpos dirigidos contra los epítipos en la región C-terminal de ANXA3 humana son tgc 13 Prol/5G9, tgc 12 ProlIII/4B11 y tgc 14 ProVIII/3D7. En particular, anticuerpos preferidos están dirigidos con un epítipo en SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 6.

15 Se pueden obtener anticuerpos adicionales dirigidos contra epítipos en SEQ ID NO: 1-6 inmunizando un animal experimental con polipéptidos o péptidos que comprenden las secuencias de los epítipos, p. ej. ANXA3 humana recombinante, polipéptidos homólogos de otras especies o fragmentos de los mismos.

20 El método de la presente invención se puede llevar a cabo en cualquier formato de ensayo adecuado para determinaciones inmunológicas. En algunos formatos de ensayo, se puede preferir utilizar un anticuerpo que porte un grupo marcador, p. ej. un marcador visual, tal como una perla de látex o de oro, un grupo marcador de fluorescencia, un grupo marcador enzimático, etc. Conjugados de anticuerpos y grupos marcadores se pueden producir de acuerdo con métodos convencionales, p. ej. mediante acoplamiento covalente a grupos laterales de aminoácidos reactivos del anticuerpo tales como grupos carboxi, amino y/o tiol con grupos marcadores, p. ej. a través de moléculas de espaciador bifuncionales.

25 La muestra se obtiene preferiblemente a partir de un sujeto humano. En una realización particularmente preferida, el método de la invención es un proceso de diagnóstico no invasivo, en donde la muestra puede ser, p. ej., una muestra de orina, particularmente una muestra de orina exprimat o una muestra de heces. Si se desea, la muestra puede ser sometida a procesos de tratamiento previo, p. ej. filtración en gel.

30 La muestra se puede someter a un proceso de fraccionamiento que permite la determinación separada de ANXA3 extracelular e intracelular. Por ejemplo, la muestra se puede centrifugar con el fin de obtener un sedimento de células y un sobrenadante, en donde la anexina A3 intracelular se determina en el sedimento de células, y la anexina A3 extracelular se determina en el sobrenadante. En una realización especialmente preferida, el método comprende una determinación selectiva de ANXA3 extracelular.

35 En una realización adicional, el método de la invención puede ser un proceso histoquímico en el que la muestra puede ser una muestra de tejido, particularmente una biopsia, p. ej. una biopsia de sacabocado. En un proceso histoquímico, se puede llevar a cabo una determinación selectiva de ANXA3 extracelular determinando la localización de ANXA3 dentro de la muestra.

40 En el método de la invención, una muestra se clasifica como indicativa de cáncer de próstata cuando la abundancia de ANXA3 extracelular disminuye en los sobrenadantes de la muestra, p. ej. la orina exprimat después de centrifugación a baja velocidad o en sedimentos correspondientes, cuando se compara con pacientes no cancerosos con una diversidad de afecciones que oscilan desde hiperplasia prostática benigna (BPH – siglas en inglés), fibrosis, prostatitis crónica, neoplasia intra-epitelial prostática de diversas fases (PIN 1-3). En comparación con pacientes completamente sanos, las abundancias de ANXA3 parecen estar incrementadas tanto en los sedimentos como en los sobrenadantes. Considerados conjuntamente, cualquier tipo de relación o combinación de cantidades o concentraciones totales de ANXA3 en sobrenadantes y/o sedimentos de orina exprimat que se utilizan
45 para la discriminación diagnóstica de las diversas afecciones mencionadas, está comprendida por la presente invención.

50 La presente invención cubre esencialmente cualquier conjunto de cortes concernientes a abundancias de ANXA3 en diversas fracciones de muestras intracelulares y extracelulares, p. ej. de orina exprimat, accesibles por cualquier tipo de centrifugación diferencial y reacciones relacionadas para fines diagnósticos.

55 El método de la presente invención puede comprender adicionalmente la determinación de marcadores de cáncer adicionales, p. ej. marcadores de cáncer. La determinación de marcadores de adicionales se puede llevar a cabo

5 en la misma muestra en donde se determina ANXA3, o en muestras diferentes, p. ej. muestras de sangre, suero y/o plasma. Especialmente preferida es la determinación de marcadores en sangre, suero o plasma, en particular de al menos un miembro de la familia de proteasas calicreina tal como antígeno específico de la próstata (PSA – siglas en inglés) y/o al menos un marcador de células epiteliales, particularmente antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA – siglas en inglés).

10 El método diagnóstico de la invención puede incluir una determinación de la fase de la enfermedad, en la que se lleva a cabo una diferenciación entre una fase pre-cancerosa tal como PIN y una fase de patología cancerosa. Una determinación de una fase de la patología se basa en la clasificación histológica por patólogos clínicos, la clasificación estándar de cánceres de próstata se realiza de acuerdo con las puntuaciones de Gleason, pero existen otros métodos estadísticos que agrupan cánceres en tres grupos de gravedad creciente. Hasta ahora, estos métodos estadísticos se basan principalmente en criterios morfológicos y requieren expertos experimentados. Para casos de no cáncer, se han descrito las afecciones arriba mencionadas que oscilan desde hiperplasia prostática benigna (BPH), fibrosis, prostatitis crónica, neoplasia intra-epitelial prostática de diversas fases (PIN 1-3). La presente invención se refiere a cualquier tipo de estratificación de cáncer de próstata o fases no cancerosas relacionadas con la próstata utilizando una lectura relacionada con ANXA3 con un conjunto apropiado de cortes de cualquier tipo de fracción de orina exprimat o cualquier otra muestra.

20 La presente invención se refiere también al uso de los anticuerpos anteriores en aplicaciones farmacéuticas, p. ej. para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, particularmente cáncer del tracto urogenital y/o gastrointestinal según se describe arriba, más particularmente cáncer de próstata. En esta realización de la invención, el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado que tiene regiones humanas constantes, p. ej. regiones IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas constantes y, opcionalmente, regiones de marco humanizadas. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano que puede obtenerse a partir del suero de individuos humanos. El anticuerpo terapéutico se une preferiblemente a la superficie de las células de cáncer de próstata.

