

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 379**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2013 PCT/EP2013/061593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2013 E 13737806 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2859349**

54 Título: **Procedimiento de detección y/o de valoración de la anexina A3 de un mamífero en la sangre o en al menos uno de sus derivados**

30 Prioridad:

07.06.2012 FR 1255340

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

03.06.2020

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy l'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**ATAMAN-ÖNAL, YASEMIN;
CHOQUET-KASTYLEVSKY, GENEVIÈVE;
HAIDOUS, HADER;
MICHEL-BUSSERET, SANDRINE y
OTT, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 764 379 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 de detección y/o de valoración de la anexina A3 de un mamífero en la sangre o en al menos uno de sus derivados

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento y un kit para la detección y/o la valoración de la anexina A3 de un mamífero (por ejemplo, el hombre) en la sangre o en fluidos biológicos derivados de ella, como el suero o el plasma. Una detección y/o una valoración de esta naturaleza son completamente deseables, principalmente con el fin de diagnosticar, pronosticar o determinar la susceptibilidad a patologías agudas o crónicas.

10 La anexina A3 (ANXA3) pertenece a la familia de las anexinas. Las proteínas de esta familia tienen la característica común de poder fijarse a las membranas fosfolípicas en presencia de calcio. Estas proteínas se expresan de manera relativamente ubicua en diferentes tejidos y tipos de células, en animales y plantas. Existen 12 anexinas que han sido identificadas en vertebrados, formando la familia de las anexinas A [1].

15 La propiedad que caracteriza a las anexinas, a saber, la capacidad de unirse a los fosfolípidos de las membranas de manera dependiente del calcio resulta de las características estructurales compartidas por todos los miembros de esta familia de proteínas. Por tanto, cada anexina contiene en su secuencia proteica dominios repetidos denominados «*annexin repeat*» que están en un 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 de endonexina, está plegado en 5 hélices alfa y contiene un resto característico de tipo 2 (GxGT- [38 residuos]-D/E) que permite fijar los iones Ca^{2+} . Las anexinas del reino animal poseen dominios N-terminales variables, que llevan con frecuencia las especificidades funcionales adicionales 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 de aminoácidos no excede del 45 al 55%. Los 4 dominios repetidos forman una estructura que se asemeja a un disco, con una superficie un poco convexa sobre la que se sitúan los sitios de fijación del Ca^{2+} y una superficie cóncava donde se encuentran próximos los extremos N y C-terminales de la proteína [3].

25 Por tanto, debido a sus propiedades estructurales, las anexinas pueden formar redes sobre la superficie de la membrana y organizar microdominios de membranas y focos de reclutamiento para las proteínas interactivas. En términos más generales, están implicadas en la unión membrana plasmática-citoesqueleto, la regulación del flujo del ión calcio a través de las membranas y el tráfico exo- y endo-citótico [4-6]. Por tanto, las anexinas desempeñan un papel importante en la diferenciación celular, la migración celular y la inmunomodulación. La mayor parte de las anexinas son igualmente inhibitoras de la fosfolipasa A2 y poseen propiedades anticoagulantes. Además, cada miembro de la familia puede estar implicado individualmente en otros procesos fisiológicos o patológicos.

30 La anexina A3 se expresa en diferentes tejidos, tales como el pulmón, el bazo, la placenta, la próstata y el riñón [7]. Se considera una anexina rara, en comparación con otros miembros de la familia que tienen una expresión más ubicua y/o niveles de expresión más elevados. La anexina A3 es muy abundante en los neutrófilos humanos, donde representa aproximadamente el 1% de las proteínas citosólicas [8, 9]. Inicialmente, han sido descritas dos isoformas de la anexina A3, una de 33 kDa de masa molecular aparente, mayoritariamente presente en los neutrófilos, y la otra de 36 kDa de masa molecular aparente, que se encuentra en los monocitos. La diferencia de masa molecular entre las dos isoformas no es el resultado de una modificación postraduccional tal como la fosforilación o la glicosilación. En 2010, se demostró que un fenómeno de empalme alternativo podía ser un mecanismo que explicaba la presencia de estas dos isoformas. Por tanto, los autores identificaron dos variantes de ADN complementario de la anexina A3: 35 la primera con una longitud de 973 pares de bases (pb) codifica una proteína completa de 323 aminoácidos correspondiente a la isoforma de 36 kDa; la segunda, con una longitud de 885 pb, no contiene el exón III después de un empalme alternativo. Cuando este exón no está presente, se interrumpe el marco de lectura abierto y la traducción solo es posible a partir del codón ATG presente en el exón IV. En consecuencia, los primeros 39 aminoácidos de la proteína no se expresan, lo que da como resultado una proteína truncada en el extremo N-terminal de 284 aminoácidos, que corresponde a la isoforma de 33 kDa [10]. Además, el análisis por transferencia de Western después de una electroforesis bidimensional (2DE-WB) muestra que la isoforma de 36 kDa de la anexina A3 migra bajo la forma de 4 a 6 manchas, teniendo diferentes puntos isoelectrónicos. La isoforma de 36 kDa identificada por una transferencia de Western unidimensional corresponde de hecho a un grupo de isoformas heterogéneas [10].

