

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 602**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2011 PCT/FR2011/052893**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12076812**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2011 E 11811042 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2649452**

54 Título: **Procedimiento y kit para el diagnóstico in vitro del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

08.12.2010 FR 1060221

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

23.10.2017

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:

**ATAMAN-ÖNAL, YASEMIN;
BUSSERET, SANDRINE;
CHOQUET-KASTYLEVSKY, GENEVIÈVE;
GALLET-GORIUS, EMANUELLE;
GERVASI, GASPARD;
GUILLOTTE, MICHÈLE y
HAMELIN, CÉLINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 638 602 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

Procedimiento y kit para el diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento y un kit para el diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata.

10 El cáncer de próstata es el tipo de cáncer más frecuente en los hombres. El cáncer de próstata tiene la particularidad de evolucionar muy lentamente. Sin embargo, a pesar de su agresividad biológica moderada, comparada con otros tipos de cánceres, se trata del segundo cáncer más mortal en los hombres, después del cáncer del pulmón, *ex aequo* con el cáncer colorrectal (1). La gravedad del cáncer depende de la extensión del tumor (local, con metástasis próximas o a distancia) y del tipo de células cancerosas, es decir de su grado de malignidad. Existen soluciones curativas, en particular para las etapas precoces de cáncer, y limitadas localmente tal como la radioterapia y/o la cirugía. Por lo tanto, es crucial poder disponer de un ensayo que permita efectuar un diagnóstico lo más precoz posible y fiable del cáncer de próstata.

15 El cáncer de próstata puede ser detectado por la constatación del aumento de la concentración de una proteína en la sangre, el antígeno prostático específico o PSA. El PSA está producido por la próstata y es por lo tanto un marcador específico del órgano, pero no es específico del tumor. Es por eso que un resultado elevado de un ensayo de cuantificación de PSA no significa obligatoriamente que haya un cáncer. En efecto, una cantidad de más de cuatro nanogramos por mililitro de esta proteína en la sangre está asociada a un cáncer de próstata en el 25% de los casos y a otro trastorno de la próstata en el 75% de los casos, en particular durante hipertrofia benigna (BPH), de una inflamación o de una infección de la próstata. Además, a pesar de que sea relativamente sensible para los diagnósticos iniciales y para el seguimiento de los pacientes, este ensayo no permite detectar todos los casos de cáncer de próstata.

20 Más recientemente, se ha descrito otro marcador como significativamente asociado a la progresión y a las diversas etapas de enfermedades prostáticas y de cáncer de próstata. Se trata de la anexina 3 (ANXA 3) que pertenece a la familia de las anexinas. Las proteínas de la familia de las anexinas poseen la característica común de poder fijarse a las membranas fosfolipídicas en presencia de calcio. Para hacer esto, los miembros de esta familia de proteínas comparten similitudes estructurales. Así, cada anexina contiene, en su secuencia proteica, unos dominios denominados "annexin repeat", que están en número de 4 u 8 (4 para la anexina A3) y tienen una longitud de aproximadamente 70 aminoácidos (2). Cada dominio repetido, denominado también dominio endonexina, se repliega en 5 hélices alfa y contiene una unidad característica de tipo 2 (GxGT-[38 restos]-D/E) que permite fijar unos iones Ca²⁺. Las anexinas del reino animal poseen unos dominios N-terminales variables, que llevan frecuentemente las especificidades funcionales de las proteínas. Los análisis cristalográficos muestran que las estructuras secundarias y terciarias de las anexinas se conservan incluso si la identidad de las secuencias en aminoácidos no supera del 45 al 55%. Los 4 dominios repetidos forman una estructura que se parece a un disco, con una superficie un poco convexa sobre la cual se sitúan los sitios de fijación del Ca²⁺ y una superficie cóncava en la que los extremos N- y C-terminales de la proteína se encuentran cerca.

30 La anexina A3 es una anexina rara, que se expresa sólo débilmente o nada por la mayoría de los tipos celulares. A la inversa, es muy abundante en los neutrófilos humanos, en los que representan aproximadamente el 1% de las proteínas citosólicas (3, 4). Inicialmente, dos isoformas de la anexina A3 se han descrito, una de 33 kDa de masa molecular aparente, presente mayoritariamente en los neutrófilos, la otra de 36 kDa de masa molecular aparente, encontrada en los monocitos. La diferencia de masa molecular entre las dos isoformas no resulta de una modificación post-traducciona tal como la fosforilación o la glicosilación. Muy recientemente, en 2010, se ha demostrado que un fenómeno de corte y empalme alternativo podía ser un mecanismo que explica la presencia de estas dos isoformas. Así, los autores han identificado dos variantes de ADN complementario de la anexina A3: la primera de una longitud de 973 pares de bases (pb) codifica una proteína entera de 323 aminoácidos que corresponde a la isoforma de 36 kDa; la segunda de una longitud de 885 pb no contiene el exón III tras un corte y empalme alternativo. Cuando este exón no está presente, el marco de lectura abierta se interrumpe, y la traducción se vuelve posible sólo a partir del codón ATG presente en el exón IV. En consecuencia, los 39 primeros aminoácidos de la proteína no se expresan, dando como resultado una proteína truncada en el extremo N-terminal de 284 aminoácidos, que corresponde a la isoforma de 33 kDa (5).

35 Además, el análisis por transferencia western después de una electroforesis de 2 dimensiones (2DE-WB) muestra que la isoforma de 36 kDa migra en forma de 4 a 6 puntos, que tienen unos puntos isoeléctricos diferentes. La isoforma de 36 kDa identificada por una transferencia Western a 1 dimensión corresponde en realidad a un grupo de isoformas heterogéneas (5). Es la anexina A3 de 36 kDa cuyo nivel de expresión disminuye en caso de cáncer de próstata (5-7).

40 Aunque la anexina A3 es reconocida como marcador para el cáncer de próstata, los procedimientos para detectarla descritos hasta ahora, o bien carecen de especificidad por que los anticuerpos utilizados presentan reacciones cruzadas con otras anexinas (documento WO 2006/125580), o bien carecen de sensibilidad para detectarla en un medio complejo como la orina (documento WO 2007/141043). De manera general, los procedimientos anteriores carecen de solidez.

De manera sorprendente, los inventores han encontrado que para paliar los inconvenientes antes citados, bastaba con utilizar un par de anticuerpos de los cuales uno se dirige contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 1 (aminoácidos 27-87 de la anexina A3, según la numeración de la base de datos UniProtKB de ANXA3 completa humana nº de acceso P12429) y el otro se dirige contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 2 (aminoácidos 258-318 según la numeración de la base de datos UniProtKB de ANXA3 completa humana nº de acceso P12429).

En la descripción siguiente, la secuencia del primer dominio repetido de la anexina A3 humana nativa se identifica como SEC ID nº 1, la secuencia del cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana nativa se identifica como SEC ID nº 2, la secuencia del segundo dominio repetido de la anexina A3 humana nativa se identifica como SEC ID nº 3, la secuencia del tercer dominio repetido de la anexina A3 humana nativa se identifica como SEC ID nº 4. La secuencia identificada en la SEC ID nº 5 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la anexina A3 humana nativa completa (UniProtKB nº de acceso P12429).

Asimismo, la presente invención tiene por objeto un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de un cáncer de próstata según el cual se pone en contacto una muestra de orina a analizar con dos anticuerpos, un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, uno de los dos anticuerpos se dirige contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana nativa cuya secuencia está identificada en la SEC ID nº 1 y el otro de los dos anticuerpos se dirige contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana nativa cuya secuencia está identificada en la SEC ID nº 2.

En particular, el anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos, preferentemente al menos 8 o al menos 9 aminoácidos, o también al menos 12 aminoácidos consecutivos y no más de 17 aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 1, y entre estos se pueden citar, a título preferido, los anticuerpos dirigidos contra un polipéptido incluido en la SEC ID nº 1, cuya secuencia de aminoácidos se selecciona entre las secuencias siguientes:

SNAQRQLIVKEYQAAYG (SEC ID nº 10),

LIVKEYQAAYG (SEC ID nº 11)

IVKEYQAAYGKE (SEC ID nº 12),

KEYQAAYG (SEC ID nº 13),

DLSGHFEHL (SEC ID nº 14),

LSGHFEH (SEC ID nº 15),

y

KEYQAAYGKELKDDLKG (SEC ID nº 22), con la condición de que la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22 se fusione por el lado N-terminal a una secuencia de al menos 30 aminoácidos.

Entre los anticuerpos dirigidos contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana nativa, se pueden citar los anticuerpos que se dirigen contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 50, preferentemente no más de 45 aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 2.

En particular, los anticuerpos dirigidos contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana nativa se seleccionan entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo que:

- se incluye en una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos que empieza en el resto 3 y que termina en el resto 49 de SEC ID nº 2,

- comprende en posición 6 de SEC ID nº 2 un resto Lys (K),

- comprende en posición 6 de SEC ID nº 2 un resto Lys (K), y en posición 49 de SEC ID nº 2 un resto Asp (D),

- comprende en posición 7 de SEC ID nº 2 un resto Gly (G), en posición 8 de SEC ID nº 2 un resto Ile (I) y en posición 9 de SEC ID nº 2 un resto Gly (G),

- comprende en posición 3 de SEC ID nº 2 un resto Arg (R), en posición 6 de SEC ID nº 2 un resto Lys (K), en posición 7 de SEC ID nº 2 un resto Gly (G), en posición 8 de SEC ID nº 2 un resto Ile (I), en posición 9 de SEC ID nº

2 un resto Gly (G) y en posición 49 de SEC ID nº 2 un resto Asp (D).

Las posiciones 6, 49, 7, 8 y 9 ensayadas con respecto a la SEC ID nº 2 corresponden respectivamente a las posiciones 263, 306, 264, 265 y 266 de la anexina A3 humana identificada como SEC ID nº 5 que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la anexina A3 humana nativa completa (UniProtKB nº de acceso P12429).

Preferentemente, el anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana nativa, cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 1, es el anticuerpo de captura, y el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana nativa, cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 2, es el anticuerpo de detección.

Los anticuerpos específicos del primer dominio repetido de la anexina A3 nativa humana y específicos del cuarto dominio repetido de la anexina A3 nativa humana, es decir los anticuerpos de captura y de detección descritos anteriormente, son unos anticuerpos que presentan una afinidad elevada con una constancia de afinidad de al menos 10^9 , preferentemente de al menos 10^{10} y que además presentan una constante de disociación baja inferior a $2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, más preferentemente aún inferior a $5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Preferentemente, los anticuerpos son unos anticuerpos monoclonales y los anticuerpos preferidos son los anticuerpos siguientes: TGC42, TGC43 y TGC44, utilizados como anticuerpos de captura 13A12G4H2 y 1F10A6 utilizados como anticuerpos de detección. El par preferido está constituido por el anticuerpo de captura TGC44 y el anticuerpo de detección 13A12G4H2.

La invención tiene también por objeto un kit de inmunoensayo para el diagnóstico *in vitro* de un cáncer de próstata en una muestra de orina a analizar que comprende dos anticuerpos, un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, estando uno de los dos anticuerpos dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 1 y estando el otro de los dos anticuerpos dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 2 y un prospecto explicativo.

Preferentemente, el anticuerpo de captura se dirige contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 1 y el anticuerpo de detección dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 2.

Los anticuerpos de captura y de detección del kit presentan las mismas características que las descritas anteriormente para el procedimiento.

Por anticuerpo, se entiende un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un fragmento de dichos anticuerpos, en particular, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, ScFv, Fv, Fd. La condición requerida es que dichos anticuerpos deben ser específicos de la anexina A3, es decir que no presenten reacciones cruzadas con otras anexinas y que sean específicos del primer dominio repetido de la anexina A3 o específicos del cuarto dominio repetido de la anexina A3; siendo los anticuerpos que presentan las afinidades más altas y las constantes de disociación más bajas los anticuerpos preferidos.

Los anticuerpos policlonales se pueden obtener por inmunización de un animal con el inmunógeno apropiado, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los demás constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por la técnica de los hibridomas, cuyo principio general se recuerda a continuación.

En un primer momento, se inmuniza un animal, generalmente un ratón, con el inmunógeno apropiado, a partir del cual los linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra este antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos son después fusionados con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, llevando cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente a la proteína podrán analizarse por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia (transferencia Western) en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados se purifican a continuación, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser también unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, por técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

El anticuerpo de captura se fija preferentemente, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido, por ejemplo un

cono, un pocillo de una placa de microtitulación, etc.

El anticuerpo de detección se marca con la ayuda de un reactivo marcador capaz de generar, directa o indirectamente, una señal detectable. Una lista no limitativa de estos reactivos marcadores consiste en:

- las enzimas, que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,
- los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,
- las moléculas fluorescentes tales como las Alexa o las ficocianinas,
- las moléculas radioactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I .

Se pueden utilizar también unos sistemas indirectos de detección, como por ejemplo unos ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Los pares ligando/anti-ligando son bien conocidas por el experto en la materia, lo que es el caso por ejemplo de los pares siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina. En este caso, es el ligando que lleva la pareja de unión. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los reactivos marcadores descritos en el párrafo anterior o ser el mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

Estos sistemas indirectos de detección pueden llevar, en ciertas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y se podrá hacer referencia a las solicitudes de patente anteriores FR2781802 o WO-A-95/08000 de la solicitante.

Según el tipo de marcado utilizado, el experto en la materia añadirá unos reactivos que permitan la visualización del marcado.

El procedimiento de la invención es un inmunoensayo de tipo "sándwich" efectuado sobre una muestra de orina, en particular una muestra de orina "exprimida", es decir una muestra de orina obtenida después del tacto rectal.

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes, dados a título ilustrativo, así como con la ayuda de las figuras anexas.