30 El anticuerpo terapéutico se puede conjugar a una molécula efectora, p. ej. un resto radiactivo y/o citotóxico. Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos pueden administrarse en una dosis terapéuticamente eficaz de, p. ej., 10 a 5000 µg por día hasta 4000 a 1000 µg por día, preferiblemente administrados mediante infusión, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad. Los anticuerpos se pueden administrar por métodos conocidos, p. ej. por vía parenteral de acuerdo con protocolos estándares conocidos para la administración de otros anticuerpos tales como Trastuzumab, Rituximab, Cetuximab, etc. La administración de los anticuerpos se puede combinar con otras opciones terapéuticas, p. ej. la administración de otros anticuerpos anti-tumorales, la administración de agentes citotóxicos, cirugía y/o terapia de radiación.

Además, la presente invención debe explicarse con mayor detalle mediante las siguientes Figuras y Ejemplos.

40 Descripción de las Figuras

Figura 1: Visión general de la estructura de anexina A3 (A) y fragmentos recombinantes de anexina A3 utilizados para la representación en mapa de epítomos de anticuerpos monoclonales; los anticuerpos monoclonales que son objeto de la presente solicitud de patente han sido seleccionados en base a este tipo de rastreo mediante representación en mapa de los epítomos.

45 **Figura 2:** Purificación del fragmento vANA-5 (aminocidos 107-243) de anexina A3 humana: vANA-5 purificado por cromatografía de SDS-PAGE.

50 **Figura 3:** Purificación del fragmento vANA-7 (aminocidos 1-106) de anexina A3 humana: vANA-7 purificado por cromatografía de SDS-PAGE.

Figura 4: Purificación del fragmento vANA-1 (aminocidos 1-324) de anexina A3 humana: vANA-1 purificado por cromatografía de SDS-PAGE.

55 **Figura 5:** Ensayo de la placa ELISA vANA-1: púrpura: antisuero específico para anexina A3; azul: suero negativo; suero premium procedente de conejo.

Figura 6: Especificidad de anticuerpos anti-ANXA3: pistas 1-9 y el borrón de transferencia Western 2D se toman

de Wozny et al., 2006; las pistas 10-19 muestran los diversos anticuerpos anti- ANXA3 monoclonales tal como se explican en el texto. Éstos no muestran virtualmente reactividad cruzada alguna con ninguna otra proteína de otras anexinas.

5 **Figura 7:** La cuantificación densitométrica de tinción anti-ANXA3 después del desarrollo de ECL de borrones de transferencia Western de lisados de células totales procedentes de células PC3 muestra la elevada especificidad del anticuerpo monoclonal tgc7 ProVII5C5 (DSM ACC2780).

10 **Figura 8:** Calibración de ELISA basada en anti-ANXA3 con vANA-1 en calidad de antígeno, la reacción de color se detuvo al cabo de 15 (A), 30 (B) y 45 (C) min.

15 **Figura 9:** Detección de ANXA3 en sobrenadantes de orina exprimat después de centrifugación convencional a baja velocidad; A, D: 15 min; B, E: 30 min y C, F: 45 min de desarrollo; las curvas rosas se obtuvieron después de filtración en gel (GF – siglas en inglés) para separar la urea.

20 **Figura 10:** Curva ROC para estudio diagnóstico basado en anti-ANXA3, empleando un ELISA tal como se muestra en la Figura 6 y basado en 200 pacientes con valores de PSA en el intervalo de 4-10 ng/ml; AUROC es 0,823, indicando una especificidad del 90% a una sensibilidad del 70% para este importante colectivo en la “zona gris” de PSA.

25 **Figura 11:** El suero policlonal utilizado en Wozny et al., 2006, (véase la Figura 1) sólo se une de manera no significativa a las superficies de células PC-3.

30 **Figura 12:** Detección de ANXA3 en superficie en células PC-3 mediante tgc7 ProVII5C5 (DSM ACC2780); el anticuerpo se utilizó a las concentraciones indicadas en los gráficos. En calidad de anticuerpo secundario se empleó IgG-FITC anti-ratón en una dilución de 1:50, el volumen de tinción era 100 µl de dilución de anticuerpos. Estos resultados indican una localización en superficie de ANXA3 en esta línea de células de cáncer de próstata que puede ser explotada en potencia terapéuticamente.

35 **Figura 13:** Utilizando secuencias de péptidos solapantes que cubren la región antigénica de ANXA3, se encontraron seis epítomos y se caracterizaron como contribuyentes a la unión altamente específica de un antisuero policlonal. A continuación de dos epítomos en la región N-terminal (que son reconocidos por tgc5 Pro II6G7 = DSM ACC2778; tgc6 ProIII1G11 = DSM ACC279; tgc7 ProVII5C5 = DSM ACC2780), existen cuatro epítomos más que se muestran con mayor detalle en la Figura 14.

40 **Figura 14:** Visión general sobre la secuencia de ANXA3 humana y regiones antigénicas de la misma (violeta oscuro, línea más inferior): AB1 policlonal es un antisuero policlonal altamente específico, que se une exclusivamente a ANXA3, sin reactividad cruzada alguna con otras anexinas o cualesquiera otros antígenos (tal como se muestra mediante borrones de transferencia Western 2D y espectrometría de masas, Figura 1). AB2 policlonal está dirigido contra los epítomos 3 y 4; MAB1 es tgc7 ProVII5C5 = DSM ACC2780 y MAB 2 representa tanto tgc5 Pro II6G7 = DSM ACC2778 como tgc6 ProIII1G1 = DSM ACC2779; los fragmentos ANXA3 recombinantes 1-8 se utilizaron para inmunizaciones respectivas.

45 **Figura 15:** Descripción esquemática de la estructura cristalina de ANXA 3 humana

Ejemplos

Ejemplo 1

50 Producción de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra ANXA3

Fragmentos solubles recombinantes de anexina A3 humana, vANA-5 (AA 107-243), vANA-7 (AA 1-106), vANA-1 (AA 1-324), vANA-2 (AA 1-159), vANA-3 (AA 35-159), vANA-4 (AA 191-324) y vANA-6 (AA 107-190) se clonaron y expresaron en *E. coli* y, subsiguientemente, se purificaron por cromatografía. En la Figura 1 se muestra una visión general de la estructura de anexina A3 y fragmentos recombinantes de la misma.

55 Las Figuras 2, 3 y 4 muestran geles 1D teñidos con Coomassie de fragmentos ANXA3 solubles recombinantes vANA-5, vANA-7 y vANA-1 purificados mediante procesos cromatográficos convencionales.