45 En cuanto a su función, se demuestra que la anexina A3 es una lipocortina, es decir, un inhibidor de la fosfolipasa A2 [11]. Además, ejerce una actividad anticoagulante a nivel placentario [11] y provoca la agregación de vesículas de membranas, como por ejemplo los gránulos de neutrófilos [12]. *In vitro*, la presencia de la proteína anexina A3 es necesaria para el crecimiento de hepatocitos de rata [7].

De manera más general, la proteína anexina A3 está implicada directa o indirectamente en numerosas patologías.

55 En la técnica anterior, la anexina A3 se ha asociado frecuentemente a diferentes tipos de cánceres. Por ejemplo, la solicitud de patente EP-A-1724586 describe la determinación de la abundancia de anexina A3 intracelular y/o extracelular en una muestra de orina con el fin de diagnosticar un cáncer urogenital o del tracto digestivo. En particular, la anexina A3 está asociada significativamente a la progresión y a las diversas etapas de enfermedades

próstáticas y de cánceres de próstata. En el tejido prostático, así como en la orina, el nivel de expresión de la proteína anexina A3 disminuye en caso de cáncer de próstata [10, 14, 15].

En lo que se refiere al cáncer colorrectal, se sabe que la expresión del ARNm que codifica la anexina A3 y la expresión de la proteína anexina A3 están aumentadas en los tumores colorrectales con relación al tejido sano adyacente [16]. Además, la anexina A3 se utiliza en un método que permite determinar la probabilidad de un sujeto de tener cáncer colorrectal (WO 2009/125303). Para ello, se recoge sangre completa en tubos PAXgene Blood RNA (PreAnalytiX)TM que permite estabilizar los ARN intracelulares de las células presentes en la sangre periférica, se extrae el ARN y luego se mide el nivel de expresión del ARN que codifica la anexina A3 por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Sin embargo, este nivel de expresión del ARN que codifica la anexina A3 es el reflejo de la respuesta inmunitaria del hospedante a la patología. Por tanto, es un marcador indirecto, no específico de células cancerosas que necesitan la combinación con otros genes para mejorar la especificidad. Así es como se ha mostrado que la combinación con otros seis genes permite mejorar los comportamientos clínicos [17]. Además, esta tecnología de biología molecular es costosa.

En lo que se refiere al cáncer de pulmón, se sabe que la expresión de la proteína anexina A3 es significativamente elevada en los adenocarcinomas primarios que tienen metástasis locales en los ganglios linfáticos, en comparación con los tumores primarios que no tienen metástasis. Este resultado sugiere que la anexina A3 desempeña un papel importante en la progresión del cáncer de pulmón y que es un factor de pronóstico para esta patología [18].

La anexina A3 presenta igualmente un interés de diagnóstico en lo que se refiere al cáncer de páncreas [19].

Además, la disminución de la expresión de la anexina A3 está correlacionada con la progresión tumoral en el cáncer de tiroides papilar [20]; siendo igualmente esta proteína un biomarcador candidato en el marco de una predisposición al cáncer de mama (véase el documento US 2011/0251082).