Figuras

la figura 1 corresponde a los gráficos relativos a la dosificación ELISA de la anexina A3 en ng/ml, en las orinas expresadas después del tacto rectal, en 6 pacientes (pacientes A a F), ensayadas individualmente con cada uno de los formatos de dosificación ELISA sándwich cuyo nombre se indica en las abscisas. Los valores numéricos representados en este gráfico se presentan en la tabla 4;

la figura 2 representa la dosificación ELISA de la anexina A3 durante análisis por filtraciones sucesivas (sobre filtro de 0,45 μm , después de 0,22 μm , después de 0,02 μm) de ocho orinas expresadas después del tacto rectal. El análisis se efectuó en las 3-4 horas después de la recogida de la muestra. Panel de dosificación de 5C5B10: las muestras y sus fracciones se dosificaron utilizando ELISA TGC44/5C5B10. Panel de dosificación de 13A12G4H2: las muestras y sus fracciones se ensayaron utilizando ELISA TGC44/13A12G4H2. NF: no filtrado, control; FT: filtrado con el límite de corte del filtro utilizado indicado. Para cada grupo de 8 fracciones, la línea horizontal materializa la media de las 8 mediciones observadas. Las dosis de anexina A3 son expresados en % de la dosis de partida;

la figura 3 representa la dosificación ELISA de la anexina A3 durante el análisis por centrifugaciones sucesivas (800 g, después 12000 g, 150000 g) de ocho orinas expresadas después del tacto rectal. El análisis se efectuó en las 3-4 horas después de la recogida de la muestra. Panel de dosificación de 5C5B10: las muestras y sus fracciones se dosificaron utilizando ELISA TGC44/5C5B10. Panel de dosificación de 13A12G4H2: las muestras y sus fracciones se ensayaron utilizando ELISA TGC44/13A12G4H2. NC: no centrifugado, control; SN: sobrenadante con la velocidad de centrifugación indicada. Para cada grupo de 8 fracciones, la línea horizontal materializa la media de las 8 mediciones observadas. Las dosificaciones de anexina A3 son expresadas en % de la dosis de partida;

la figura 4 representa la dosificación ELISA de la anexina A3 durante el análisis por centrifugaciones sucesivas (800 g, 12 000 g, 150 000 g) de otras diez orinas expresadas después del tacto rectal. El análisis se efectuó en las 3-4 horas después de la recogida de la muestra. Panel de dosificación de 5C5B10: las muestras y sus fracciones se han dosificado utilizando ELISA TGC44/5C5B10. Panel de dosificación de 13A12G4H2: las muestras y sus fracciones se han dosificado utilizando ELISA TGC44/13A12G4H2. % soluble = dosificación en el sobrenadante de ultracentrifugación/ dosificación inicial x 100; % exosoma = (sobrenadante 12 000 g / dosificación inicial x 100) - % soluble; % membrana = 100 -(sobrenadante 12 000 g / dosificación inicial x 100).

la figura 5 representa la reactividad de los 4 dominios repetidos D1 a D4 de la anexina A3, expresados en una forma recombinante, con los 6 anticuerpos monoclonales anti-anexina A3 indicados, y analizada mediante la técnica de transferencia western. Para los geles TGC42 y 1F10A6, el primer pocillo corresponde al marcador de peso molecular;

la figura 6 es una alineación de las secuencias de las diferentes proteínas recombinantes que expresa unos dominios de anexina A3 y resume la inmunoreactividad de cada uno de estos recombinantes con el anticuerpo monoclonal TGC44, analizada mediante la técnica de transferencia western. Los tres puntos de suspensión en el extremo N-terminal o C-terminal de una secuencia indican que sigue en la construcción, incluso si no se representa en su totalidad en la figura. El codón stop se representa por una estrella (*);

la figura 7 ilustra el impacto de las mutaciones alanina del dominio D4 sobre el reconocimiento de ANXA3 por los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6. El análisis se ha realizado mediante la técnica ELISA. El anticuerpo de captura es el TGC44. Los anticuerpos 13A12G4H2, 1F10A6 ensayados se han utilizado para la detección. La posición de las mutaciones alanina sobre la secuencia proteica de ANXA3 se representa en las abscisas. La ordenada es la "signal fold change" que corresponde a \log_2 (señal de proteína mutada/señal de proteína no mutada). El anticuerpo 5C5B10 que no está dirigido contra el dominio D4 no se ve afectado, sirve de control. Las flechas indican las mutaciones para las cuales existe una perturbación de la señal de reconocimiento para 13A12G4H2 y 1F10A6, que permiten definir los restos implicados en la fijación de estos anticuerpos.

la figura 8 ilustra la ausencia de reactividad cruzada en formatos de dosificación ELISA descritos con otras 7 proteínas de la familia de las anexinas. El gráfico representa la señal ELISA obtenida en "Relative Fluorescence Values" (RFV) sobre el aparato VIDAS[®] para cada uno de los formatos de ensayo TGC44/5C5B10 y TGC44/13A12G4H2 y para cada anexina indicada en las abscisas. A título de comparación, en las condiciones experimentales utilizadas, la anexina A3 permitía obtener una señal superior a 6000 RFV con cada uno de los formatos de ensayo;

la figura 9 representa los sensorgramas obtenidos para cada uno de los 6 anticuerpos monoclonales, caracterizados con la ayuda del Biacore[™] T100. Los gráficos representan la señal de resonancia medida en "Resonance Units" (RU) en función del tiempo. Cada curva de un gráfico representa el conjunto de las mediciones efectuadas para una concentración de anexina A3 dada. Para cada anticuerpo se han analizado y representado 9 diluciones comprendidas entre 0 y 64 nM de anexina A3;

la figura 10 reúne unos gráficos relativos a la dosificación de ELISA de la anexina A3 en las orinas expresadas después del tacto rectal, en pacientes que presentan un cáncer de próstata confirmado por biopsia (cáncer), y pacientes que tienen una patología de la próstata pero cuya malignidad se ha excluido (sin cáncer). El grupo "sin cáncer" está constituido mayoritariamente de pacientes que tienen hipertrofia benigna de la próstata. Los gráficos a la izquierda de la página titulados 5C5B10_SG representan la dosificación de anexina A3 medida por la dosificación VIDAS TGC44/5C5B10 en ng/ml y normalizada por la densidad de orina medida por la tira Combur[™] 10 según la fórmula: dosificación normalizada = dosificación VIDAS / (densidad de orina - 1). De la misma manera, los gráficos a la derecha de la página titulados 13A12G4H2_SG representan la dosificación de anexina A3 medida por la dosificación VIDAS TGC44/13A12G4H2 en ng/ml y normalizada por la densidad urinaria. Se han estudiado dos diferentes cohortes de pacientes: la cohorte n° 1 comprende 127 pacientes y la cohorte n° 2 94 pacientes. Para cada serie de datos, la media de la serie se representa en forma de una raya horizontal en los gráficos. La probabilidad asociada al ensayo de Mann-Whitney unilateral está también indicada en cada gráfico: *valor de p* < 0,05 = *, *valor de p* < 0,01 = **, *ns* = no significativo.

La figura 11 representa el efecto del ión calcio y del agente de quelación EDTA sobre las dosificaciones medidas con las dosificaciones 5C5B10 y 13A12G4H2. Once orinas recogidas después del tacto rectal se dosificaron directamente (sin tratamiento) o después de la adición de 5 o 25 mM de CaCl₂, o después de la adición de 5 o 25 mM de EDTA. El eje de las ordenadas representa la relación de las dosis con tratamiento (Ca₂₊ o EDTA)/dosificación sin tratamiento. La media de las series se representa en forma de una raya horizontal en los gráficos. También se indica en cada serie la probabilidad asociada al ensayo de Wilcoxon signed-rank bilateral que permite comparar 1 relación a 1, habiendo sido esta probabilidad corregida para ensayos múltiples según Bonferroni.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de la anexina A3 por ELISA en diferentes tipos de muestras

Obtención de los anticuerpos monoclonales

Los experimentos de inmunizaciones se realizaron en ratones BALB/c (H-2^d) hembras de seis a ocho semanas de edad, en el momento de la primera inmunización. La proteína anexina A3 nativa humana se compró a la compañía Arodia Arotech Diagnostic (Cat n° 25592), ésta se purifica a partir de neutrófilos humanos. Esta proteína se mezcló volumen por volumen con el adyuvante de Freund (Sigma), preparado en forma de emulsión agua en aceite y del cual se conoce que presenta un buen poder inmunológico. Han recibido tres dosis sucesivas de 10 µg de

inmunógeno a cero, dos y cuatro semanas. Todas las inyecciones se realizan por vía sub-cutánea. La primera inyección se realiza en mezcla con el adyuvante de Freund completo, las dos siguientes se realizan en mezcla con el adyuvante de Freund incompleto. Entre D50 y D70 después de la primera inyección, las respuestas humorales se han reestimulado con una inyección intravenosa de 100 µg de la proteína nativa.

A fin de seguir la aparición de los anticuerpos, se efectúan regularmente sobre los ratones unas extracciones de sangre. La presencia de los anticuerpos anti-ANXA3 se ensaya utilizando un ELISA. La proteína de interés se utiliza para la captura (1 µg/pocillo), después de la saturación, se hace reaccionar con el antígeno diferentes diluciones de sueros a ensayar (incubación a 37°C, durante 1h). Los anticuerpos específicos presentes en el suero se revelan por un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón AffiniPure conjugado con la fosfatasa alcalina (H+L, Jackson ImmunoResearch, Cat nº 115-055-146), que se une a los anticuerpos buscados (0,1 µg/pocillo).

Tres días después de la última inyección, uno de los ratones inmunizado se ha sacrificado; se han extraído la sangre y el bazo. Los esplenocitos obtenidos a partir del bazo se cultivaron con las células de mieloma Sp2/0-Ag14 para que fusionen y se inmortalicen, según el protocolo descrito por (8, 9). Después de un periodo de incubación de 12-14 días, se realizó un cribado de los sobrenadantes de hibridomas obtenidos para determinar la presencia de anticuerpos anti-ANXA3 utilizando el ensayo ELISA descrito en el párrafo anterior. El inmunógeno (ANXA3 nativo), la anexina A3 recombinante producida en *E. coli*, y diferentes células humanas que expresan ANXA3 se han utilizado sucesivamente para cribar los sobrenadantes de hibridomas. Las colonias de hibridomas positivas se han subclonado dos veces según la técnica de la dilución límite, bien conocida por el experto en la materia.

Los anticuerpos monoclonales anti-anexina A3, 5C5B10, 13A12G4H2, 9C6B4, 6D9D10, 1F10A6 se obtuvieron así.

Selección de los anticuerpos monoclonales anti-ANXA3 para dosificación por inmunoensayo de ANXA3

La complementariedad de los diferentes anticuerpos anti-ANXA3 obtenidos como se ha descrito anteriormente y de los anticuerpos TGC42, TGC43 y TGC44 descritos en la solicitud de patente WO 2010/034825 se ha analizado utilizando como antígeno la ANXA3 nativa (inmunógeno) diluida en tampón PBS, realizando un inmunoensayo de tipo sándwich. Este tipo de dosificación se puede realizar en microplaca, de manera automatizada o manual, o también utilizando unos dispositivos de inmunoanálisis como VIDAS (bioMérieux).

Se han utilizado los reactivos del kit Vidas® HBs Ag ultra (bioMérieux, Cat nº 30315), tales como se describen en la reseña correspondiente (Ref. 11728 D-FR-2005/5) y modificada de la siguiente manera:

* unos conos se han sensibilizado con unos anticuerpos de captura a ensayar, TGC42, TGC43, TGC44 o 9C6B4 a una concentración de 10 µg/ml.

* el contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se ha sustituido por 300 µl de anticuerpos de revelación a ensayar (5C5B10, 13A12G4H2, 9C6B4, 6D9D10, 1F10A6, TGC42, TGC43, TGC44) acoplados a la biotina, diluidos a 1 µg/ml en el tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra (pocillo X1) que contiene el suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l.

* la proteína ANXA3 nativa se ensaya diluida al 100, 25 y 3 ng/ml en tampón PBS. La muestra se deposita (150 µl) en el primer pocillo (pocillo X0) del cartucho HBs Ag Ultra.

* la reacción ELISA se ha realizado con la ayuda del dispositivo Vidas® y del protocolo descrito para el ensayo HBs Ag Ultra.

* los resultados se han obtenido en forma de valores brutos después de la sustracción del ruido de fondo. La señal está en RFV (relative fluorescent value).

La tabla 1 siguiente resume los resultados obtenidos (señal RFV), con las diferentes combinaciones de anticuerpos utilizados para la captura o para la detección, sobre tres diluciones de la anexina A3 nativa purificada de los neutrófilos (100, 25 y 3 ng/ml).

Tabla 1

Anticuerpos de revelación biotinilados		Anticuerpos de captura			
Clon	Dilución ANXA3 ng/ml	TGC42	TGC43	TGC44	9C6B4
TGC42	0	-	22	11	17
	3	-	44	20	78
	25	-	238	89	500
	100	-	859	297	1837
TGC43	0	106	-	39	63
	3	111	-	36	82

	25	144	-	56	257
	100	232	-	86	914
TGC44	0	21	9	-	12
	3	32	19	-	19
	25	98	89	-	74
	100	303	309	-	261
9C6B4	0	51	42	33	-
	3	65	122	39	-
	25	201	744	117	-
	100	590	3525	357	-
5C5B10	0	20	12	93	9
	3	5244	3669	5870	39
	25	10480	9874	10429	249
	100	11310	11095	11168	1139
13A12G4H2	0	26	21	18	19
	3	2298	676	3733	23
	25	9655	8468	10208	21
	100	11380	10995	11332	21
6D9D10	0	12	23	16	9
	3	11	23	14	9
	25	12	23	18	19
	100	18	41	43	27
1F10A6	0	45	9	14	14
	3	159	207	194	17
	25	4014	6728	5680	13
	100	10489	10931	10688	15

La tabla 2 siguiente resume los resultados obtenidos descritos en la tabla 1, pero con una parrilla de lectura diferente, para facilitar el análisis y la interpretación:

5 Si RFV a 3 ng/ml < 1000 entonces “-“

Si RFV a 3 ng/ml > 1000 entonces “+“

Si RFV a 25 ng/ml > 3000 entonces “++“

10 Si (RFV a 100 ng/ml > 9000 entonces) y (3000 < RFV a 25 ng/ml < 9000) entonces “+++“

Si RFV a 100 ng/ml y 25 ng/ml > 9000 entonces “++++“

15 Tabla 2

*mAb de captura	*mAb de detección biotinilado							
	TGC42	TGC43	TGC44	9C6B4	5C5B10	13A12G4H2	1F10A6	6D9D10
TGC42	-	-	-	-	++++	++++	+++	-
TGC43	-	-	-	+	++++	+++	+++	-
TGC44	-	-	-	-	++++	++++	+++	-
9C6B4	+	-	-	-	+	-	-	-

mAb = anticuerpo monoclonal

20 Como es evidente de la tabla anterior, existen 9 combinaciones de anticuerpos monoclonales complementarias que permiten realizar una dosificación ELISA de tipo sándwich de ANXA3, con una dinámica de señal muy satisfactoria (parejas “+++” y “++++”). Otras combinaciones de anticuerpos monoclonales complementarias son posibles, a saber 9C6B4 / TGC42, 9C6B4 / TGC43 y 9C6B4 / 5C5B10, pero estas soluciones no son lo suficientemente sólidas desde un punto de vista analítico y no tienen la sensibilidad analítica suficiente para ser utilizadas en la orina.

25 Para la captura, los anticuerpos monoclonales TGC42, TGC43 y TGC44 tienen rendimientos equivalentes frente a anexina 3.