Se desarrolló el rastreo de células de hibridoma positivas después de la fusión y durante la clonación de células productoras de anticuerpos, un ELISA anti-anexina A3 basado en el fragmento vANA-1 (Figura 5). Con el fin de conseguir inclusive un reconocimiento de los anticuerpos que se unen a epítomos nativos de ANXA3, vANA-1 recombinante se re-naturalizó antes del acoplamiento a placas ELISA. vANA-1 recombinante se revistió a una concentración de 1 µg/pocillo a placas ELISA. La funcionalidad de las placas ELISA se verificó con suero anti-ANXA3 policlonal.

La Figura 6 muestra la descripción de color espectral falsa de la reactividad de suero policlonal a una muestra benigna y a una muestra cancerosa de tejido de próstata. La muestra cancerosa se indica emborronada mediante PAGE-2D. La amplia mayoría de la señal se obtiene a partir de una cadena de cuatro puntos que se identificaron mediante espectrometría de masas como ANXA3. Estas imágenes de color espectral falsas reflejan un intervalo dinámico mucho más profundo que el permitido por escalas de grises de un solo color. La intensidad de señales no ANXA3 está siempre próxima al fondo, estando representadas por pixeles en azul (próximos al fondo). El grado de este contraste entre señales específicas y no específicas se muestra en las pistas 8 y 9 de la Figura 6 que representan los resultados en la escala de grises de un solo color.

Esta situación se destaca adicionalmente mediante los perfiles de señal de las pistas 10 a 19 de diversas diluciones de anticuerpos monoclonales tgc5 Pro II6G7 = DSM ACC2778 (pistas 10 y 11); tgc6 ProIII1G11 (DSM ACC2779) (pistas 15 y 16); tgc7 ProVII5C5 (DSM ACC2780) (pistas 12-14); tgc8 ProIII1E1 (DSM ACC2781) (pistas 17-19); que muestran una reactividad cruzada incluso menor.

Tal como se muestra en la Figura 6, los anticuerpos monoclonales que son objeto de la presente invención no tienen esencialmente reactividad cruzada alguna con otras anexinas. Mientras que el suero policlonal procedente de Wozny et al., 2006 tiene una cierta reactividad cruzada residual con ANXA6, la tinción con anticuerpos monoclonales (de una biopsia de un paciente de cáncer de próstata y una línea de células de cáncer de próstata, PC3) mostrada en el lado de la derecha de la Figura 6, produce una tinción de fondo menor que 1% en otras posiciones que no sean de 33 kD para ANXA3.

La Figura 7 muestra una cuantificación densitométrica de tinción anti-ANXA3 después de revelado por electroquimioluminiscencia (ECL – siglas en inglés). Un borrón de transferencia Western de lisados de células totales procedentes de células PC3 se analizó con el anticuerpo Tgc7 ProVII5C5 (DSM 2780). Se encontró sólo una banda sencilla correspondiente a ANXA3. No existe virtualmente reactividad cruzada alguna.

Ejemplo 2

Determinación de la especificidad de anticuerpos en muestras de orina exprimat y secciones de tejido

Los anticuerpos monoclonales del Ejemplo 1 se utilizaron en un formato ELISA tal como se describe arriba para detectar ANXA3 en sobrenadantes procedentes de orina exprimat de pacientes de cáncer.

Tal como se muestra en la Figura 8, para la calibración, placas ELISA se revistieron con tgc7 ProVII5C5 (DSM ACC2780), y se detectó una serie de dilución de vANA-1 (20-0,3 ng/pocillo) utilizando tgc5 Pro II6G7 (DSM ACC2778) biotinilado y avidina-HRP con TMB como sustrato. La reacción de color enzimática se detuvo al cabo de 15, 30 y 45 min según se indica.

En la Figura 9, se muestra la detección de ANXA3 en sobrenadantes de orina exprimat tomada de pacientes. La muestra se centrifugó de acuerdo con procesos clínicos convencionales con una baja velocidad de centrifugación. Las señales se mejoraron mediante filtración en gel (GF) previa, que esencialmente separa la urea que podría interferir con borrones de transferencia Western de PAGE 1D.

Los anticuerpos también se sometieron a ensayo en un proceso de tinción inmunohistoquímico de secciones de tejido. En epitelio de próstata normal se encontró una elevada concentración intracelular de ANXA3. Durante el progreso de la enfermedad de PIN a carcinoma, se encuentra un incremento aparente local de ANXA3 extracelularmente localizada. Estas regiones teñidas de biopsias, sin embargo, no representan ni permiten estimaciones generales de relaciones cuantitativas de distribuciones ANXA3 diagnósticas entre sobrenadantes y sedimentos de orina exprimat. Esto se debe simplemente a que las biopsias son más bien cualitativas, y que no pueden representar de forma completa zonas de próstata de calidad cancerosa o benigna.

Ejemplo 3

Estudio clínico para la determinación de ANXA3 en muestras de orina exprimat

5 Se llevó a cabo un estudio clínico ciego en múltiples centros con el fin de determinar la sensibilidad y especificidad de un diagnóstico de carcinoma de próstata basado en una detección no invasiva de ANXA3 en fluidos corporales, particularmente en orina exprimat.

10 3.1 Pacientes y testigos

A: Pacientes con carcinoma de próstata histológicamente verificado (grupo PCA); n = aproximadamente 200.

15 B: Pacientes sin carcinoma de próstata según se determina mediante ensayo histológico (grupo testigo): n = aproximadamente 300.

3.2 Toma y procesamiento de muestras

3.2.1 Suero/plasma

20 Se tomó por vía intravenosa un tubo de suero para la determinación rutinaria del valor PSA en suero. Además, 1-2 ml de suero sirvieron adicionalmente como ejemplo y se almacenaron profundamente congelados. Esta muestra de sangre se analizó adicionalmente en cuanto a PSA. La toma de la muestra de sangre tuvo lugar antes de las biopsias de sacabocado de próstata o se llevó a cabo una palpación rectal.

25 3.2.2 Sedimento urinario exprimat

Después de palpación y masaje de la próstata durante 20 s se solicitó al paciente que vaciara su vejiga. La orina exprimat obtenida se procesó de acuerdo con procesos publicados (I. Rehman, A. R. Azzouzi, J. W. F. Catto, S. Allen, S. S. Cross, K. Feeley, M. Meuth y F. C. Hamdy, Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: A pilot study, *Urology* 64 (6), 2004, 1238-1243; C. Goessi, M. Müller, R. Heicappell, H. Krause, B. Straub, M. Schrader y K. Miller, DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage, *Urology* 58 (3), 2001, 335-338) y los productos se almacenaron a -80°C.