Además, existen igualmente vínculos entre la expresión de la anexina A3 y el proceso inflamatorio. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una peroxidasa que permite convertir el ácido araquidónico en prostaglandina H2. Se trata de una enzima inducible que se expresa en el sitio de inflamación y que tiene una acción proinflamatoria. La inhibición de COX-2 por los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos permite disminuir la expresión de mediadores inflamatorios y tiene efectos analgésicos. La anexina A3 forma parte de los genes cuya expresión aumenta después de un tratamiento con rofecoxib (un inhibidor selectivo de COX-2) y que se asocian a la inhibición de la fosfolipasa A2, así como a la supresión de cascadas de citoquinas [21]. La anexina A3 está implicada en las vías de señalización que permiten controlar la inflamación y en consecuencia tiene utilidad como marcador o diana terapéutica en cualquier patología que implique una inflamación aguda o crónica.

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o SIRS (en inglés) designa un estado inflamatorio generalizado que puede ser inducido por una infección o una causa no infecciosa, como por ejemplo un traumatismo, una quemadura grave o incluso una pancreatitis. Más exactamente, un SIRS resultante de una infección documentada, es decir, confirmada en el laboratorio, se denomina septicemia. Los ensayos microbiológicos son determinantes: permiten identificar el agente infeccioso en el origen de la infección y, si es necesario, analizar su perfil de resistencia a los antibióticos. El hemocultivo es un examen clave que se debe realizar en condiciones óptimas con el fin de obtener todas las posibilidades de detectar lo más rápidamente posible el microorganismo responsable de la infección. Sin embargo, el agente infeccioso responsable (bacteria, virus, hongo o parásito) no se identifica estadísticamente más que en aproximadamente 2 de cada 3 casos. Por tanto, es necesario tener en consideración otros signos y síntomas, así como los resultados de los exámenes clínicos y biológicos, para poder hacer el diagnóstico, determinar el pronóstico y seguir la respuesta al tratamiento. Un biomarcador, la procalcitonina (PCT) permite mejorar los comportamientos clínicos para el diagnóstico precoz de la septicemia y la elección del tratamiento adecuado. La expresión de la PCT es muy específica del origen bacteriano del síndrome de inflamación sistémica y también es muy precoz: un aumento en el nivel sérico se puede medir de 3 a 6 horas después del inicio de la infección. Cuando el agente infeccioso es de naturaleza no bacteriana, el diagnóstico de la septicemia es más difícil de realizar. En términos más generales, es muy útil poder predecir el desarrollo de la septicemia en pacientes que presentan un estado de SIRS. Para este fin, la solicitud de patente US 2011/0105350 describe métodos que utilizan la combinación de marcadores de ARNm medidos en extractos de ARN obtenidos de muestras de sangre. La anexina A3 forma parte de estos marcadores de elección.

La solicitud de patente WO 2010/011860, por su parte, describe métodos para la detección de la pre-diabetes y la diabetes. Estos métodos se basan en la comparación de perfiles proteómicos que contienen al menos una firma de expresión única, característica de la pre-diabetes o la diabetes. Estos perfiles proteómicos contienen información sobre la expresión de diferentes proteínas, incluida la anexina A3.

Aunque la anexina A3 se reconoce como un marcador para el cáncer y otras patologías, los procedimientos para detectarla y cuantificarla descritos hasta ahora carecen de especificidad en la medida en que los anticuerpos utilizados presentan reacciones cruzadas con otras anexinas (véase WO 2006/125580), o bien carecen de sensibilidad para detectarla en un fluido biológico complejo como la orina (véase WO 2007/141043). En general, los procedimientos anteriores carecen de robustez y no permiten la detección y la cuantificación fiables de concentraciones muy bajas de anexina A3, del orden de ng/mL, en un fluido biológico complejo y en particular en la

sangre o en al menos uno de sus derivados, tales como el plasma y el suero.

Hasta ahora, ninguna técnica de inmunodetección y/o de inmuvaloración ha permitido detectar y/o valorar la anexina A3 en la sangre, el plasma o el suero (principalmente en cantidades del orden de ng/mL). Sin embargo, dicha valoración sanguínea, plasmática o sérica es extremadamente deseable en la medida en que es fácilmente realizable (una simple extracción de sangre), reproducible y el resultado obtenido no depende en su totalidad o en parte del éxito de una manipulación previa del paciente, tal como un tacto prostático que tiene por objetivo recuperar una muestra de orina expresada (en el caso de una sospecha de cáncer de próstata).