30 Para la detección, los anticuerpos monoclonales 5C5B10 y 13A12G4H2 tienen también unos rendimientos equivalentes frente a anexina 3, mientras que el anticuerpo monoclonal 1F10A6 da unas señales satisfactorias, pero más débiles que con los anticuerpos monoclonales 5C5B10 y 13A12G4H2.

Selección de los anticuerpos monoclonales anti-ANXA3 según su capacidad para detectar ANXA3 prostática

La complementariedad y la capacidad de los anticuerpos anti-ANXA3 para detectar ANXA3 prostática se ha analizado utilizando la técnica de ELISPOT. Se trata de una variante de la técnica ELISA que detecta directamente las secreciones de las células en cultivo. Las células humanas WPE1-NB26 (ATCC Cat n° CRL-2852) procedentes de una línea epitelial prostática, las RWPE-1 (ATCC Cat n° CRL-11609) se han seleccionado como modelo de expresión de ANXA3 humana producida por la próstata. Estas células se han transformado en células cancerosas por un tratamiento con MNU (N-metil-N-nitrosurea) (10). Se cultivan en el medio K-SFM (Gibco) suplementado con 5 ng/ml de EGF (Factor de crecimiento epidérmico) y 0,05 mg/ml de BPE (extracto de pituitaria bovina). Las líneas se incuban a 37°C con un 5% de CO₂.

Los anticuerpos monoclonales de captura (TGC42, TGC43, TGC44, 5C5B10, 13A12G4H2, 9C6D9, 1F10A6) se han adsorbido sobre placas de 96 pocillos MultiScreen™ HTS (Millipore, Cat n° MSIP4510) a una concentración de 1 µg/pocillo en PBS estéril durante una noche a 4°C. Las placas se lavan después con PBS y se saturan con el medio de cultivo que contiene 10% de suero fetal de ternera (SVF). Paralelamente, las células se cuentan, después se diluyen y se distribuyen a razón de 1000 células por pocillo. Las placas se incuban 20h a 37°C y un 5% de CO₂, después se vacían. Las células restantes se lisan entonces mediante un tratamiento con agua helada durante 10 minutos. Las placas se lavan después con PBS que contiene un 0,05% de Tween-20. Los anticuerpos de revelación biotinilados (TGC42, TGC43, TGC44, 5C5B10, 13A12G4H2, 9C6D9, 1F10A6) se añaden a 0,1 µg/pocillo diluidos en PBS-1%, BSA-0,05%, Tween-20 y se incuban durante 2h a temperatura ambiente. Después de varios lavados, los puntos se revelan mediante la adición de extravidina-fosfatasa alcalina (Sigma, Cat. N° E2636) durante una hora a temperatura ambiente, seguido del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitro azul de tetrazolio (nitro blue tetrazolium) (BCIP/NBT, Biorad, Cat. N° 170-6432).

La secreción de anexina A3 por las células WPE1-NB26 se mide cualitativamente por el observador. El número de puntos observados se detalla en una escala de – a ++++ (tabla 3). La mejor solución para detectar la anexina A3 de origen prostático es emparejar un anticuerpo entre TGC42, TGC43 o TGC44 con un anticuerpo seleccionado entre 13A12G4H2 y 1F10A6. Los anticuerpos seleccionados se pueden utilizar indistintamente para la captura o para la detección, la única condición es que se asocia un anticuerpo de cada grupo.

Los resultados se resumen en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3

*mAb de captura	*mAb de detección biotinilado						
	TGC42	TGC43	TGC44	9C6B4	5C5B10	13A12G4H2	1F10A6
TGC42	-	-	-	+	++	++++	++++
TGC43	-	-	-	+	++	++++	++++
TGC44	-	-	-	+	++	++++	++++
9C6B4	-	-	-	-	-	-	-
5C5B10	-	-	-	+	-	-	-
13A12G4H2	++++	++++	++++	+	-	-	-
1F10A6	+++	++++	+++	+	-	-	-

*mAb = anticuerpo monoclonal

De manera muy sorprendente, la anexina A3 segregada por una línea prostática cancerosa se detecta menos cuando se asocia a un anticuerpo seleccionado entre TGC42, TGC43 y TGC44 para la captura y el anticuerpo 5C5B10 para la detección. Ahora bien, con el inmunoensayo VIDAS® realizado en la anexina A3 purificada de los neutrófilos, tal diferencia entre los anticuerpos 5C5B10 y 13A12G4H2 no se ha observado, como se muestra en la tabla 2.

Detección de la anexina A3 en las orinas expresadas por los pacientes después de un tacto rectal

Se han obtenido seis muestras de orina exprimida después del tacto rectal y tratadas según el procedimiento descrito en la solicitud de patente WO 2007/141043 y por (11). La duración media de la palpación de la próstata era de 10 segundos, en lugar de los 20 segundos indicados en la solicitud WO 2007/141043.

ANXA3 contenida en estas diferentes muestras biológicas se ha cuantificado con cada uno de los nueve dosificaciones ELISA seleccionadas. Los anticuerpos de detección biotinilados se han diluido a 0,5 µg/ml para los monoclonales 5C5B10 y 13A12G4H2, a 1 µg/ml para el clon 1F10A6. Para cada dosificación ELISA, se ha establecido una curva de calibración determinando una gama de concentración de la proteína anexina A3 nativa purificada (Arodia). La curva de calibración se trazó detallando en las abscisas el logaritmo de base diez de la concentración y en ordenadas la señal medida por Vidas® en RFV. La concentración de ANXA3 presente en la muestra biológica se ha calculado interpolando la concentración correspondiente a la señal RFV leída por Vidas®, con la ayuda de modelos matemáticos de regresión no lineal como un polinomio del tercer orden o un modelo 4-PL, bien conocidos por el experto en la materia. Los resultados se presentan en la tabla 4 siguiente.

Tabla 4

Dosificaciones de anexina A3 en ng/ml según el formato de dosificación ELISA (Anticuerpo de captura – anticuerpo de detección)									
P*	TGC42-5C5B10	TGC43-5C5B10	TGC44-5C5B10	TGC42-13A12G4H2	TGC43-13A12G4H2	TGC44-13A12G4H2	TGC42-1F10A6	TGC43-1F10A6	TGC44-1F10A6
A	90	99	123	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
B	5	2	5	9	11	13	13	14	14
C	2	1	2	6	8	8	9	9	10
D	11	3	13	78	80	81	77	86	97
E	22	7	28	110	144	154	120	136	149
F	1100	810	2100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

5 P* = paciente

Los resultados de dosificaciones ELISA Vidas® de ANXA3 de orina en los seis pacientes se resumen en la tabla 4 y se representan en la figura 1. Estos resultados son extremadamente sorprendentes y ponen en evidencia una complejidad de ANXA3 urinaria hasta ahora insospechada. En efecto, para una muestra dada, los 9 formatos de ensayo ELISA no dan siempre la misma dosis. Esta diferencia está relacionada con el anticuerpo de detección: para una muestra dada y un anticuerpo de detección dado, las dosis obtenidas son muy similares, incluso idénticas, sea cual sea el anticuerpo de captura (TGC42, TGC43 o TGC44). La correlación entre las dosis obtenidas por los formatos que utilizan TGC42 y las obtenidas por los formatos que utilizan TGC43 es de 0,956 (r de Spearman, *valor de p* < 0,0001). La correlación entre las dosis medidas por los formatos que utilizan TGC42 y la obtenida por los formatos que utilizan TGC44 es de 0,994 (r de Spearman, *valor de p* < 0,0001). Los 3 anticuerpos de captura se comportan de manera muy similar. No son la causa de las diferencias observadas.

Las concentraciones de Anexina A3 calculadas con ELISA utilizando para la detección los anticuerpos 13A12G4H2 o 1F10A6 están también correlacionadas (r de Spearman $r = 0,999$, *valor de p* < 0,0001). La pendiente de la recta calculada poniendo en abscisas las dosis obtenidas por las ELISA utilizando 13A12G4H2 y en las ordenadas las obtenidas por las ELISA utilizando 1F10A6 es de 1: estos dos anticuerpos dan dosis idénticas. A la inversa, no existe ninguna correlación entre las dosis calculadas con el anticuerpo 5C5B10 utilizado para la detección y las calculadas con 13A12G4H2.

En función de este análisis realizado sobre las orinas expresadas, las 9 dosificaciones ELISA pueden dividirse en 2 grupos. El grupo 1 corresponde a las combinaciones de los anticuerpos de captura TGC42, TGC43 o TGC44 con los clones 13A12G4H2 o 1F10A6 utilizados para la detección. El grupo 2 corresponde a las combinaciones de los anticuerpos de captura TGC42, TGC43 o TGC44 con el monoclonal 5C5B10 utilizado para la detección. Como cada uno de estos anticuerpos es muy específico de ANXA3, los dos grupos de ELISA miden una información biológica diferente. El análisis en ELISPOT presentado anteriormente sugiere que las ELISA del grupo 1 que utiliza los clones 13A12G4H2 o 1F10A6 son más adecuadas para detectar ANXA3 de origen prostático.

Ejemplo 2: Caracterización de la anexina A3 urinaria

Se han obtenido ocho muestras de orina exprimida post-tacto rectal según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, transportados del hospital al laboratorio y sometidos a los análisis descritos en las 4h después de la recogida. La dosificación TGC44/13A12G4H2 (denominada únicamente 13A12G4H2 a continuación) se ha seleccionado como dosificación prototipo del grupo 1 definido en el ejemplo 1. De la misma manera, la dosificación TGC44/5C5B10 (denominada únicamente 5C5B10 a continuación) se ha seleccionado como dosificación prototipo que representa el grupo 2.

Análisis de la orina expresada por filtraciones sucesivas

Las orinas recientemente recogidas han sufrido unas filtraciones sucesivas:

* una primera filtración sobre una membrana con poros de 0,45 μm de diámetro (Millex), el filtrado se recupera después y se aparta un alícuota para dosificaciones: FT 0,45 μm .

* el filtrado FT 0,45 μm se filtra sobre una membrana de 0,22 μm (Millex) y se aparta un alícuota para dosificaciones: FT 0,22 μm .

* el filtrado FT 0,22 μm se filtra de nuevo esta vez sobre una membrana de 0,02 μm (Millipore), cuyo tamaño de poros retiene los exosomas urinarios, es el FT 0,02 μm .

5 Cada una de estas fracciones se dosifica después con los 2 formatos de ensayo de ELISA prototipo sobre un dispositivo Vidas®. Las dosis de anexina A3 medidas en cada una de las fracciones se expresan en porcentaje de la dosis inicial de anexina A3 urinaria antes de la primera filtración (=100%). Los resultados se representan en la figura 2. La disminución de la dosis entre dos filtrados sucesivos indica que unas partículas biológicas que contienen ANXA3 se han retenido sobre la membrana de filtración. Así, según unos principios bien conocidos por el experto en la materia, una filtración sobre 0,45 µm retiene las células y los residuos celulares (12, 13), una filtración sobre 0,22 µm retiene algunos organelos y unas fracciones subcelulares y una filtración sobre 0,02 µm retiene los exosomas (14-16). Esta disminución es bien observada para todas las muestras, con los dos procedimientos de dosificación utilizados (5C5B10 y 13A12G4H2). En la gran mayoría de las orinas expresadas (6/8), aproximadamente 20 a 40% de ANXA3 se encuentra asociada a restos celulares u otras fracciones subcelulares. Los restantes 60 al 80% se eliminan por filtración sobre 0,02 µm, y se asocian por lo tanto a exosomas. En las 8 muestras de orina expresadas ensayadas, se ha encontrado ANXA3 soluble (que pasa a través de un filtro de 0,02 µm) sólo en una única muestra con la dosificación 5C5B10 y en dos muestras con la dosificación 13A12G4H2.

15 **Análisis de la orina expresada por centrifugaciones sucesivas**

Las mismas orinas recientemente recogidas se han fraccionado también por centrifugaciones sucesivas:

20 * las orinas son centrifugadas una primera vez a 800 g durante 5 minutos, el sobrenadante se recupera y se aparta un alícuota para dosificaciones: SN 800.

* el sobrenadante urinario procedente de la centrifugación a 800 g se centrifuga a 12 000 g durante 7 minutos, el sobrenadante se recupera y se aparta un alícuota para dosificaciones: SN 12 000.

25 * el sobrenadante urinario obtenido después de la centrifugación a 12 000 g se ultracentrifuga después a 150 000 g durante la noche a 4°C a fin de precipitar los exosomas de orinas en el residuo. El sobrenadante recogido es el SN ultra.

30 Cada una de estas fracciones se dosifica después con los 2 formatos de ensayo ELISA prototipo sobre un dispositivo Vidas®. Las dosis de anexina A3 medidas en cada una de las fracciones son expresadas en porcentaje de la dosis inicial de anexina A3 urinaria antes de cualquier centrifugación (NC=100%). Los resultados se representan en la figura 3. La disminución de la dosis entre dos sobrenadantes sucesivos indica que unas partículas biológicas que contiene ANXA3 se han separado en el residuo durante la centrifugación.

35 Así, según principios bien conocidos por el experto en la materia, una centrifugación a 800 g agrega la mayoría de las células humanas, una centrifugación a 12 000 g agrega los restos celulares residuales y algunos organelos y una ultracentrifugación durante una noche agrega todas las partículas subcelulares, incluso las vesículas de tipo exosomas (17, 18). Cualquier proteína que se queda en el sobrenadante después de una ultracentrifugación se considera como soluble (19). Esta disminución es bien observada para todas las muestras, con los dos procedimientos de dosificación utilizados (5C5B10 y 13A12G4H2). En la gran mayoría de las orinas expresadas (6/8), aproximadamente del 20 al 25% de ANXA3 se encuentra asociado a restos celulares u otras fracciones subcelulares. Los restantes 75 al 80% se precipitan sólo por ultracentrifugación durante una noche, y se asocian por lo tanto a partículas de tipo exosomas. En las 8 muestras de orina expresadas ensayadas, se ha encontrado ANXA3 soluble (que permanece en el sobrenadante después de un noche de ultracentrifugación) solamente en las dos muestras ya identificadas como conteniendo ANXA3 soluble con el análisis expuesto en el párrafo 1, y esto con las dos técnicas de dosificación de 5C5B10 y 13A12G4H2.

50 Una nueva serie de 10 orinas recientemente recogidas se ha analizado modificando ligeramente las condiciones de centrifugación. La centrifugación a 800 g fue de 10 minutos, y la de 12 000 g de 30 minutos. Los resultados de este segundo experimento de centrifugaciones sucesivas se presentan en la figura 4 y confirman las observaciones realizadas durante el primer experimento (figura 3). Además, muestran que la dosificación 13A12G4H2 reconoce más frecuentemente que la dosificación 5C5B10 la ANXA3 asociada a los exosomas.