35 Al igual que el suero, la orina exprimida ha de tomarse, si es posible, antes de llevar a cabo las biopsias de sacabocado de próstata.

3.3 Resultados

40 En aproximadamente 200 pacientes PSA positivos, la determinación de ANXA3 en los sedimentos y sobrenadantes de muestras de orina exprimat proporcionó una sensibilidad de aproximadamente 90% y una especificidad de aproximadamente 80%.

45 Tal como se muestra en la Figura 10, los valores ROC para lecturas basadas en ANXA3 en sobrenadantes (u.anx.tot) en pacientes con PSA en el intervalo de 2-6 ng/ml eran 0,8, en el intervalo de valores de PSA de 4-10 ng/ml, los valores ROC eran 0,85 y en el colectivo total de todos los pacientes y todos los intervalos de valores de PSA, los valores ROC para ANXA3 eran 0,74.

50 La curva ROC representativa en la Figura 10 para aquellos pacientes con un valor PSA entre 4 y 10 ng/ml muestra una relevancia diagnóstica, en particular en esta importante zona gris de PSA (en donde la especificidad de PSA es excesivamente baja (Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, Ward AM, Patnick J, Price CP, Rimmer J, Sturgeon C, White P, Allen NE; On behalf of the NHS Prostate Cancer Risk Management Programme. Uso de isoformas de antígeno específico de próstata (PSA) para la detección de cáncer de próstata en hombres con un nivel de PSA de 2-10 ng/ml: revisión sistemática y meta-análisis. *Eur Urol. sep. 2005; 48 (3):386-99; discusión 398-9. Revisión. PMID: 15982797; Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hermenez M, Downs J. Ya ha pasado la era del antígeno específico de próstata en los Estados Unidos de América para el cáncer de próstata: ¿Qué ocurrió en los últimos 20 años? *J Urol. oct. 2004; 172(4 Pt 1):1297-301. PMID: 15371827*)), las curvas ROC son una herramienta estándar de estadísticas clínicas y están bien descritas, p. ej., en <http://www.anaesthetist.com/mnm/stats/roc/>.*

Ejemplo 4

Unión de anticuerpos monoclonales a células cancerígenas

5 Los anticuerpos anti-ANXA3 monoclonales son adecuados como marcadores de superficie en aplicaciones diagnósticas (histologías patológicas) y terapéuticas.

10 Tal como se muestra en lo que sigue mediante citometría de flujo, en particular el anticuerpo monoclonal, que se une específicamente al epítipo N-terminal tgc7 ProVII5C5 (DSM ACC2780), se une a sitios de unión extracelulares de una línea de células de cáncer de próstata (células PC-3, ATCC, DCV-1017, versión 08-2004) de una manera dependiente del calcio.

15 La unión no específica se evaluó durante cada experimento mediante incubación con anticuerpos secundarios sólo y empleando anticuerpos testigo no específicos y no relacionados (monoclonales y policlonales).

La Figura 11 demuestra que el suero policlonal utilizado en Wozny et al., 2006 (véase la Figura 6) sólo se une de manera no significativa a superficies de células PC-3.

20 Las células se aclararon con un tampón apropiado y se incubaron en hielo durante 30 min a las diluciones indicadas en la Figura 11. Subsiguientemente, todas las muestras se incubaron con 100 µl de una dilución 1:50 de anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a FITC. Después de las etapas de lavado, 12.000 células de cada una de las muestras se analizaron mediante citometría de flujo tal como se muestra.

25 En esencia, el suero policlonal no daba como resultado un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia a una diversidad de diluciones y en comparación con sueros testigos. Así, la expresión en superficie de ANXA3 en células PC-3 no puede mostrarse en esta fase, probablemente debido a que la concentración de anticuerpos específicos en el suero policlonal es demasiado baja.

30 Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 12, el anticuerpo monoclonal tgc7 ProVII5C5 (DSM ACC2780) se une de hecho de una manera dependiente de la concentración y del calcio a epítopos de superficie de células PC-3.

Ejemplo 5

Representación en mapa de epítopos

35 Después de utilizar secuencias de péptidos solapantes que cubren toda la región antigénica de anexina A3 (ANXA3), los autores de la invención concluyeron que sólo seis epítopos son los responsables de la unión de alta especificidad tal como se muestra en las Figuras 13 y 14 analizando la unión de un anticuerpo policlonal altamente específico (véase la Figura 1). La especificidad del antisuero policlonal se controló mediante borrones de transferencia Western derivados de PAGE 2D y espectrometría de masas. Esto mismo se aplicó a los anticuerpos monoclonales tgc5 Pro II6G7 = DSM ACC2778; tgc6 ProIII1G11 = DSM ACC2779; tgc7 ProVII5C5 = DSM ACC2780; tgc 13 ProI/5G9; tgc 12 ProIII/4B11; tgc 14 ProVIII/3D7.

45 La representación en mapa de los epítopos demostró que a continuación de dos epítopos en la región N-terminal, también existen contribuciones de dos epítopos en la región media y de dos epítopos en la región C-terminal de ANXA3 (Fig. 13).

50 La localización de estos epítopos (designados como epítopos 1-6) en ANXA3 humana se muestra en la Fig. 14.

55 La estructura cristalina de ANXA3 humana, mostrada como una visión general en la Fig. 14 (<http://www.pdb.org/pdb/files/1axn.pdb> y <http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1AXN>), implica que los epítopos 1, 2, 5 y 6 juntos forman un dominio en un pliegue nativo de ANXA3. Los autores de la invención procedieron, por lo tanto, a aislar ANXA3 humana a partir de neutrófilos y conejos inmunizados con este material para obtener anticuerpos correspondientes. Estos anticuerpos están dirigidos contra ANXA3 nativa, de nuevo fueron rastreados y seleccionados en cuanto a la más elevada especificidad por los autores de la invención y aquellos que se unen a dominios que comprenden los correspondientes epítopos 1, 2, 5 y 6 son particularmente

adecuados para fines diagnósticos y terapéuticos.