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que con el fin de remediar todos o algunos de los inconvenientes antes citados, convenía utilizar una pareja de anticuerpos uno de los cuales está dirigido contra el primer dominio repetido (D1) de la anexina A3 de un mamífero y el otro está dirigido contra el cuarto dominio repetido (D4) de la anexina A3 de dicho mamífero. Si se considera la anexina A3 humana, conviene utilizar una pareja de anticuerpos uno de los cuales está dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana cuya secuencia está identificada en SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 27-87 de la anexina A3 humana, según la numeración de la base de datos UniProtKB de ANXA3 completa humana N° de acceso P12429) y el otro está dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina humana cuya secuencia está identificada en la SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 258-318, según la numeración de la base de datos UniProtKB de ANXA3 completa humana de N° de acceso P12429).

En la siguiente descripción, la secuencia del primer dominio repetido de la anexina A3 humana está identificada en la SEQ ID NO: 1, la secuencia del cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana está identificada en la SEQ ID NO: 2, la secuencia del segundo dominio repetido de la anexina A3 humana está identificada en la SEQ ID NO: 3, la secuencia del tercer dominio repetido de la anexina A3 humana está identificada en la SEQ ID NO: 4. La secuencia identificada en la SEQ ID NO: 5 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la anexina A3 humana completa (UniProtKB N° de acceso P12429).

Por «detectar la presencia de anexina A3 en la sangre o en al menos uno de sus derivados» (fluidos biológicos, tales como plasma, suero, ...), se entiende descubrir la presencia de esta proteína, en particular en los fluidos biológicos antes citados.

Por «valorar (cuantificar) la anexina A3 en la sangre o en al menos uno de sus derivados» (fluidos biológicos, tales como plasma, suero, ...), se entiende el hecho de determinar la cantidad (por ejemplo, la concentración) de la anexina A3 en particular en dichos fluidos biológicos.

En consecuencia, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de detección y/o de valoración de la anexina A3 de un mamífero en la sangre o en al menos uno de sus derivados, tales como plasma y suero, en el que la sangre o al menos uno de sus derivados se pone en contacto con un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, estando dirigido el primer anticuerpo contra el primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y estando dirigido el segundo anticuerpo contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero. Si se considera la anexina A3 humana, el primer anticuerpo está dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana cuya secuencia está identificada en la SEQ ID NO: 1 y el segundo anticuerpo está dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana cuya secuencia está identificada en la SEQ ID NO: 2.

En otras palabras, el primer anticuerpo reconoce y se une/se fija a todo o parte del primer dominio repetido de la anexina A3 del mamífero de interés y el segundo anticuerpo reconoce y se une/se fija a todo o parte del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.

Esta combinación específica de un primer anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 de un mamífero y de un segundo anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 de este mamífero permite detectar y/o valorar la anexina A3 en la sangre, el plasma o el suero (principalmente en cantidades del orden de ng/mL) en dicho mamífero. Esto es aún más inesperado que si se utiliza, en lugar de dicho segundo anticuerpo, un anticuerpo dirigido contra un dominio repetido de la anexina A3 distinto de su cuarto dominio repetido (por ejemplo, dirigido contra el primer dominio repetido), en cuyo caso no se conseguiría valorar e incluso en ciertos casos detectar la anexina A3 en la sangre, el plasma o el suero del mamífero en cuestión.

En el ser humano, el procedimiento de detección y/o de valoración según la invención permite detectar y/o valorar la isoforma de 33 kDa [10] de la anexina A3 humana y/o la de 36 kDa (correspondiente de hecho a un grupo de isoformas heterogéneas [10]; véase anteriormente). La isoforma de 33 kDa es una molécula truncada de 39 aminoácidos en el lado N-terminal con relación a la isoforma de 36 kDa. En otras palabras, su secuencia polipeptídica corresponde a los aminoácidos 40-323 de la SEQ ID NO: 5. Por tanto, si el primer anticuerpo elegido se une/se fija al fragmento 27-39 del primer dominio repetido de la anexina A3 humana, el procedimiento de valoración detecta y/o valora únicamente la isoforma de 36 kDa. En cambio, si el primer anticuerpo seleccionado se une/se fija al fragmento 40-87 del primer dominio repetido de la anexina A3 humana, el procedimiento de valoración detecta y/o valora todas las isoformas.

Los dominios D1 y D4 de la anexina A3 presentan una fuerte identidad en los mamíferos y principalmente en los mamíferos corrientemente estudiados. En consecuencia, el procedimiento y el kit de la presente invención se aplican

a la detección y/o la valoración de la anexina A3 en la sangre o en uno de sus derivados, tales como el plasma y el suero, en un mamífero.