55 Globalmente, los resultados de los fraccionamientos por filtración y por centrifugación son extremadamente concordantes e indican que la mayoría de ANXA3 a ensayar se encuentra asociada a exosomas, pero no únicamente. Se ha mostrado que ANXA3 se encuentra también asociada a partículas de tamaño más importante, como restos celulares, y que podía también estar en forma soluble. La preparación de muestra para un análisis en transferencia western permite solubilizar y desnaturalizar las proteínas y así disminuir esta complejidad, lo que puede explicar en parte las dificultades encontradas hasta ahora para encontrar un procedimiento de dosificación ELISA que sea utilizable en los fluidos biológicos y en particular la orina. Por supuesto, el procedimiento de tratamiento de las orinas expresadas recogidas, las condiciones de conservación (temperatura, tampón) son tantos factores que pueden hacer variar la repartición de ANXA3 en las diferentes fracciones de orinas en las que puede estar presente.

65 **Ejemplo 3: Determinación de los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales anti-ANXA3**

Expresión de los 4 dominios “annexin repeat” de la anexina A3 en forma recombinante y determinación de los dominios repetidos reconocidos por los anticuerpos monoclonales.

- 5 Como todos los miembros de la familia de las anexinas, la anexina A3 contiene en su secuencia proteica unos dominios denominados “annexin repeat”. Estos dominios repetidos son en número de 4 y caracterizan la familia. A fin de determinar el dominio repetido reconocido por cada uno de los anticuerpos monoclonales, estos dominios se han expresado en forma recombinante. Una secuencia de 8 histidinas se ha añadido a la parte N-terminal de cada dominio a fin de permitir la purificación por cromatografía de afinidad metal-quelato. La tabla 5 resume las
10 secuencias proteicas de las construcciones de recombinantes que permiten expresar cada uno de los dominios repetidos de manera aislada.

Tabla 5

Dominio	Real ^a	Expresado ^b	Secuencia proteica
D1	27-87	19-89	MGHHHHHHHSPSVDAEAIQKAIKRGIGTDEKMLISILTERSNAQRQLI VKEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHLMVALVT (SEQ ID : 6)
D2	99-159	92-160	MGHHHHHHHHAVFDAKQLKKSMMKAGTNEALIEILTRTSRQMKDIS QAYYTIVYKKSGLGDDISSETSGDFRKALLTLA (SEQ ID : 7)
D3	183-243	171-245	MGHHHHHHHDEHLAKQDAQILYKAGENRWGTDEDKFEILCLRSFPQ LKLTFDEYRNISQKDIVDSIKGELSGHFEDLLLAIVN (SEQ ID ; 8)
D4	258-318	252-323	MGHHHHHHHHAFLAERLHRALKGIGTDEFTLNMRIMVSRSEIDLLDIRT EFKKHYGYSLSAIKSDTSGDYEITLLKICGGDD (SEQ ID : 9)

15 ^a real: extensión del dominio repetido, del primer al último aminoácido, según la base de datos UniProtKB (<http://www.uniprot.org>).

20 ^b Expresado: extensión de la construcción que contiene el dominio repetido, numeración de los aminoácidos según UniProtKB. Las construcciones contienen algunos aminoácidos suplementarios en los extremos N y C terminales del dominio, a fin de no interrumpir las hélices alfa y permitirles formarse.

25 Las secuencias de ácidos nucleicos que corresponden a las secuencias proteicas de los dominios D1, D2, D3, D4 se han obtenido por síntesis química por la compañía Genearth. Estas secuencias nucleicas se han optimizado para favorecer la expresión de las proteínas en *Escherichia coli*. Los fragmentos de ADN se han clonado entre los sitios Nco I y Xba I del vector de expresión procariota pMRCH79 (derivado de pMR78, bioMérieux). Los plásmidos así obtenidos se han transformado en las bacterias BL21 (DE3) (Stratagene). Los cultivos para producir los diferentes dominios se realizan a 37°C bajo agitación en un medio 2-YT (Invitrogen). La inducción se efectúa con 0,5 mM de IPTG (beta-1-tiogalactosidasa de isopropilo). Los restos bacterianos son directamente recogidos en el tampón de
30 muestras de los geles NuPAGE Novex (Invitrogen) siguiendo el modo de realización proporcionado con los geles, en condiciones reducidas. La separación de las proteínas se realiza en gel NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12%. El análisis en transferencia western de la reactividad de los anticuerpos monoclonales para los diferentes dominios de la anexina A3 se realiza utilizando un sustrato quimioluminiscente, según el procedimiento descrito en la solicitud de patente WO 2009/019365 por ejemplo, bien conocido por el experto en la materia. Los anticuerpos a ensayar se han
35 utilizado a una dilución de 10 µg/ml. El tiempo de exposición ha sido de 100 segundos, salvo que se indique lo contrario.

Cada anticuerpo anti-ANXA3 se ha ensayado con los recombinantes que expresan los 4 dominios repetidos de ANXA3; los resultados de este análisis de transferencia western se presentan en la figura 5. Los anticuerpos monoclonales TGC42, TGC43, TGC44 y 5C5B10 son específicos del dominio D1. Los anticuerpos monoclonales 13A12G4H2 y 1F10A6 se dirigen contra el dominio D4. En cuanto a los anticuerpos 9C6D4 y 6D9D10, éstos no reconocen ninguno de los 4 dominios repetidos, lo que indica muy probablemente que sus epítomos están situados fuera de los dominios repetidos de ANXA3.

45 Análisis detallado de los epítomos reconocidos por los anticuerpos anti-ANXA3

La determinación de los epítomos se ha efectuado con la técnica del Spotscan según Frank y Döring (20), que se describe en detalle en la solicitud de patente WO 2009/019365. Con este objetivo, la totalidad de la secuencia proteica de la anexina A3 se ha reproducido en una membrana de nitrocelulosa en forma de péptidos de 12 aminoácidos solapantes, desplazados de 2 aminoácidos. Después, en una segunda síntesis, la secuencia de ANXA3 se ha reproducido en forma de péptidos de 15 aminoácidos solapantes, desplazados de un aminoácido. La inmunorreactividad de estas membranas de péptidos solapantes se ha ensayado con los anticuerpos anti-ANXA3.

Así, ha sido posible delimitar de manera más detallada los epítomos de 5 anticuerpos monoclonales anti-ANXA3 entre los 8 estudiados. Los epítomos deducidos de la comparación de las secuencias de los péptidos solapantes reconocidos se resumen en la tabla 6. El epítomo mínimo es la secuencia mínima necesaria para obtener un reconocimiento del anticuerpo, con una señal más o menos intensa. El epítomo óptimo es la secuencia ideal que permite el mejor reconocimiento posible del anticuerpo, incluyendo o siendo idéntico al epítomo mínimo. Nuestros resultados confirman que TGC42 y TGC43 se dirigen bien contra un epítomo único, el que se describe inicialmente en la solicitud WO 2010/034825. De manera sorprendente, el anticuerpo 5C5B10 define un nuevo epítomo que no estaba descrito en la técnica anterior. Los anticuerpos 6D9D10 y 9C6D4 son específicos del extremo N-terminal de la proteína, como el monoclonal TGC7 de la solicitud WO 2007/141043. Los anticuerpos monoclonales TGC44, 13A12G4H2 y 1F10A6 no presentan ninguna reactividad en Spotscan, incluso en una membrana que lleva unos péptidos de 20 aminoácidos de largo. Poseen probablemente unos epítomos conformacionales o al menos semi-conformacionales cuyas estructuras no son lo bastante bien reproducidas por unos péptidos de síntesis.

Tabla 6

Anticuerpo	Dominio	Epítomo óptimo ^a	Epítomo mínimo ^b
TGC42	D1	SNAQRQLIVKEYQAAYG (49-65) (SEC ID N° 10)	LIVKEYQAAYG (55-65) (SEC ID N° 11)
TGC43	D1	IVKEYQAAYGKE (56-67) (SEC ID N° 12)	KEYQAAYG (58-65) (SEC ID N° 13)
5C5B10	D1	DLSGHFEHL (75-83) (SEC ID N° 14)	LSGHFEH (76-82) (SEC ID N° 15)
6D9D10	N-term	ASIWVGHRGTVRDYPDFSPS (2-21) (SEC ID N° 16)	SIWVGHRGTVRDYPDFSP (3-20) (SEC ID N° 17)
9C6D4	N-term	YPDF (15-18) (SEC ID N° 18)	YPDF (15-18) SEC ID N° 18)

^a epítomo óptimo: secuencia ideal que permite el mejor reconocimiento posible del anticuerpo (que incluye o que es idéntico al epítomo mínimo).

^b epítomo mínimo: secuencia mínima necesaria para obtener un reconocimiento del anticuerpo (señal más o menos intensa).

Localización precisa del epítomo del anticuerpo TGC44 por la técnica Novatope

El sistema Novatope (Merck, Cat n° 69279) es una tecnología que permite el análisis de una proteína con el objetivo de seleccionar unos dominios que contienen epítomos. El método se basa en la creación de un banco de clones bacterianos, expresando cada uno un fragmento de la proteína, cortada aleatoriamente. Estos clones se analizan por inmunorrevelación con los anticuerpos que se quiere caracterizar. La secuenciación del ADN de los clones positivos permite deducir la secuencia proteica de un fragmento que contiene el epítomo. La técnica se ha aplicado siguiendo el modo de realización proporcionado con el kit.

Así, dos clones que reaccionan con el anticuerpo TGC44 han podido aislarse y secuenciarse. El clon 2J7 expresa la secuencia KEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHLMVALVTPPAVFD (SEC ID N° 19) que corresponde a los restos 58-95 de ANXA3. El clon 2Z13 expresa la secuencia QKAIRGIGTDEKMLISILTERSNAQRQLIVKEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHL (SEC ID N° 20) que corresponde a los restos 28-83 de ANXA3. La parte común entre las secuencias de estos dos clones son los restos 58-83 de la anexina A3, o bien la secuencia KEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHL (SEC ID N° 21). Además, siendo los anticuerpos TGC44 y 5C5B10 complementarios (véase el ejemplo 1), sus dos epítomos no pueden ser solapantes, por lo tanto no se pueden retirar los aminoácidos correspondientes del epítomo del anticuerpo 5C5B10, es decir DLSGHFEHL (75-83) (SEC ID N° 14). Por lo tanto, el epítomo del anticuerpo TGC44 está comprendido en la secuencia KEYQAAYGKELKDDLKG (58-74) (SEC ID N° 22). Se trata de la misma región que la reconocida por TGC42 y TGC43. Por el contrario, el hecho de que el anticuerpo TGC44 no presente ya reactividad bajo Spotscan indica una restricción conformacional para el reconocimiento. TGC44 es capaz de fijarse sobre su epítomo únicamente cuando la secuencia KEYQAAYGKELKDDLKG (58-74) (SEC ID N° 22) está fusionada en el lado N-terminal a una secuencia larga de al menos 30 restos. Así, el dominio repetido recombinante D1, cuya secuencia se identifica como la SEC ID n° 6, los clones 2J7 y 2Z13 fusionados a una proteína portadora o también el fragmento recombinante vANA-7 descrito en la solicitud WO 2010/034825 son todos reconocidos por el clon TGC44. A la inversa, no se reconoce el fragmento recombinante vANA-3, al que le faltan los 34 primeros aminoácidos N-terminales (Figura 6).

Localización precisa del epítomo de los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6

El experimento presentado en la figura 5 muestra que los epítomos de los anticuerpos 13A12G4H2 e 1F10A6 están contenidos en el dominio D4 de la anexina A3. Doce proteínas recombinantes se han construido por mutagénesis dirigida a fin de mejorar el "mapeo" de los anticuerpos dirigidos contra el dominio D4. Se trata de la secuencia completa de ANXA3 nativa madura (aa 2-323), fusionada en el lado N-terminal a un tag histidina (secuencia no mutada). La mutagénesis por PCR se ha utilizado con el fin de introducir unas mutaciones alanina en las posiciones

253, 257, 260, 263, 265, 268, 270, 274, 306, 311 y 317 de la secuencia proteica (GeneArt Mutagenesis Service, Invitrogen). Esta técnica conocida bajo el nombre de alanina scanning permite evaluar una por una la importancia de la contribución de cada resto de aminoácido mutado de la anexina A3 a la fijación de los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6. Todos estos fragmentos de ADN se han clonado en el vector pMRCH79 derivado del vector pMR78, después transformados en las bacterias BL21 (DE3). La producción y la purificación de las proteínas se han realizado según las técnicas bien conocidas por el experto en la materia y que se han citado al principio del ejemplo 3.

Estas 12 proteínas (11 mutantes y 1 control no mutado) se han utilizado después para evaluar la capacidad de fijación de los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6 en ELISA al formato sándwich, utilizando el anticuerpo TGC44 para la captura. El anticuerpo de detección 5C5B10, cuyo epítipo está en el dominio D1 y por lo tanto, no debería ser afectado por las mutaciones del dominio D4 se utiliza como control. Los resultados se presentan en la figura 7. El gráfico representa la "signal fold change" (en las ordenadas) de cada mutación (en las abscisas). La "signal fold change" corresponde al \log_2 (señal proteína mutada/señal proteína no mutada). Cuanto más elevado sea el valor absoluto de la "signal fold change", más afectarán a la fijación del anticuerpo las mutaciones para las cuales se observa esta variación. Así, para 5C5B10, la "signal fold change" está siempre alrededor de 0, lo que indica que ninguna de las mutaciones ensayadas perturba la fijación de este monoclonal. Por el contrario, para 13A12G4H2 y 1F10A6, fue posible identificar unos aminoácidos cuya mutación impide o perturba de manera muy significativa la fijación. Se trata de las posiciones 260, 263, 265 y 306. La mutación de la posición 270 tiene un impacto medible pero menos importante que para las posiciones anteriores. Esto muestra que los aminoácidos 260, 263, 265 y 306 de ANXA3 pertenecen al epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales 13A12G4H2 y 1F10A6, siendo los dos restos más importantes en la interacción antígeno-anticuerpo la lisina (K) en la posición la 263 y el ácido aspártico (D) en la posición la 306.

Ejemplo 4: Especificidad analítica de los formatos de dosificación ELISA anti-ANXA3

Las anexinas son una familia de proteínas que comparten unas homologías de función y de secuencia. Una consulta BLAST efectuada en la base de datos UniProtKB, reducida a las secuencias de origen humano, ha permitido identificar las proteínas que tienen la más alta homología de secuencia con la anexina A3. Se trata, en el orden decreciente de homología, de la anexina A4, la anexina A11, la anexina A6 y la anexina A5.