Referencias

5 1. **Alavi AS**, Soloway MS, Vaidya A, Lynne CM, Gheiler EL. Local anesthesia for ultrasound guided prostate biopsy: a prospective randomized trial comparing 2 methods. *J Urol* 2001; 166: 1343-1345.

2. **Arienti G**, Carlini E, Saccardi C, Palmerini CA. Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. *J Cell Mol Med*. 2004 Jan-Mar;B(1):77-84.

10 3. **Carlsson** et al. Dominant prostasome immunogens for sperm-agglutinating autoantibodies of infertile men. *J Androl*. 2004; 25:699-705.

15 4. **Djavan B**, Zlotta A, Kratzik C, Remzi M, Seitz C, Schulman CC, Marberger M. PSA, PSA density, PSA density of transition zone, free/total PSA ratio, and PSA velocity for early detection of prostate cancer in men with serum PSA 2.5 to 4.0 ng/mL. *Urology* 1999; 54: 517-522.

20 5. **Djavan B**, Waldert M, Zlotta A, Dobronski P, Seitz C, Remzi M, Borkowski A, Schulman C, Marberger M. Safety and morbidity of first and repeat transrectal ultrasound guided prostate needle biopsies: results of a prospective european prostate cancer detection study. *J Urol* 2001; 166: 856-860.

6. **Gerke V**, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jun;6(6):449-61.

25 7. **Gerke V**, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*. 2002 Apr;82(2):331-71.

8. **Greenlee RT**, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J* 2000; 50: 7-33.

30 9. **Haese A**, Huland E, Graefen M, Hammerer P, Noldus J, Huland H. Ultrasensitive detection of prostate specific antigen in the followup of 422 patients after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;161:1206-1211.

10. **Huland H**. Radical prostatectomy: options and issues. *Eur Urol* 2001a; 39 Supl 1: 3-9.

35 11. **Huland H**. Editorial. *J Urol* 2001 b.

12. **Knox JJ**, Moore MJ. Treatment of hormone refractory prostate cancer. *Semin Urol Oncol* 2001; 19: 202-211.

40 13. **Irani J**, Fournier F, Bon D, Gremmo E, Dore B, Aubert J. Patient tolerance of transrectal ultrasound-guided biopsy of the prostate. *Br J Urol* 1997; 79:608-610.

14. **Issa JP**: CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 101-118.

45 15. **Issa MM**, Bux S, Chun T, Petros JA, Labadia AJ, Anastasia K, Miller LE, Marshall FF. A randomized prospective trial of intrarectal lidocaine for pain control during transrectal prostate biopsy: The Emory University experience. *J Urol* 2000; 164: 397-399.

50 16. **Jung K**, Stephan C, Elgeti U, Lein M, Brux B, Kristiansen G, Rudolph B, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Sinha P. Molecular forms of prostate-specific antigen in serum with concentrations of total prostate-specific antigen <4 microg/L: are they useful tools for early detection and screening of prostate cancer? *Int J Cancer* 2001; 93: 759-765.

55 17. **Keller, E.T.** et al., Prostate Karzinoma skeletal metastases: cross-talk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev*. 20, 333-349. (2001).

18. **Lujan GM**, Paez BA, Gonzalez FI, Romero CI, Gomez de Vicente JM, Berenguer SA. Adverse effects of transrectal prostatic biopsy. Analysis of 303 procedures. *Actas Urol Esp* 2001; 25: 46-49.

- 5
19. **Makinen T**, Tammela TL, Hakama M, Stenman UH, Rannikko S, Aro J, Juusela H, Maattanen L, Auvinen A. Prostate cancer screening within a prostate specific antigen range of 3 to 3.9 ng./ml.: a comparison of digital rectal examination and free prostate specific antigen as supplemental screening tests. *J Urol* 2001; 166: 1339-1342.
20. **Miller K**, Weißbach L (comp.): Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen. *Urologe A* 1999 a; 38: 388-401.
- 10
21. **Miller K**, Weißbach L (comp.): Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen. *Urologe A* 1999 b; 38: 630-639.
- 15
22. **Okihara K**, Fritsche HA, Ayala A, Johnston DA, Allard WJ, Babaian RJ. Can complexed prostate specific antigen and prostatic volume enhance prostate cancer detection in men with total prostate specific antigen between 2.5 and 4.0 ng./ml. *J Urol* 2001; 165: 1930-1936.
23. **Pitsitkun T**, Shen R-F, Knepper MA . Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *PNAS* 2004; 101: 13386-13373.
- 20
24. **Rescher U**, Gerke V. Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci.* 2004 Jun 1;117(Pt 13):2631-9.
- 25
25. **Schartz, N.E.**, Chaput, N., Andre, F. & Zitvogel, L. From the antigen-presenting cell to the antigenpresenting vesicle: the exosomes. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4, 372-381 (2002).
26. **Stamey TA**, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenoKarzinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987; 317: 909-916.
- 30
27. **Wang, W.**, Xu, J. & Kirsch, T. Annexin-mediated Ca²⁺ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 3762-3769. (2003)
28. **Utlej AG**, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, Hood L, Lin B. Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate.* 2003 Jul 1;56 (2): 150-61.
- 35
29. **Wiegel T**: Welchen Stellenwert hat die Strahlentherapie in der Therapie des Prostatakarzinoms? *Urologe B* 1998; 38 (suppl 1): 58-64.
30. **Wozny W**, Schroer K, Schwall G, Stegmann W, Dietz K, Rogatsch H, Huebl H, Klocker H, Schratzenholz A, Cahill MA. Quantitative differential radioactive analysis of protein expression in human prostate cancers reveals novel biomarkers. 2006.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método in vitro para el diagnóstico de cáncer de próstata, en el que una muestra se analiza en cuanto a la presencia y/o cantidad de anexina A3 con un anticuerpo específico para anexina A3 que no tiene esencialmente reactividad cruzada alguna contra otras anexinas, en el que el anticuerpo se produce por la línea de células de hibridoma tgc 7 ProVII5C5, DSM ACC2780, o un anticuerpo que se une al mismo epítipo sobre anexina A3.
- 10 2.- El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado o humano.
- 3.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el anticuerpo está dirigido contra el extremo N de anexina A3.
- 15 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el anticuerpo está dirigido contra un epítipo en la región de los aminoácidos 1-106 de anexina A3 humana.
- 20 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo está dirigido contra un epítipo sobre la anexina A3 que comprende la secuencia VRDYPDFSPSVD (SEQ ID NO: 1) o una secuencia contigua parcial de la misma con una longitud de al menos 6 aminoácidos.
- 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que se determina la presencia y/o cantidad de anexina A3 extracelular y/o la presencia y/o cantidad de anexina A3 intracelular.
- 25 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el diagnóstico incluye una determinación de la fase de la enfermedad, preferiblemente en donde al menos se lleva a cabo una diferenciación entre una fase precancerosa y una fase cancerosa.
- 30 8.- Uso de un reactivo de ensayo para el diagnóstico in vitro de cáncer de próstata, comprendiendo dicho reactivo de ensayo al menos un anticuerpo específico para anexina A3 que no tiene esencialmente reactividad cruzada alguna contra otras anexinas, en el que el anticuerpo es como se define en las reivindicaciones 1-5.
- 35 9.- Uso de un anticuerpo específico para anexina A3 que no tiene esencialmente reactividad cruzada alguna contra otras anexinas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de próstata, en donde el anticuerpo es como se define en las reivindicaciones 1-5.
- 40 10.- Una composición farmacéutica que comprende, en calidad de agente activo, un anticuerpo específico para anexina A3 que no tiene esencialmente reactividad cruzada alguna contra otras anexinas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de próstata, en donde el anticuerpo es como se define en las reivindicaciones 1-5.
- 45 11.- Uso de un anticuerpo específico para anexina A3 para el diagnóstico in vitro de cáncer de próstata, no teniendo dicho anticuerpo esencialmente reactividad cruzada alguna contra otras anexinas, en donde el anticuerpo es como se define en las reivindicaciones 1-5.
- 50 12.- Uso de una célula capaz de producir un anticuerpo específico para anexina A3 en un método para producir un anticuerpo para el diagnóstico de cáncer de próstata, en donde el anticuerpo es específico para anexina A3 y no tiene esencialmente reactividad cruzada alguna contra otras anexinas, en donde el anticuerpo es como se define en las reivindicaciones 1-5.
- 55 13.- Un anticuerpo específico para anexina A3 que no tiene esencialmente reactividad cruzada alguna contra otras anexinas, en donde el anticuerpo se produce por la línea de células de hibridoma tgc7 ProVII5C5, DSM ACC2780, o un anticuerpo que se une al mismo epítipo sobre anexina A3.
- 14.- El anticuerpo de la reivindicación 13, que es un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado o humano.
- 15.- El anticuerpo de la reivindicación 13 ó 14, dirigido contra el extremo N de anexina A3.