En particular, el procedimiento y el kit de la presente invención se aplican a la detección y/o la valoración de la anexina A3, principalmente entre las especies siguientes: *Homo sapiens* (Hombre), *Sus scrofa domesticus* (Cerdo), *Bos taurus* (Toro), *Canis familiaris* (Perro), *Oryctolagus cuniculus* (Conejo), *Macaca mulatta* (Macaco Rhesus), *Gorilla gorilla* (Gorila). Ventajosamente, el procedimiento y el kit de la presente invención podrán aplicarse evidentemente al hombre, pero también a los mamíferos denominados domésticos (tales como el gato, el perro, etc.), así como a los primates.

De manera particularmente interesante, el procedimiento de detección y/o de valoración según la invención se lleva a cabo *in vitro* en muestras biológicas de origen humano.

Más precisamente, con el fin de analizar la identidad de las secuencias proteicas D1 y D4 de la anexina A3 en diferentes mamíferos, las secuencias de aminoácidos del primer y cuarto dominios repetidos (designados respectivamente «D1» y «D4») de la anexina A3 humana se comparó con las del primer y cuarto dominio repetido de la anexina A3 en otros mamíferos. Para este fin, se realizó una consulta a la base de datos UniProtKB (www.uniprot.org). La Tabla 1 siguiente indica, para cada especie de mamífero incluida en el presente análisis, el número de acceso de la secuencia de la proteína anexina A3 de la especie, así como el nombre de la entrada en la base de datos. Para cada especie de mamífero, las secuencias de los dominios D1 y D4 se extrajeron manualmente y luego se alinearon con la secuencia correspondiente de la anexina A3 humana utilizando la función «Align» que está disponible en la pestaña «Align» en el sitio de internet UniProt. Esta función utiliza el programa Clustal O (v1.0.3). Dicha Tabla 1 presenta, para cada uno de los dominios D1 y D4, el porcentaje de identidad con relación a la secuencia correspondiente de la anexina A3 humana. Los alineamientos de secuencias de los dominios D1 y D4 se presentan respectivamente en las Figuras 1a y 1b.

Tabla 1

Nº de acceso UniPro	Nombre de entrada	Organismo	% de identidad (D1)	% de identidad (D4)
P12429	ANXA3_HUMAN	<i>Homo sapiens</i> (Hombre)	100%	100%
035639	ANXA3_MOUSE	<i>Mus musculus</i> (Ratón)	87%	89%
P14669	ANXA3_RAT	<i>Rattus norvegicus</i> (Rata)	82%	87%
Q3SWX7	ANXA3_BOVIN	<i>Bos taurus</i> (Toro)	87%	92%
E2R0N3	E2R0N3_CANFA	<i>Canis familiaris</i> (Perro)	87%	93%
G1TEM7	G1TEM7_RABIT	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo)	93%	90%
F6Z8Y2	F6Z8Y2_MACMU	<i>Macaca Mulatta</i> (Macaco Rhesus)	98%	97%
G3R3Y9	G3R3Y9_GORGO	<i>Gorilla gorilla gorilla</i> (Gorila)	100%	100%

Tal como se indicó anteriormente, el procedimiento de valoración según la presente invención se puede realizar en una muestra de sangre o de uno de sus fluidos derivados (plasma, suero, etc.). Las definiciones de los términos «plasma» y «suero» son las definiciones habituales utilizadas en biología, a saber:

- el plasma consiste en la parte líquida de la sangre, en la que están en suspensión los elementos celulares (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas); y

- el suero se refiere al líquido que se separa del coágulo después de la coagulación de la sangre, correspondiente al plasma desprovisto de fibrinógeno.

La invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de detección y/o de valoración *in vitro* de la anexina A3 en una muestra biológica de un mamífero, eligiéndose dicha muestra biológica entre la sangre o al menos uno de sus derivados, tales como el plasma y el suero, en donde la muestra biológica se pone en contacto con un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, estando dirigido el primer anticuerpo contra el primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y estando dirigido el segundo anticuerpo contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.

Ventajosamente, el primer anticuerpo es un anticuerpo de captura y el segundo anticuerpo es un anticuerpo de detección (revelado).