En consecuencia, era importante demostrar la especificidad de las dosificaciones ELISA frente a anexina A3 y la ausencia de reacción cruzada con los otros miembros de la familia. Como los 3 anticuerpos TGC42, TGC43 y TGC44 se dirigen contra el mismo epítipo, la dosificación TGC44/13A12G4H2 (denominado únicamente 13A12G4H2 a continuación) se ha seleccionado como dosificación prototipo del grupo 1 definido en el ejemplo 1. De la misma manera, la dosificación TGC44/5C5B10 (denominado únicamente 5C5B10 a continuación) se ha seleccionado como dosificación prototipo que representa el grupo 2. La ausencia de reactividad cruzada se ha ensayado utilizando unos antígenos disponibles comercialmente obtenidos de Abnova: anexina A1 (Cat. N° H00000301-P01), anexina A2 (Cat. N° H00000302-P01), anexina A4 (Cat. N° H00000307-P01), anexina A5 (Cat. N° H00000308-P01), anexina A6 (Cat. N° H00000309-P01) y anexina A11 (Cat. N° H00000311-P01). La anexina A13 se ha expresado en forma recombinante en laboratorio por clonación en el vector de expresión pMRCH79; fusionada con un tag histidina, después purificada por cromatografía de afinidad metal-quelato. Las proteínas se han diluido en el tampón del pocillo X1 de VIDAS a una concentración de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ para ELISA TGC44/5C5B10 y a una concentración de 16 $\mu\text{g/ml}$ para ELISA TGC44/13A12G4H2. Los resultados se representan en la figura 8. Las dos formas de ELISA TGC44/13A12G4H2 y TGC44/5C5B10 son ambas muy específicas de la anexina A3 y no presentan reactividad cruzada con las demás anexinas ensayadas.

Ejemplo 5: determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-anexina A3

La tecnología de resonancia plasmónica de superficie permite visualizar en tiempo real las interacciones entre diversas biomoléculas no marcadas. Uno de los reactivos se fija de manera específica sobre un biosensor (sensor chip) mientras que la otra especie implicada en la interacción está en un flujo continuo de tampón. Las mediciones de resonancia plasmónica de superficie se efectuaron utilizando un Biacore T100. Los reactivos que incluyen el sensor chip CM5, el anti-IgG de ratón, específico del fragmento Fc, obtenido en el conejo (RAM Fc), y el kit de acoplamiento por medio de las aminas para la inmovilización de los anticuerpos se obtuvieron todos de GE-Healthcare Bioscience AB.

Con el fin de estudiar las características cinéticas de fijación de los anticuerpos anti-anexina A3, estas últimas se han inmovilizado por captura sobre el sensor chip, sobre el cual el anticuerpo RAM Fc se había acoplado de manera covalente, de manera previa. Los experimentos de fijación se realizaron en tampón HEPES, a 25°C, con un caudal de 30 $\mu\text{l/min}$. La modificación de la señal de resonancia en RU (Resonance Unit) permite seguir en tiempo real la fijación, después de la disociación de las biomoléculas a la superficie del biosensor. En un primer momento, el anticuerpo monoclonal a estudiar se ha inyectado en el canal 2 para obtener una señal de aproximadamente 250 RU. Después, la anexina A3 (Arodia) se inyectó en los canales 1 y 2. Las duraciones de asociación y de disociación eran respectivamente de 5 y 15 minutos. Después de la medición de las respuestas de resonancia, la superficie del biosensor se ha regenerado por un lavado con HCl 50 mM, a 10 $\mu\text{l/min}$ durante 120 segundos. Se repitió el mismo

procedimiento de medición para cada dilución de la proteína anexina A3: en total, se analizaron 9 diluciones diferentes de la proteína comprendidas entre 0 y 64 nM. Los sensogramas obtenidos se trazaron y analizaron con el programa dedicado de Biacore™ T100, según el modelo de interacción 1:1. Las constantes cinéticas de asociación (Kon) y de disociación (Koff) se midieron utilizando los anticuerpos a una concentración de 3 µg/ml, salvo para 13A12G4H2 y 1F10A6 que se utilizaron a 0,75 µg/ml con el fin de limitar el impacto del ruido de fondo. Se calculó la afinidad, representada por la constante de disociación (Kd), ($Kd=Koff/Kon$).

Para cada anticuerpo anti-anexina A3, los gráficos que representan la señal de resonancia en función del tiempo se presentan en la figura 9. Los valores medidos de las constantes de asociación y de disociación, así como el valor calculado de las constantes de afinidad se indican en la tabla 7.

El conjunto de los anticuerpos anti-ANXA3 estudiados presenta unas afinidades elevadas, con Kd que va de 10^{-9} a 5×10^{-10} M. Es posible clasificar los anticuerpos en dos grupos distintos en función de su Kd. El primer grupo corresponde a los anticuerpos 13A12G4H2, TGC42 y TGC44 cuya Kd es superior a 10^{-10} M, es el grupo de los anticuerpos de muy alta afinidad. El segundo grupo corresponde a los anticuerpos 5C5B10, 1F10A6 y TGC43 cuya Kd está comprendida entre 10^{-9} y $3,5 \times 10^{-9}$ M, es el grupo de los anticuerpos de alta afinidad.

Los tres anticuerpos utilizados para la captura, TGC42, TGC43 y TGC44, tienen unas constantes cinéticas de asociación equivalentes, es decir, unas capacidades de captura equivalentes. El anticuerpo 13A12G4H2 tiene también una constante cinética de asociación comparable, lo que confirma así su capacidad de captura mostrada en el ejemplo 1. La constante cinética de asociación del anticuerpo 5C5B10 es de aproximadamente 1 log más bajo que la de TGC44, lo que ilustra su peor capacidad de captura.

En lo que se refiere a las constantes cinéticas de disociación, es también posible dividir los anticuerpos anti-ANXA3 en 2 grupos. El primer grupo contiene TGC44, TGC42, 13A12G4H2 y 5C5B10; se caracteriza por una constante cinética de disociación muy baja, comprendida entre 9×10^{-5} y $3,5 \times 10^{-4}$ s⁻¹. Una vez que la fijación antígeno-anticuerpo ha tenido lugar, la anexina A3 se retiene por los anticuerpos de este grupo y no se disocia. El segundo grupo contiene TGC43 y 1F10A6; se caracteriza por una constante cinética de disociación más elevada, del orden de 10^{-3} s⁻¹. Los anticuerpos de este grupo, incluso si consiguen fijar la anexina A3, se disocian mucho más rápidamente. Así, a pesar de que tienen unas constantes cinéticas de asociación comparables, TGC42 y TGC44 son mejores anticuerpos de captura a utilizar para la realización de una dosificación ELISA que TGC43.

Tabla 7

Anticuerpo fijado sobre el biosensor	Kon (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	Kd (M)
13A12G4H2	5,3E+05	2,7E-04	5,0E-10
TGC42	7,3E+05	1,0E-04	1,8E-10
TGC44	9,5E+05	9,7E-05	1,0E-10
5C5B10	9,8E+04	3,4E-04	3,4E-09
1F10A6	3,8E+05	1,1E-03	2,9E-09
TGC43	8,4E+05	1,1E-03	1,3E-09

Ejemplo 6: Utilización de las dosificaciones ELISA prototipos para distinguir cáncer y ausencia de cáncer en cohortes de pacientes

Con el fin de analizar la capacidad de la anexina A3 para distinguir los pacientes que tienen cáncer de próstata de los que no lo tienen, se han utilizado las dosificaciones ELISA descritas en el ejemplo 1 para determinar la cantidad de anexina A3 presente en las orinas post-tacto rectal de estos pacientes.

Los pacientes incluidos en el grupo "cáncer" tienen todos un cáncer de próstata comprobado, cuyo diagnóstico se ha confirmado por análisis histológico sobre biopsia. Para los pacientes incluidos en el grupo "sin cáncer" o control, el cáncer de próstata se ha excluido por biopsia también; se trata en la gran mayoría de pacientes que tienen una hiperplasia benigna de la próstata. La recogida y el tratamiento de las muestras de orina post-tacto rectal se han realizado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Se han analizado dos cohortes de pacientes: la cohorte nº 1 comprende 127 pacientes, 72 en el grupo "cáncer" y 55 en el grupo "sin cáncer". La cohorte nº 2 comprende 94 pacientes, 43 en el grupo "cáncer" y 42 en el grupo "sin cáncer": para las dos cohortes, se trata de pacientes que tienen un porcentaje de PSA sérico comprendido entre 2,5 y 10 ng/ml. Es la zona gris del PSA, en la que los rendimientos clínicos del marcador son los peores.

Las primeras dosificaciones ELISA realizadas en las orinas expresadas después del tacto rectal, descritas en el ejemplo 1, han permitido demostrar una complejidad biológica insospechada hasta ahora. Se ha conseguido definir dos grupos de ensayos ELISA que miden una información biológica diferente (parcialmente redundante o no). Por lo tanto, es esencial determinar qué grupo de dosificación ELISA permite acceder a la información biológica más pertinente, es decir que permite discriminar mejor entre los "cáncer" y los "sin cáncer" en un muestreo dado. La dosis TGC44/13A12G4H2 (denominado únicamente 13A12G4H2 a continuación) se ha seleccionado como dosificación prototipo del grupo 1 definido en el ejemplo 1. De la misma manera, la dosificación TGC44/5C5B10 (denominada

únicamente 5C5B10 a continuación) se ha seleccionado como dosificación prototipo que representa el grupo 2. La figura 10 representa los valores obtenidos para cada una de las cohortes nº 1 y nº 2 con los dos formatos de dosificación ELISA anexina A3 utilizados. La dosificación de Anexina A3 se ha normalizado con respecto al valor de la densidad urinaria medida por la tira Combur 10 (Roche Cat. Nº 04510062171), según la fórmula de dosis normalizada=dosis VIDAS/(densidad urinaria-1) (21).

En la primera cohorte de pacientes (cohorte nº 1) los dos formatos de dosificación permiten discriminar los pacientes que tienen cáncer de los controles. En efecto, las dosis de anexina A3 normalizadas son significativamente más bajas en el grupo "cáncer" que en el grupo "sin cáncer", sea cual sea el formato de dosificación utilizado (el valor de p Mann-Whitney unilateral es de 0,003 para la dosis TGC44/5C5B10 y de 0,02 para la dosis de TGC44/13A12G4H2). Por el contrario, en la segunda cohorte (cohorte nº 2), es únicamente el formato de dosificación de TGC44/13A12G4H2 el que permite discriminar los pacientes que tienen cáncer de los controles. Como para la cohorte nº 1 y de acuerdo con el estudio realizado por la técnica de transferencia western por Schostack *et al.* (21), las dosis de anexina A3 normalizadas son significativamente más bajas en el grupo "cáncer" que en el grupo "sin cáncer" utilizando ELISA prototipo TGC44/13A12G4H2 (el valor de p Mann-Whitney unilateral es de 0,01). Por el contrario, el prototipo TGC44/5C5B10 se encuentra desprovisto de esta segunda cohorte y no permite discriminar los pacientes que tienen cáncer. El prototipo TGC44/13A12G4H2 y de manera más general los formatos ELISA del grupo 1 parecen por lo tanto ser superiores para discriminar los cánceres de próstata. Esta conclusión es concordante con el análisis ELISPOT descrito en el ejemplo 1 que sugiere que los ELISA del grupo 1 son más adecuados para detectar ANXA3 de origen prostático.

Ejemplo 7: Efecto del ión calcio y de EDTA sobre las dosificaciones 5C5B10 y 13A12G4H2

Se detectaron directamente once orinas recogidas después del tacto rectal (sin tratamiento) o después de la adición de 5 o 25 mM de CaCl₂ o después de la adición de 5 o 25 mM de EDTA. Los resultados se presentan en la figura 11. El eje de las ordenadas representa la relación de las dosificaciones con tratamiento (Ca₂₊ o EDTA)/dosis sin tratamiento, y esto para la dosificación 5C5B10 y la dosificación 13A12G4H2. La adición del ión calcio en las orinas hace disminuir las dosis medidas por la dosificación 13A12G4H2, y esto de manera progresiva, cuanto más alta sea la concentración de calcio añadida, más baja será la dosis medida. La dosificación 5C5B10 se ve bastante menos afectada por la presencia de calcio en las orinas, incluso si a alta concentración de calcio se observa un ligero efecto. En cuanto al tratamiento EDTA de las orinas, no tiene efecto sobre la dosificación 13A12G4H2, pero para la dosificación 5C5B10 provoca un aumento muy ligero de las dosis medidas. La introducción de EDTA o de un agente quelante similar en las orinas antes de la dosificación, a través de tampones o en forma sólida, formulada o no, permite por lo tanto mejorar las dosificaciones, en particular la dosificación 13A12G4H2 permitiendo reducir el efecto del ión calcio sobre las dosis de ANXA3.

Referencias bibliográficas

1. Ferlay, J., Parkin, D. M., y Steliarova-Foucher, E., Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008, *Eur J Cancer*, 46, 765.
2. Barton, G. J., Newman, R. H., Freemont, P. S., y Crumpton, M. J., Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins, *Eur J Biochem*, 198, 749 (1991).
3. Le Cabec, V., Russo-Marie, F., y Maridonneau-Parini, I., Differential expression of two forms of annexin 3 in human neutrophils and monocytes and along their differentiation, *Biochem Biophys Res Commun*, 189, 1471 (1992).
4. Le Cabec, V., y Maridonneau-Parini, I., Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells, *Biochem J*, 303 (Pt 2), 481 (1994).
5. Bianchi, C., Bombelli, S., Raimondo, F., Torsello, B., Angeloni, V., Ferrero, S., Di Stefano, V., Chinello, C., Cifola, I., Invernizzi, L., Brambilla, P., Magni, F., Pitto, M., Zanetti, G., Mocarrelli, P., y Perego, R. A., Primary cell cultures from human renal cortex and renal-cell carcinoma evidence a differential expression of two spliced isoforms of Annexin A3, *Am J Pathol*, 176, 1660.
6. Kollermann, J., Schlomm, T., Bang, H., Schwall, G. P., von Eichel-Streiber, C., Simon, R., Schostak, M., Huland, H., Berg, W., Sauter, G., Klocker, H., y Schrattenholz, A., Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate cancer, *Eur Urol*, 54, 1314 (2008).
7. Wozny, W., Schroer, K., Schwall, G. P., Poznanovic, S., Stegmann, W., Dietz, K., Rogatsch, H., Schaefer, G., Huebl, H., Klocker, H., Schrattenholz, A., y Cahill, M. A., Differential radioactive quantification of protein abundance ratios between benign and malignant prostate tissues: cancer association of annexin A3, *Proteomics*, 7, 313 (2007).
8. Kohler, G., y Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256, 495 (1975).