16.- El anticuerpo de la reivindicación 13 ó 14, dirigido contra un epítopo en la región de los aminoácidos 1-106 de anexina A3 humana.

5 17.- El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, dirigido contra un epítopo de anexina A3, que comprende la secuencia VRDYPDFSPSVD (SEQ ID NO: 1) o una secuencia contigua parcial de la misma con una longitud de al menos 6 aminoácidos.

Figura 1

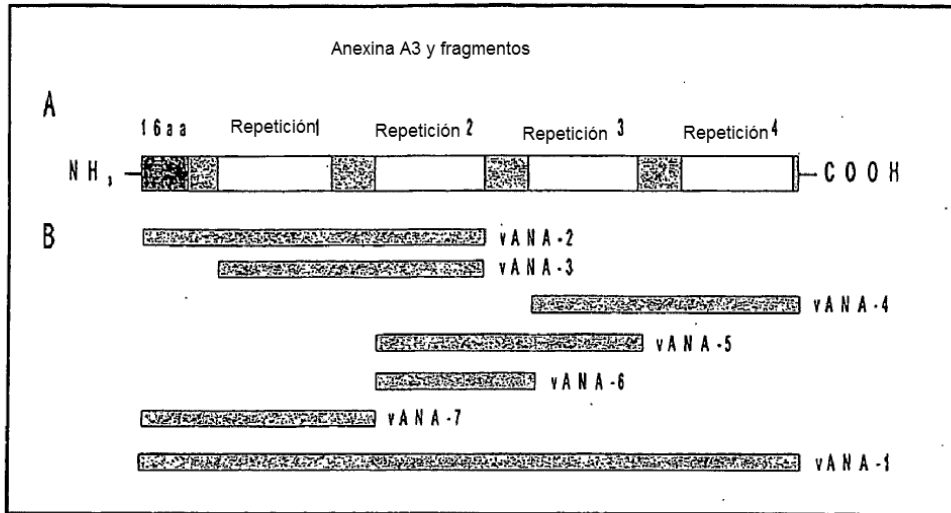


Figura 2

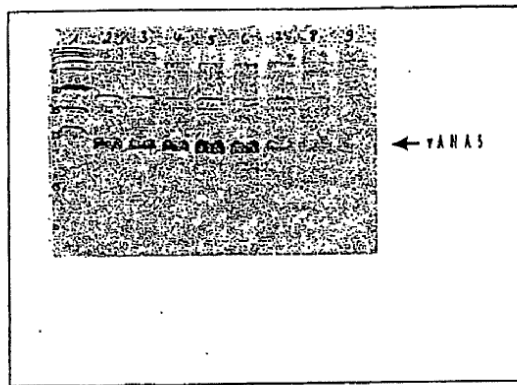