Según un modo de realización preferido, el primer anticuerpo se selecciona entre anticuerpos dirigidos contra un

epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 17 aminoácidos consecutivos del primer dominio repetido (D1) de la anexina A3 del mamífero de interés. En el caso de la valoración de la anexina A3 humana, el primer anticuerpo 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 SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, el primer anticuerpo se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo incluido en el primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero, teniendo dicho epítipo una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias siguientes:

Xaa1-Xaa2-A-Q-Xaa3-Xaa4-L-I-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11 (SEQ ID NO: 37),

L-1-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11 (SEQ ID NO: 38),

1-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13 (SEQ ID NO: 39),

Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11 (SEQ ID NO: 40),

Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-L-K-Xaa14-D-L-K-G (SEQ ID NO: 41), con la condición de que la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41 esté fusionada del lado N-terminal con una secuencia de al menos 30 aminoácidos,

DLSGHF-Xaa20-Xaa21-Xaa22 (SEQ ID NO: 42),

LSGHF-Xaa20-Xaa21 (SEQ ID NO: 43),

en las que:

- Xaa1 representa un residuo de serina, un residuo de treonina o un aminoácido análogo,

- Xaa2 representa un residuo de asparagina, un residuo de serina o un aminoácido análogo,

- Xaa3 representa un residuo de arginina, un residuo de histidina o un aminoácido análogo,

- Xaa4 representa un residuo de glutamina, un residuo de leucina o un aminoácido análogo,

- Xaa5 representa un residuo de valina, un residuo de alanina o un aminoácido análogo,

- Xaa6 representa un residuo de lisina, un residuo de arginina o un aminoácido análogo,

- Xaa7 representa un residuo de ácido glutámico, un residuo de glutamina o un aminoácido análogo,

- Xaa8 representa un residuo de alanina, un residuo de ácido glutámico o un aminoácido análogo,

- Xaa9 representa un residuo de alanina, un residuo de leucina o un aminoácido análogo,

- Xaa10 representa un residuo de tirosina, un residuo de cisteína o un aminoácido análogo,

- Xaa11 representa un residuo de glicina, un residuo de ácido glutámico o un aminoácido análogo,

- Xaa12 representa un residuo de lisina, un residuo de glutamina o un aminoácido análogo,

- Xaa13 representa un residuo de ácido glutámico, un residuo de alanina o un aminoácido análogo,

- Xaa14 representa un residuo de ácido aspártico, un residuo de alanina o un aminoácido análogo,

- Xaa20 representa un residuo de ácido glutámico, un residuo de lisina o un aminoácido análogo,

- Xaa21 representa un residuo de histidina, un residuo de glutamina o un aminoácido análogo,

- Xaa22 representa un residuo de leucina, un residuo de valina o un aminoácido análogo.

Ventajosamente:

- Xaa1 representa un residuo de serina o un residuo de treonina,

- Xaa2 representa un residuo de asparagina o un residuo de serina,

- Xaa3 representa un residuo de arginina o un residuo de histidina,

- Xaa4 representa un residuo de glutamina o un residuo de leucina,

- Xaa5 representa un residuo de valina o un residuo de alanina,
- Xaa6 representa un residuo de lisina o un residuo de arginina,
- Xaa7 representa un residuo de ácido glutámico o un residuo de glutamina,
- Xaa8 representa un residuo de alanina o un residuo de ácido glutámico,
- 5 - Xaa9 representa un residuo de alanina o un residuo de leucina,
- Xaa10 representa un residuo de tirosina o un residuo de cisteína,
- Xaa11 representa un residuo de glicina o un residuo de ácido glutámico,
- Xaa12 representa un residuo de lisina o un residuo de glutamina,
- Xaa13 representa un residuo de ácido glutámico o un residuo de alanina,
- 10 - Xaa14 representa un residuo de ácido aspártico o un residuo de alanina,
- Xaa20 representa un residuo de ácido glutámico o un residuo de lisina,
- Xaa21 representa un residuo de histidina o un residuo de glutamina,
- Xaa22 representa un residuo de leucina o un residuo de valina.

15 La expresión «aminoácido análogo» se refiere a un aminoácido que, cuando reemplaza al aminoácido presente en el epítipo de interés, no ocasiona ninguna modificación sustancial de la reactividad antigénica de dicho epítipo con respecto al anticuerpo de interés.