9. Kohler, G., Howe, S. C., y Milstein, C., Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines, *Eur J Immunol*, 6, 292 (1976).
- 5 10. Webber, M. M., Quader, S. T., Kleinman, H. K., Bello-DeOcampo, D., Storto, P. D., Bice, G., DeMendonca-Calaca, W., y Williams, D. E., Human cell lines as an *in vitro/in vivo* model for prostate carcinogenesis and progression, *Prostate*, 47, 1 (2001).
- 10 11. Rehman, I., Azzouzi, A. R., Catto, J. W., Allen, S., Cross, S. S., Feeley, K., Meuth, M., y Hamdy, F. C., Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study, *Urology*, 64, 1238 (2004).
12. Clark, H. F., Geldreich, E. E., Jeter, H. L., y Kabler, P. W., The membrane filter in sanitary bacteriology, *Public Health Rep*, 66, 951 (1951).
- 15 13. Kabler, P. W., y Clark, H. F., The use of differential media with the membrane filter, *Am J Public Health Nations Health*, 42, 390 (1952).
- 20 14. Cheruvanky, A., Zhou, H., Pisitkun, T., Kopp, J. B., Knepper, M. A., Yuen, P. S., y Star, R. A., Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator, *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F1657 (2007).
15. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., y Johnstone, R. M., Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes, *J Cell Biol*, 101, 942 (1985).
- 25 16. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., y Zitvogel, L., Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming, *Nat Med*, 7, 297 (2001).
- 30 17. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., y Geuze, H. J., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J Exp Med*, 183, 1161 (1996).
18. Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., y Clayton, A., Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3 22 (2006).
- 35 19. Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M., y Sitia, R., A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence, *EMBO J*, 9, 1503 (1990).
20. Frank, R., y Döring, R., Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose papers discs as segmental solid synthesis, *Tetrahedron*, 44, 6031 (1988).
- 40 21. Schostak, M., Schwall, G. P., Poznanovic, S., Groebe, K., Muller, M., Messinger, D., Miller, K., Krause, H., Pelzer, A., Horninger, W., Klocker, H., Hennenlotter, J., Feyerabend, S., Stenzl, A., y Schrattenholz, A., Annexin A3 in urine: a highly specific noninvasive marker for prostate cancer early detection, *J Urol*, 181, 343 (2009).
- 45 Listado de secuencias
- <110> bioMérieux
<120> Procedimiento y kit para el diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata
<130> ANXA3
50 <150> FR1060221
<151> 2010-12-8
<160> 22
<170> PatentIn versión 3.3
- 55 <210> 1
<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

ES 2 638 602 T3

Ile Gln Lys Ala Ile Arg Gly Ile Gly Thr Asp Glu Lys Met Leu Ile
 1 5 10 15

Ser Ile Leu Thr Glu Arg Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile Val Lys
 20 25 30

Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys Gly
 35 40 45

Asp Leu Ser Gly His Phe Glu His Leu Met Val Ala Leu
 50 55 60

5 <210> 2
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Leu His Arg Ala Leu Lys Gly Ile Gly Thr Asp Glu Phe Thr Leu Asn
 1 5 10 15

Arg Ile Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Leu Asp Ile Arg Thr
 20 25 30

Glu Phe Lys Lys His Tyr Gly Tyr Ser Leu Tyr Ser Ala Ile Lys Ser
 35 40 45

Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Glu Ile Thr Leu Leu Lys Ile
 50 55 60

10 <210> 2
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Leu Lys Lys Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Asp Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Glu Ile Leu Thr Thr Arg Thr Ser Arg Gln Met Lys Asp Ile Ser Gln
 20 25 30

Ala Tyr Tyr Thr Val Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asp Asp Ile Ser Ser
 35 40 45

15 Glu Thr Ser Gly Asp Phe Arg Lys Ala Leu Leu Thr Leu
 50 55 60

<210> 4
 <211> 61
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 4

ES 2 638 602 T3

Tyr Lys Ala Gly Glu Asn Arg Trp Gly Thr Asp Glu Asp Lys Phe Thr
1 5 10 15

Glu Ile Leu Cys Leu Arg Ser Phe Pro Gln Leu Lys Leu Thr Phe Asp
20 25 30

Glu Tyr Arg Asn Ile Ser Gln Lys Asp Ile Val Asp Ser Ile Lys Gly
35 40 45

Glu Leu Ser Gly His Phe Glu Asp Leu Leu Leu Ala Ile
50 55 60

<210> 5

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Ser Ile Trp Val Gly His Arg Gly Thr Val Arg Asp Tyr Pro
1 5 10 15

Asp Phe Ser Pro Ser Val Asp Ala Glu Ala Ile Gln Lys Ala Ile Arg
20 25 30

Gly Ile Gly Thr Asp Glu Lys Met Leu Ile Ser Ile Leu Thr Glu Arg
35 40 45

5

ES 2 638 602 T3

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr
50 55 60

Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys Gly Asp Leu Ser Gly His Phe
65 70 75 80

Glu His Leu Met Val Ala Leu Val Thr Pro Pro Ala Val Phe Asp Ala
85 90 95

Lys Gln Leu Lys Lys Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Asp Ala
100 105 110

Leu Ile Glu Ile Leu Thr Thr Arg Thr Ser Arg Gln Met Lys Asp Ile
115 120 125

Ser Gln Ala Tyr Tyr Thr Val Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asp Asp Ile
130 135 140

Ser Ser Glu Thr Ser Gly Asp Phe Arg Lys Ala Leu Leu Thr Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Arg Arg Asp Glu Ser Leu Lys Val Asp Glu His Leu Ala Lys
165 170 175

Gln Asp Ala Gln Ile Leu Tyr Lys Ala Gly Glu Asn Arg Trp Gly Thr
180 185 190

Asp Glu Asp Lys Phe Thr Glu Ile Leu Cys Leu Arg Ser Phe Pro Gln
195 200 205

Leu Lys Leu Thr Phe Asp Glu Tyr Arg Asn Ile Ser Gln Lys Asp Ile
210 215 220

Val Asp Ser Ile Lys Gly Glu Leu Ser Gly His Phe Glu Asp Leu Leu
225 230 235 240

Leu Ala Ile Val Asn Cys Val Arg Asn Thr Pro Ala Phe Leu Ala Glu
245 250 255

Arg Leu His Arg Ala Leu Lys Gly Ile Gly Thr Asp Glu Phe Thr Leu
260 265 270

Asn Arg Ile Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Leu Asp Ile Arg
275 280 285

Thr Glu Phe Lys Lys His Tyr Gly Tyr Ser Leu Tyr Ser Ala Ile Lys
290 295 300

Ser Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Glu Ile Thr Leu Leu Lys Ile Cys Gly
305 310 315 320

Gly Asp Asp

- 5 <210> 6
- <211> 81
- <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 638 602 T3

<220>

<223> Recombinante D1

<400> 6

Met Gly His His His His His His His His Ser Pro Ser Val Asp Ala
1 5 10 15

Glu Ala Ile Gln Lys Ala Ile Arg Gly Ile Gly Thr Asp Glu Lys Met
20 25 30

Leu Ile Ser Ile Leu Thr Glu Arg Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile
35 40 45

Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu
50 55 60

Lys Gly Asp Leu Ser Gly His Phe Glu His Leu Met Val Ala Leu Val
65 70 75 80

Thr

5

<210> 7

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Recombinante D2

<400> 7

Met Gly His His His His His His His His Ala Val Phe Asp Ala Lys
1 5 10 15

Gln Leu Lys Lys Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Asp Ala Leu
20 25 30

Ile Glu Ile Leu Thr Thr Arg Thr Ser Arg Gln Met Lys Asp Ile Ser
35 40 45

Gln Ala Tyr Tyr Thr Val Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asp Asp Ile Ser
50 55 60

15

Ser Glu Thr Ser Gly Asp Phe Arg Lys Ala Leu Leu Thr Leu Ala
65 70 75

<210> 8

<211> 85

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

<223> Recombinante D3

<400> 8

ES 2 638 602 T3

Met Gly His His His His His His His His Asp Glu His Leu Ala Lys
1 5 10 15

Gln Asp Ala Gln Ile Leu Tyr Lys Ala Gly Glu Asn Arg Trp Gly Thr
20 25 30

Asp Glu Asp Lys Phe Thr Glu Ile Leu Cys Leu Arg Ser Phe Pro Gln
35 40 45

Leu Lys Leu Thr Phe Asp Glu Tyr Arg Asn Ile Ser Gln Lys Asp Ile
50 55 60

Val Asp Ser Ile Lys Gly Glu Leu Ser Gly His Phe Glu Asp Leu Leu
65 70 75 80

Leu Ala Ile Val Asn
85

<210> 9
<211> 82
5 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Recombinante D4
<400> 9

Met Gly His His His His His His His His Ala Phe Leu Ala Glu Arg
1 5 10 15

10 Leu His Arg Ala Leu Lys Gly Ile Gly Thr Asp Glu Phe Thr Leu Asn
20 25 30

Arg Ile Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Leu Asp Ile Arg Thr
35 40 45

Glu Phe Lys Lys His Tyr Gly Tyr Ser Leu Tyr Ser Ala Ile Lys Ser
50 55 60

Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Glu Ile Thr Leu Leu Lys Ile Cys Gly Gly
65 70 75 80

Asp Asp

15 <210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr
1 5 10 15

Gly

20 <210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <400> 11

Leu Ile Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly
1 5 10

ES 2 638 602 T3

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 12
 Ile Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu
 1 5 10

<210> 13
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly
 1 5

15 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Asp Leu Ser Gly His Phe Glu His Leu
 20 1 5

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Leu Ser Gly His Phe Glu His
 1 5

30 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Ala Ser Ile Trp Val Gly His Arg Gly Thr Val Arg Asp Tyr Pro Asp
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ser
 20

35 <210> 17
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 17
 Ser Ile Trp Val Gly His Arg Gly Thr Val Arg Asp Tyr Pro Asp Phe
 1 5 10 15

Ser Pro

45 <210> 18
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Tyr Pro Asp Phe
 1

50 <210> 19
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 638 602 T3

<400> 19

Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys
1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Gly His Phe Glu His Leu Met Val Ala Leu Val Thr
20 25 30

Pro Pro Ala Val Phe Asp
35

<210> 20

5 <211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Lys Ala Ile Arg Gly Ile Gly Thr Asp Glu Lys Met Leu Ile Ser
1 5 10 15

Ile Leu Thr Glu Arg Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile Val Lys Glu
20 25 30

Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys Gly Asp
35 40 45

Leu Ser Gly His Phe Glu His Leu
50 55

10

<210> 21

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 21

Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys
1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Gly His Phe Glu His Leu
20 25

<210> 22

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys
1 5 10 15

Gly

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata según el cual se pone en contacto una muestra de orina a analizar con dos anticuerpos, un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, uno de los dos anticuerpos se dirige contra el primer dominio repetido de anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 1, y el otro de los dos anticuerpos se dirige contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 2.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 17 aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 1.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un polipéptido incluido en la SEC ID nº 1 cuya secuencia de aminoácidos se selecciona entre las secuencias siguientes:
- SNAQRQLIVKEYQAAYG (SEC ID nº 10),
- 20 LIVKEYQAAYG (SEC ID nº 11)
- IVKEYQAAYGKE (SEC ID nº 12),
- KEYQAAYG (SEC ID nº 13),
- 25 DLSGHFEHL (SEC ID nº 14),
- LSGHFEH (SEC ID nº 15),
- 30 y
- KEYQAAYGKELKDDLKG (SEC ID nº 22), con la condición de que la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22 se fusione en el lado N-terminal a una secuencia de al menos 30 aminoácidos.
- 35 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 50 aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 2.
- 40 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 45 aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 2.
- 45 6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo que se incluye en una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos que empieza en el resto 3 y que termina en el resto 49 de SEC ID nº 2.
- 50 7. Procedimiento según la reivindicación 4, 5 o 6, en el que dicho epítipo comprende en la posición 6 de la SEC ID nº 2 un resto Lys.
8. Procedimiento según la reivindicación 4, 5 o 6, en el que el epítipo comprende en la posición 6 de la SEC ID nº 2 un resto Lys y en la posición 49 de la SEC ID nº 2 un resto Asp.
- 55 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el epítipo comprende, en la posición 7 de la SEC ID nº 2 un resto Gly, en la posición 8 de la SEC ID nº 2 un resto Ile y en la posición 9 de la SEC ID nº 2 un resto Gly.
- 60 10. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el epítipo comprende, en la posición 3 de la SEC ID nº 2 un resto Arg, en la posición 6 de la SEQ ID NO: 2 un resto Lys, en la posición 7 de la SEQ ID NO: 2 un resto Gly, en la posición 8 de la SEC ID NO: 2 un resto Ile, en la posición 9 de la SEC ID NO: 2 un resto Gly y en la posición 49 de la SEC ID NO: 2 un resto Asp.
- 65 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de anexina A3 humana nativa, cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 1, es el anticuerpo de captura y el anticuerpo dirigido contra al cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa, cuya

secuencia se identifica como SEC ID nº 2, es el anticuerpo de detección.

12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección son unos anticuerpos que presentan una afinidad elevada con una constante de afinidad de al menos 10^9 .

13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección son anticuerpos que presentan una constante de disociación baja inferior a $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

14. Kit de inmunodosificación para el diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata en una muestra de orina a analizar que comprende dos anticuerpos, un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, estando uno de los dos anticuerpos dirigido contra el primer dominio repetido de anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 1 y estando el otro de los dos anticuerpos dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 2.

15. Kit según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 17 aminoácidos consecutivos de la SEC ID nº 1.

16. Kit según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un polipéptido incluido en la SEC ID nº 1 cuya secuencia de aminoácidos se selecciona entre las secuencias siguientes:

SNAQRQLIVKEYQAAYG (SEC ID nº 10),

LIVKEYQAAYG (SEC ID nº 11)

IVKEYQAAYGKE (SEC ID nº 12),

KEYQAAYG (SEC ID nº 13),

DLSGFHEHL (SEC ID nº 14),

LSGFHEH (SEC ID nº 15),

y

KEYQAAYGKELKDDLKG (SEC ID nº 22), con la condición de que la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22 se fusione en el lado N-terminal a una secuencia de al menos 30 aminoácidos.

17. Kit según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 50 aminoácidos consecutivos de la SEC ID nº 2.

18. Kit según la reivindicación 17, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 45 aminoácidos consecutivos de la SEC ID nº 2.

19. Kit según la reivindicación 17, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona de entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo que se incluye en una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos que empieza en el resto 3 y que se termina en el resto 49 de la SEC ID nº 2.

20. Kit según las reivindicaciones 17, 18 o 19, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo, comprendiendo dicho epítipo, en la posición 6 de la SEC ID nº 2, un resto Lys.

21. Kit según la reivindicación 17, 18 o 19, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo, comprendiendo dicho epítipo, en la posición 6 de la SEC ID nº 2, un resto Lys y en la posición 49 de la SEC ID nº 2 un resto Asp.

22. Kit según la reivindicación 21, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo, comprendiendo dicho epítipo, en la posición 7 de la SEC ID nº 2, un resto Gly, en la posición 8 de la SEC ID nº 2, un resto Ile y en la posición 9 de la SEC ID nº 2 un resto Gly.