Figura 3

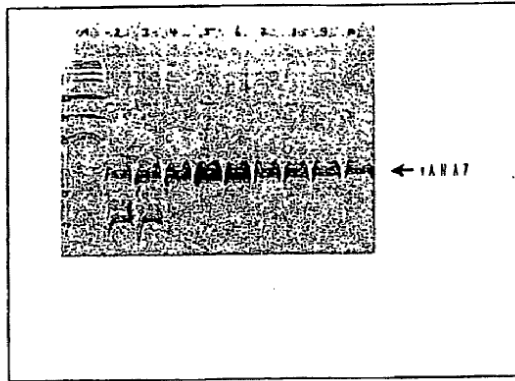


Figura 4

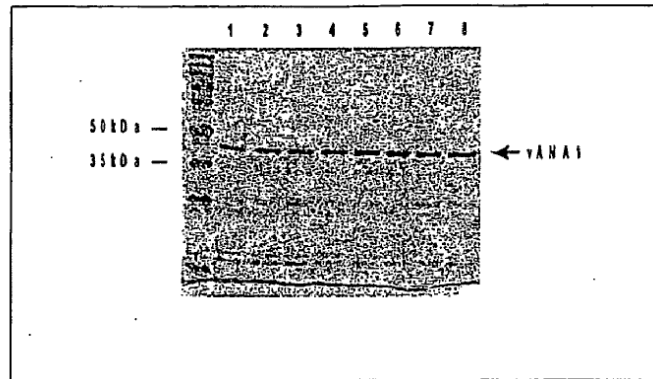


Figura 5

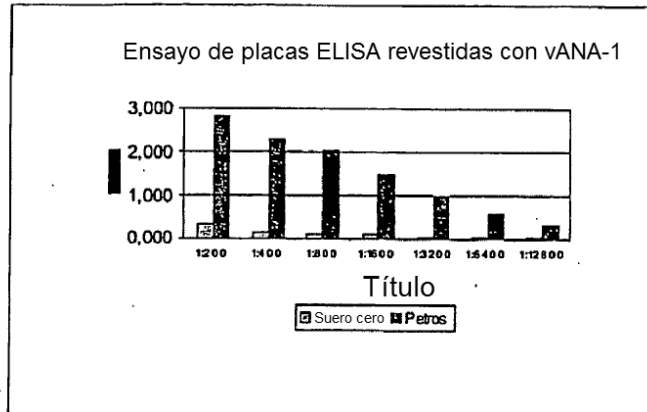


Figura 6

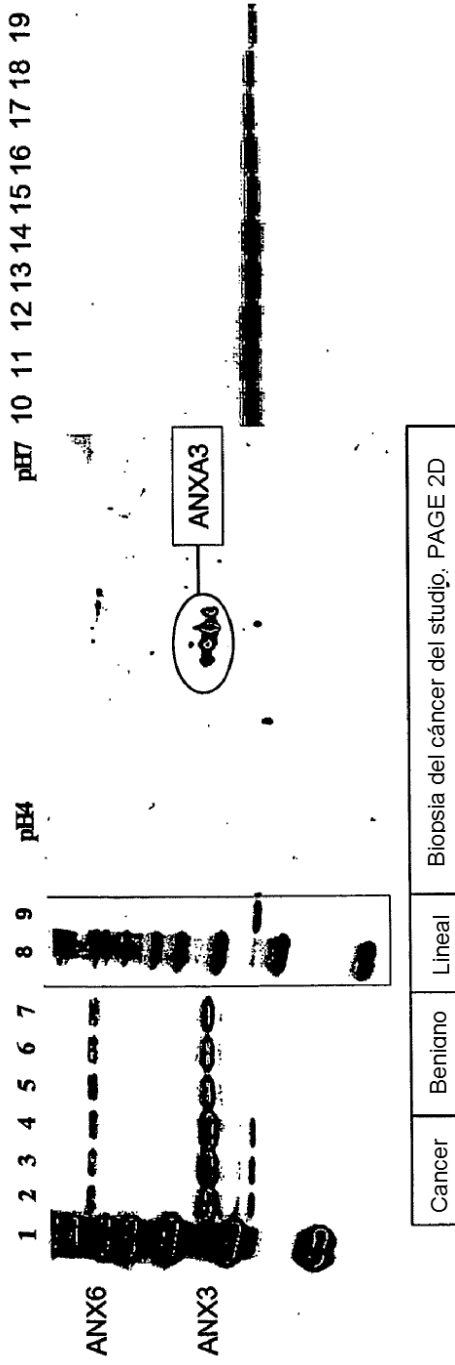


Figura 7

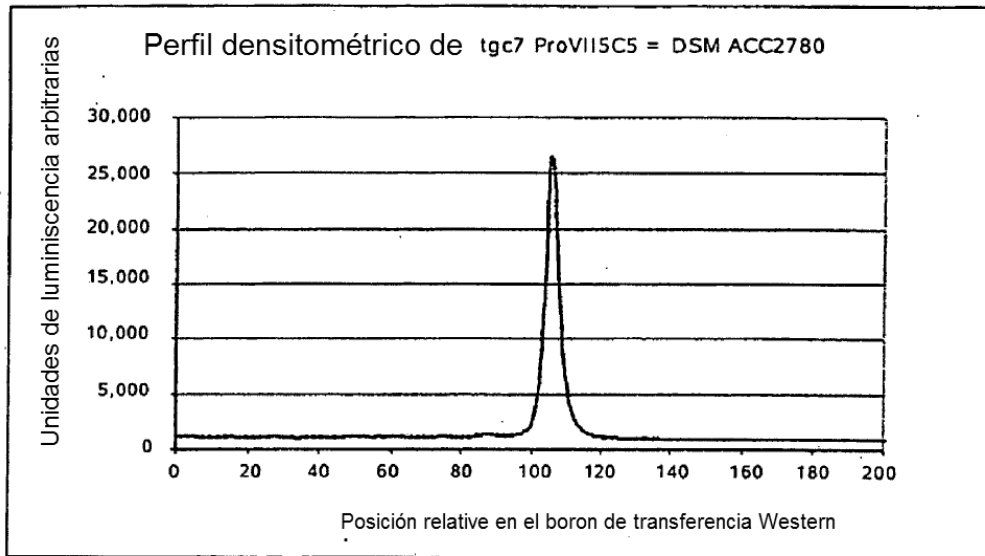


Figura 8

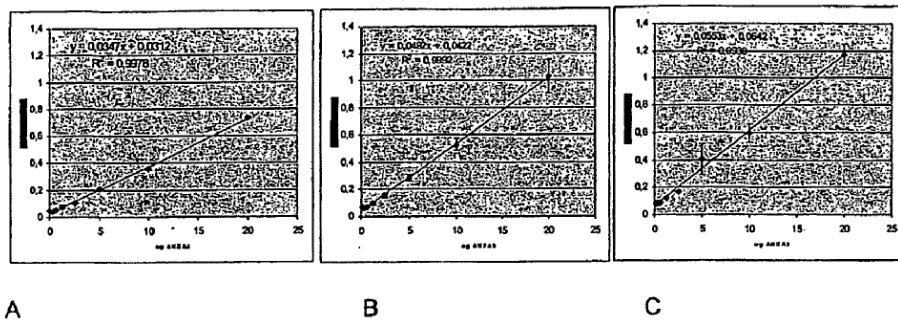


Figura 9

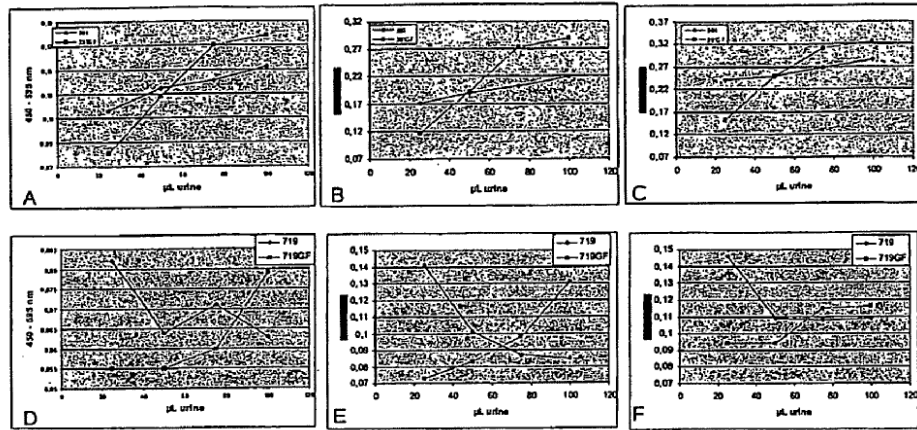


Figura 10

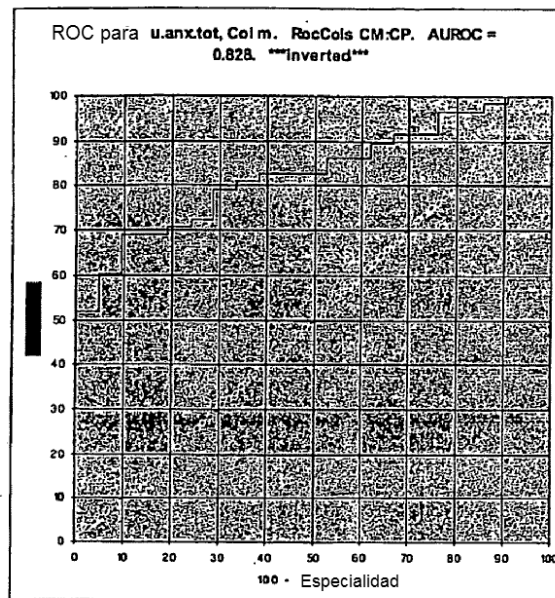
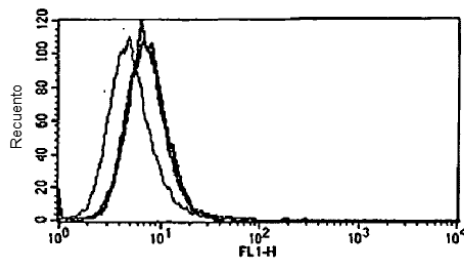
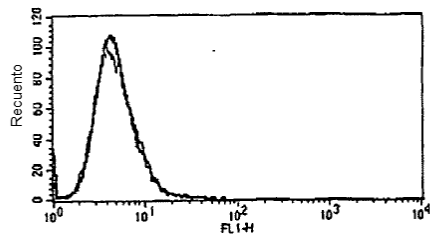


Figura 11

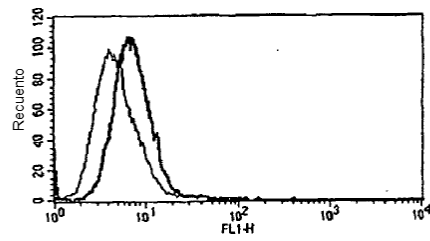


— anti-conejo **1:50**
— suero testigo (conejo) **1:500**
— **Petros 1:500 (Wozny et al, 2006)**

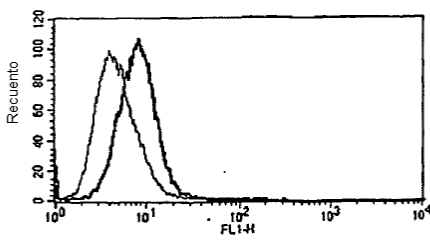
Figura 12



— anti-ratón 1:50
— anticuerpo testigo (ratón) 1:1



— anti-ratón 1:50
— tgc7ProVII5C5 5µg/ml



— anti-ratón 1:50
— tgc7ProVII5C5 20µg/ml

Figura 13

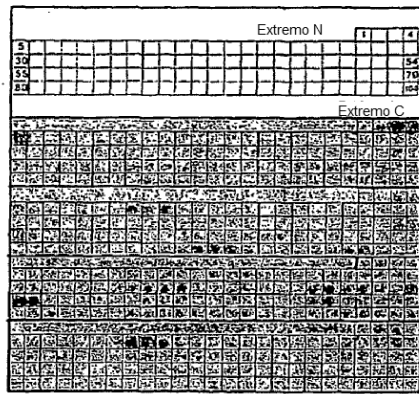


Figura 14

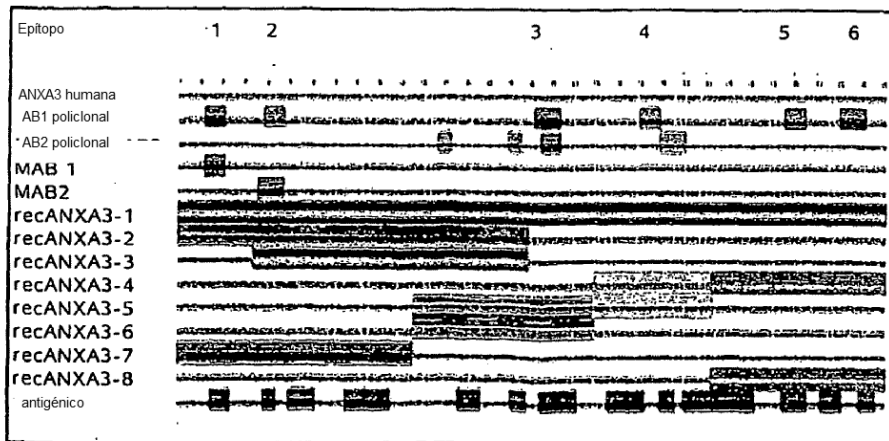


Figura 15