23. Kit según la reivindicación 17, en el que el anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de anexina A3

humana nativa se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítopo, comprendiendo dicho epítopo, en la posición 3 de la SEC ID nº 2 un resto Arg, en la posición 6 de la SEC ID nº 2 un resto Lys, en la posición 7 de la SEC ID nº 2 un resto Gly, en la posición 8 de la SEC ID nº 2 un resto Ile, en la posición 9 de la SEC ID nº 2 un resto Gly, y en la posición 49 de la SEC ID nº 2 un resto Asp.

5
24. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, que comprende el anticuerpo de captura que se dirige contra el primer dominio repetido de anexina A3 humana nativa, cuya secuencia se identifica como la SEC ID nº 1, y el anticuerpo de detección que se dirige contra el cuarto dominio repetido de anexina A3 humana nativa, cuya secuencia se identifica como SEC ID nº 2.

10
25. Kit según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección son anticuerpos que presentan una afinidad elevada con una constante de afinidad de al menos 10^9 .

15
26. Kit según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección son unos anticuerpos que presentan una constante de disociación baja inferior a $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

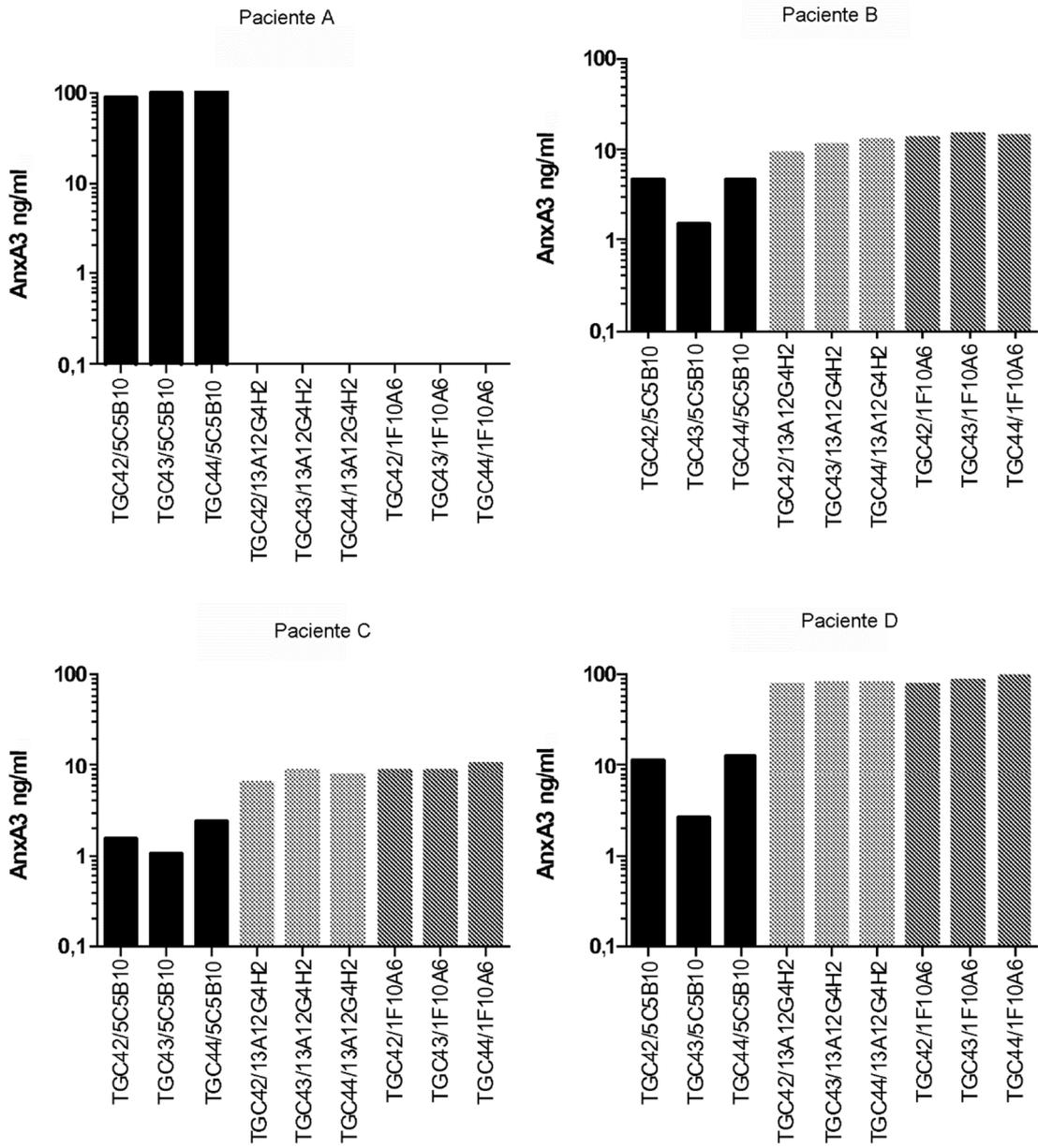


Figura 1A

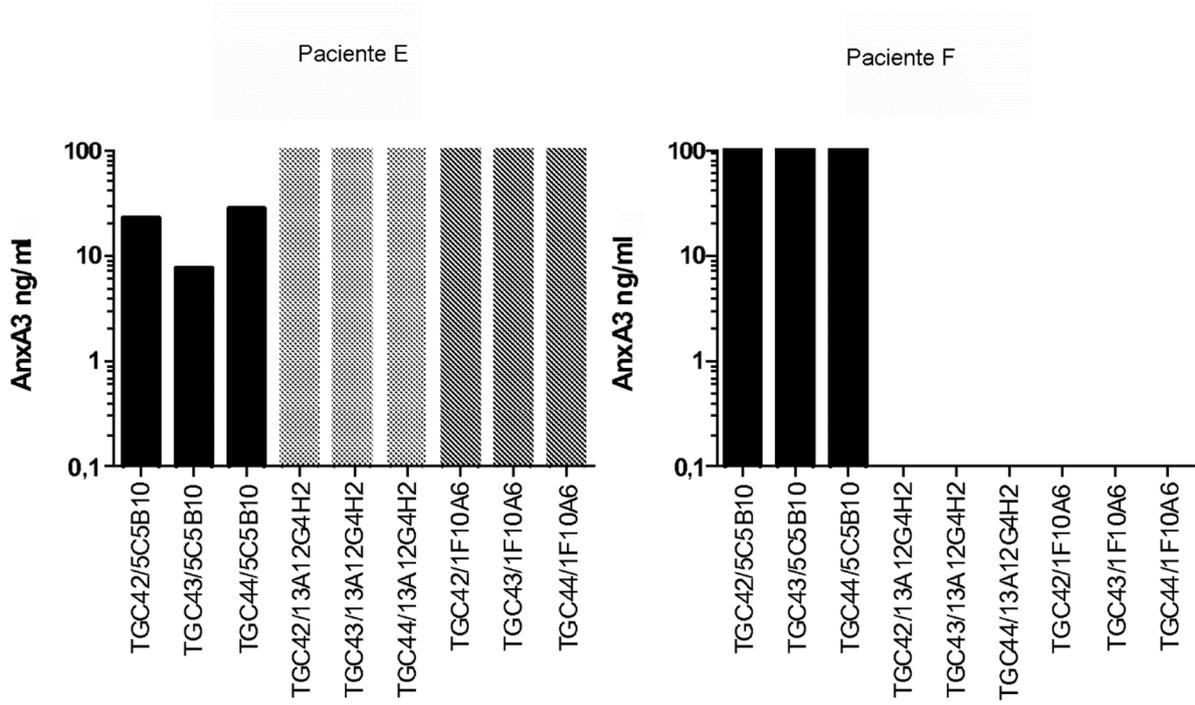


Figura 1B

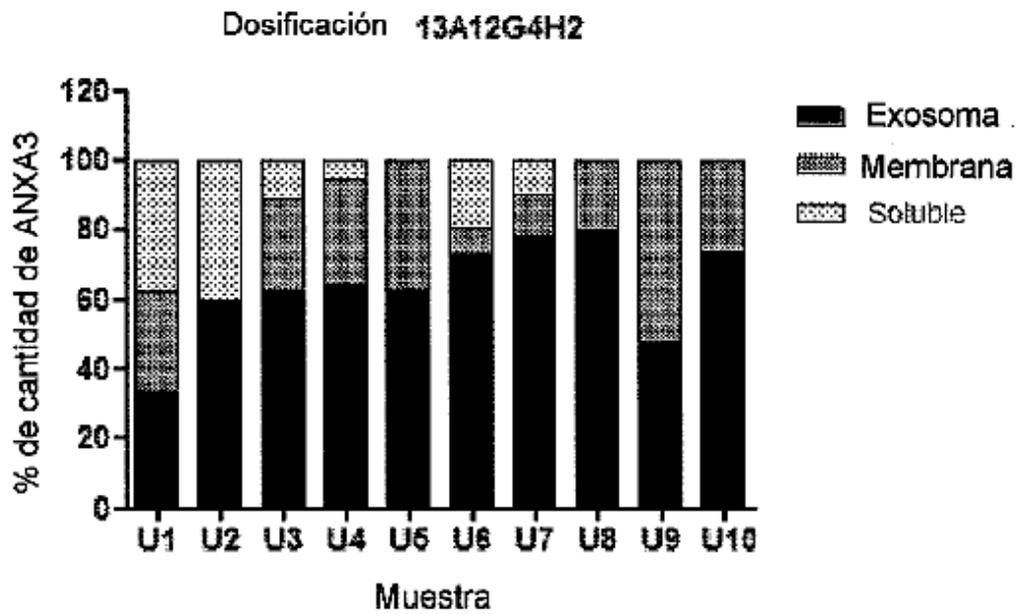
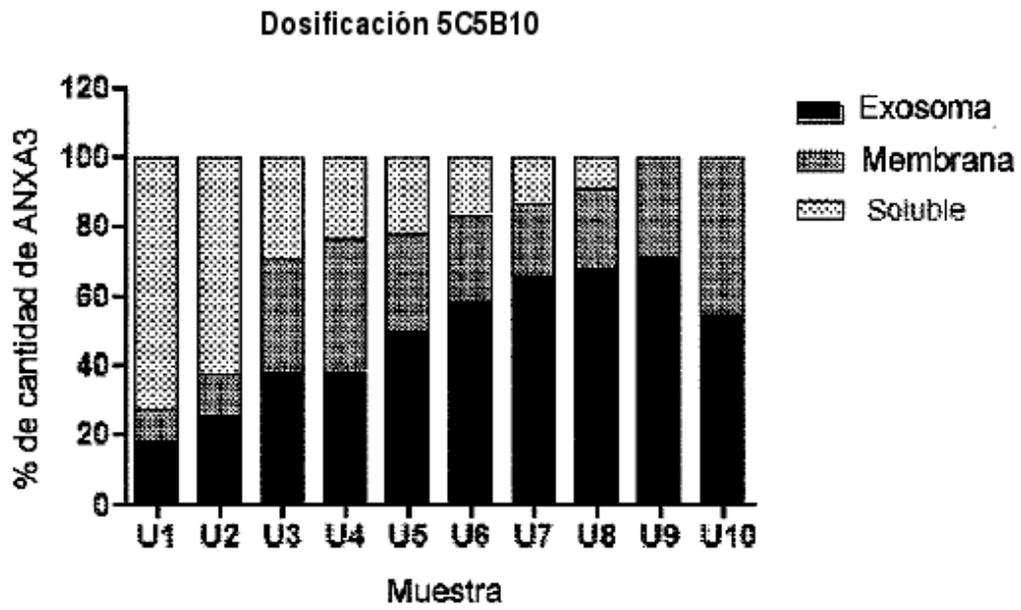


Figura 4

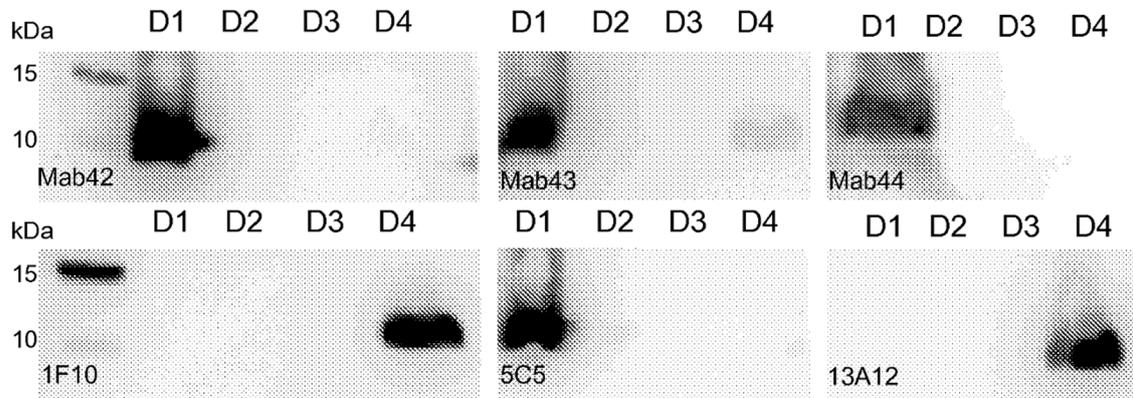


Figura 5

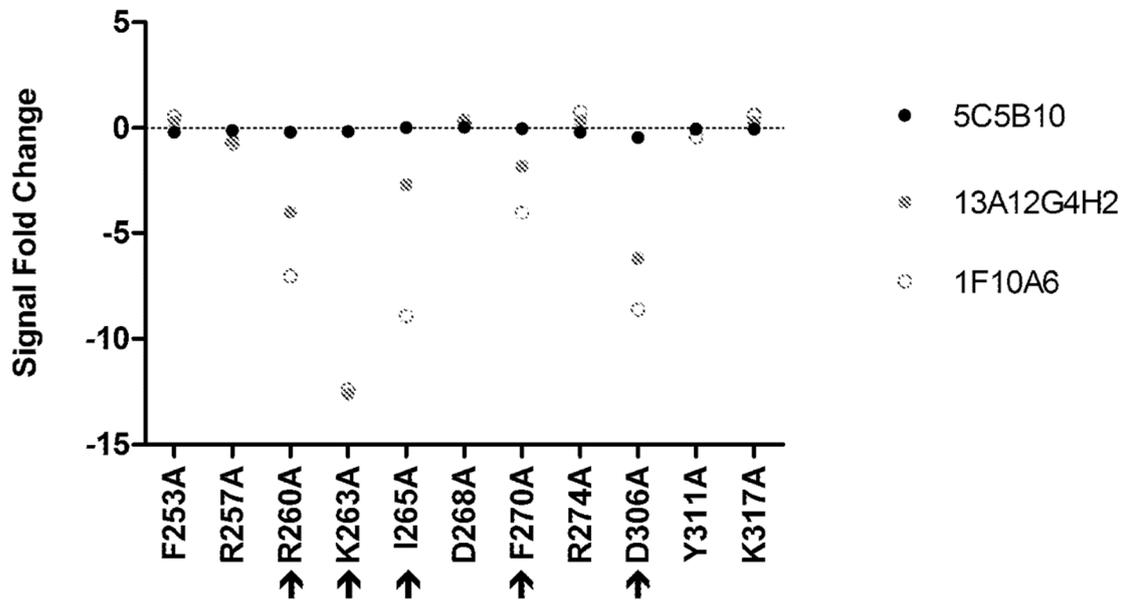


Figura 7

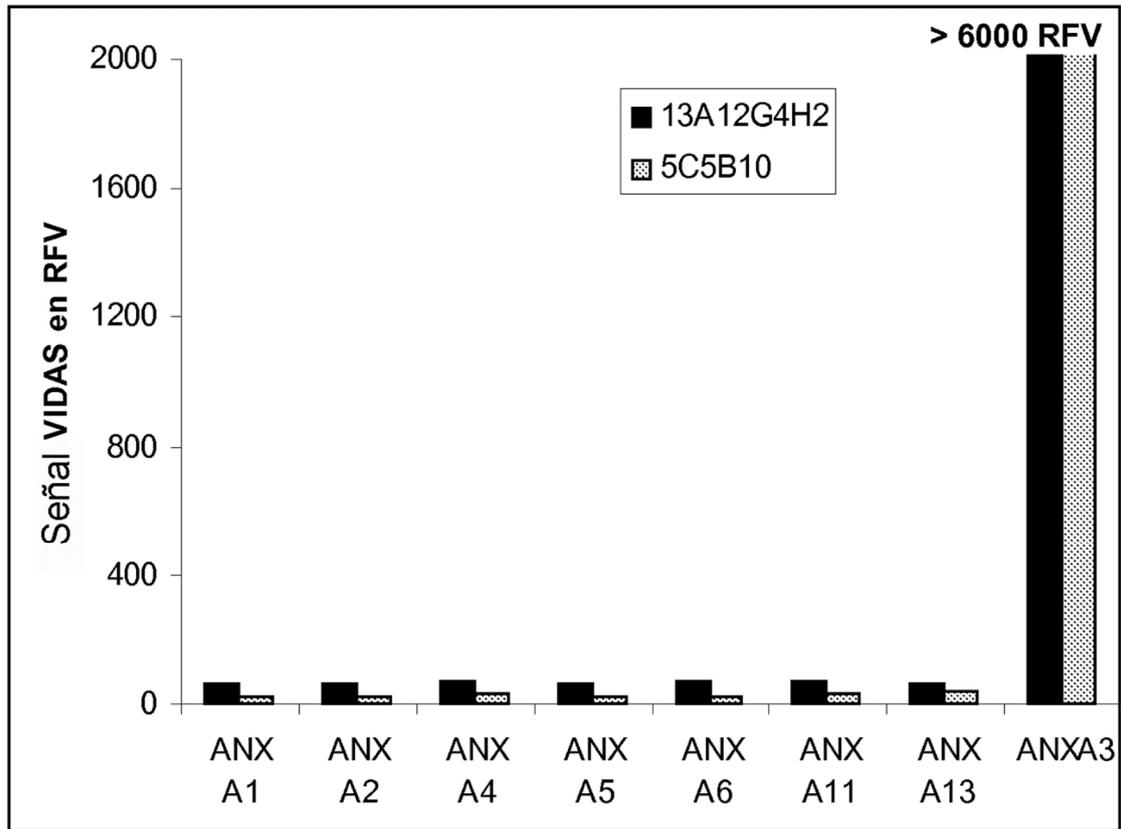


Figura 8

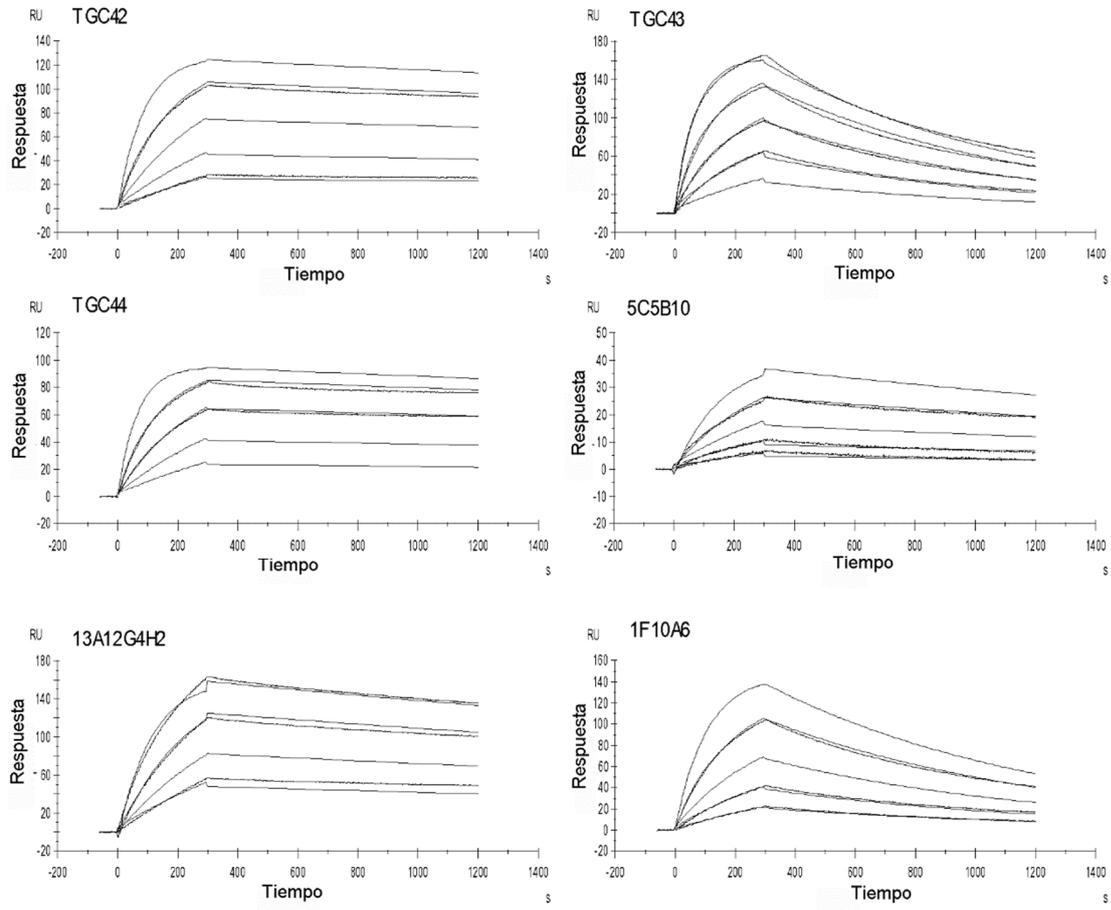


Figura 9

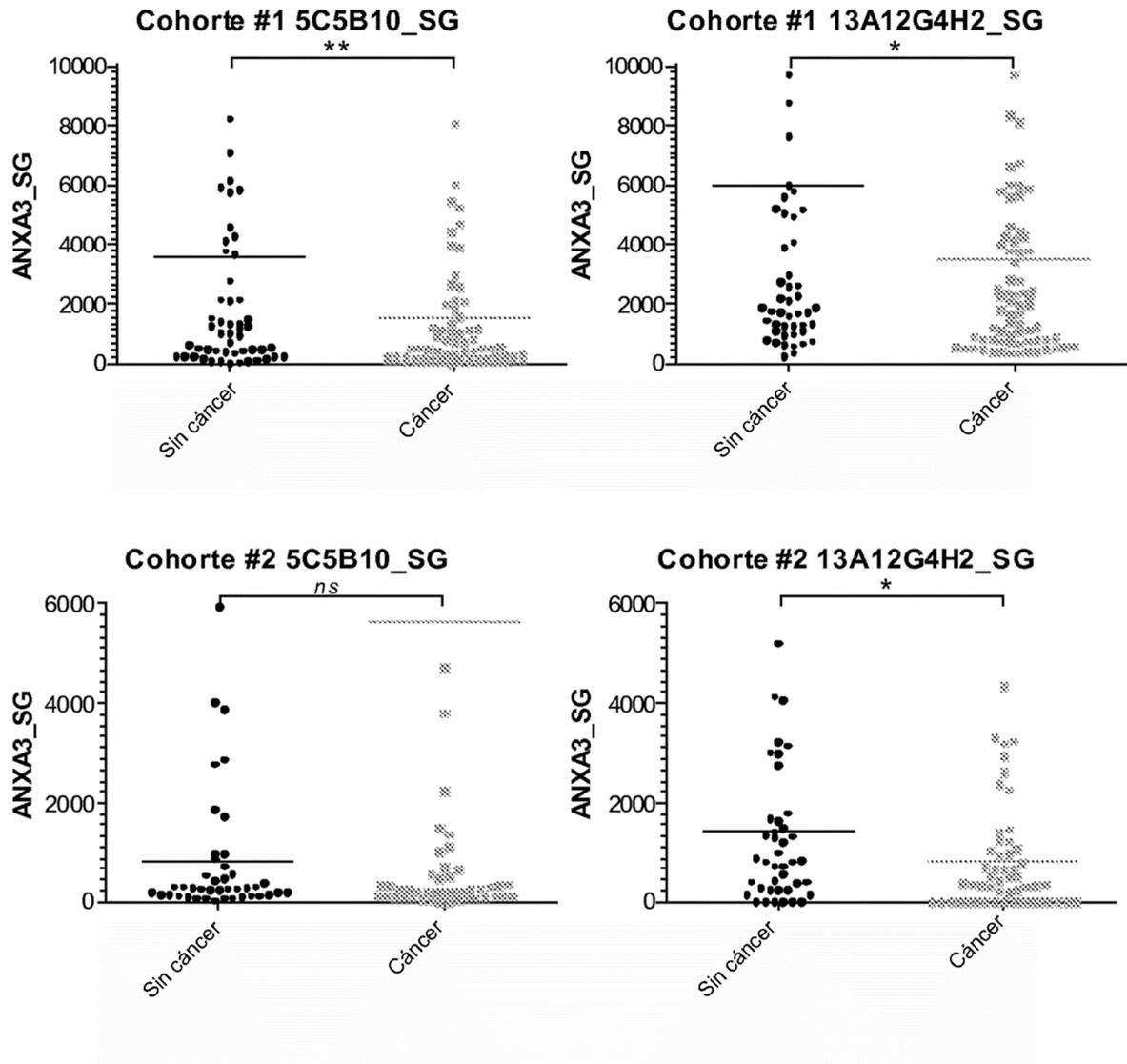


Figura 10

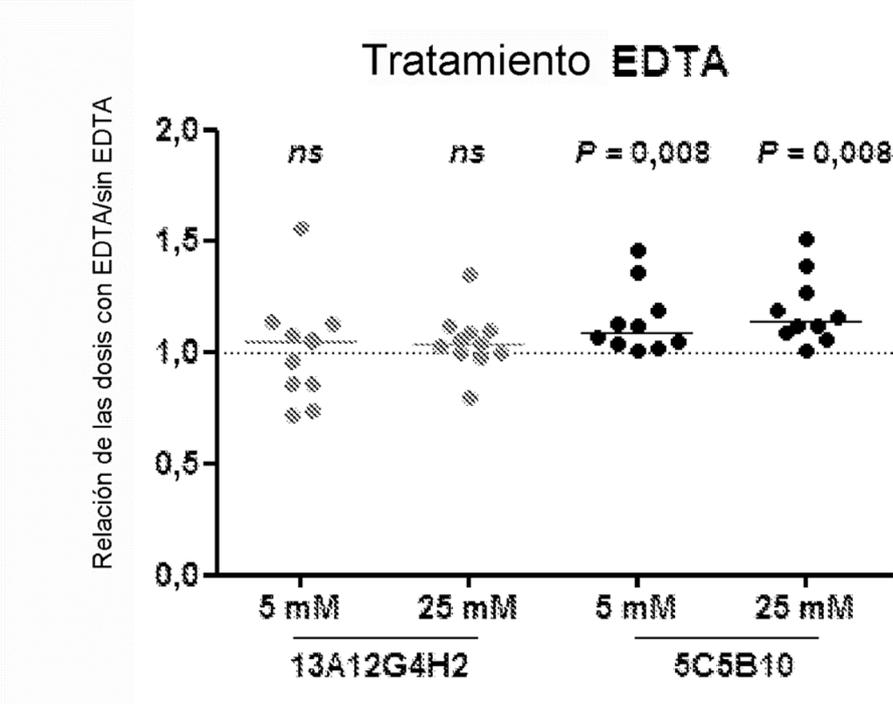
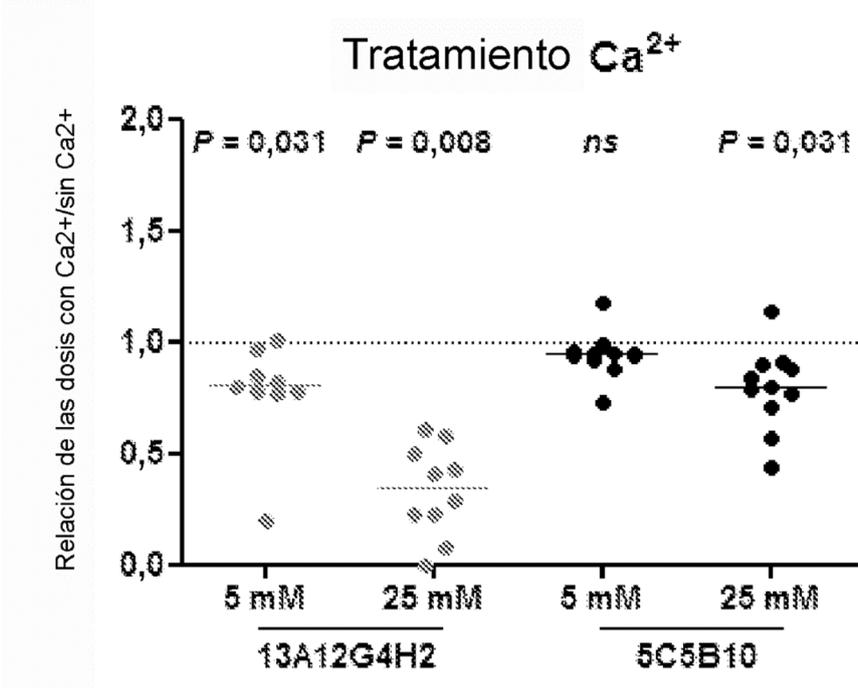


Figura 11