20 Los análogos particularmente preferidos incluyen los que presentan sustituciones conservadoras en la naturaleza, es decir, sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos. Existen varias clasificaciones de aminoácidos en familia, como saben los expertos en la técnica. Por tanto, según un ejemplo de clasificación, los aminoácidos se pueden dividir en cuatro familias, a saber (1) los aminoácidos ácidos, tales como el ácido aspártico o el ácido glutámico, (2) los aminoácidos básicos, tales como la lisina, la arginina y la histidina, (3) los aminoácidos no polares, tales como la leucina, la isoleucina y la metionina y (4) los aminoácidos no cargados polares, tales como la glicina, la asparagina, la glutamina, la serina, la treonina y la tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican algunas veces como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede predecir razonablemente que un reemplazo aislado de un residuo de leucina por un residuo de isoleucina o valina, un residuo de aspartato por un residuo de glutamato, un residuo de treonina por un residuo de serina, o un reemplazo conservador similar de un aminoácido por otro aminoácido que tenga una relación estructural, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Otro ejemplo de un método que permita predecir el efecto sobre la actividad biológica de una sustitución de aminoácidos ha sido descrito por Ng et Henikoff, 2001 [27].

30 En particular, en el caso de la detección y/o la valoración de la anexina A3 humana, el primer anticuerpo se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo incluido en la SEQ ID NO: 1, teniendo dicho epítipo una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias siguientes:

SNAQRQLIVKEYQAAYG (SEQ ID NO: 10),

LIVKEYQAAYG (SEQ ID NO: 11),

35 IVKEYQAAYGKE (SEQ ID NO: 12),

KEYQAAYG (SEQ ID NO: 13),

DLSGHFEHL (SEQ ID NO: 14),

LSGHFEH (SEQ ID NO: 15),

y

40 KEYQAAYGKELKDDLKG (SEQ ID NO: 22), con la condición de que la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 esté fusionada al lado N-terminal con una secuencia de al menos 30 aminoácidos.

45 Si se desea detectar y/o valorar la anexina A3 en un mamífero que no sea el hombre - por ejemplo, uno de los mamíferos enumerados en la Tabla 1 anterior - el primer anticuerpo se puede seleccionar entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una de las secuencias SEQ ID N°: 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 22 en el mamífero de interés. Como ejemplo, en el contexto de la detección y/o la valoración de la anexina A3 del perro (*Canis familiaris*), dicho primer anticuerpo está dirigido contra un epítipo incluido en el primer

dominio repetido de la anexina A3 canina, teniendo dicho epítipo una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias siguientes:

TNAQHQLIVREYQAAYG (SEQ ID NO: 44),

LIVREYQAAYG (SEQ ID NO: 45),

5 IVREYQAAYGKE (SEQ ID NO: 46),

REYQAAYG (SEQ ID NO: 47),

DLSGHFKQL (SEQ ID NO: 48),

LSGHFKQ (SEQ ID NO: 49),

y

10 REYQAAYGKELKDDLKG (SEQ ID NO: 50), con la condición de que la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 50 esté fusionada al lado N-terminal con una secuencia de al menos 30 aminoácidos.

Con respecto al segundo anticuerpo antes mencionado, dicho anticuerpo se selecciona preferiblemente entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 50 aminoácidos consecutivos del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero. Si el mamífero en cuestión es el hombre, el segundo anticuerpo se selecciona preferiblemente entre anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos y no más de 7 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 2.

20 Ventajosamente, el segundo anticuerpo se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo 3 y termina en el residuo 49 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 del mamífero de interés. También en este caso, si el mamífero es el hombre, el segundo anticuerpo se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo 3 y termina en el residuo 49 de la SEQ ID NO: 2.

25 Según un modo de realización preferido de la presente invención, el segundo anticuerpo reconoce un epítipo que comprende un residuo de lisina en la posición 6 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de un mamífero y/o un residuo de ácido aspártico en la posición 49 de dicho cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero. Preferiblemente, dicho epítipo comprende un residuo de lisina en la posición 6 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de un mamífero y un residuo de ácido aspártico en la posición 49 de dicho cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.

30 En el contexto de un procedimiento de detección y/o de valoración de la anexina A3 humana, el segundo anticuerpo reconoce un epítipo que comprende un residuo de lisina en la posición 6 de la SEQ ID NO: 2 y/o un residuo de ácido aspártico en la posición 49 de la SEQ ID NO: 2. Ventajosamente, el epítipo reconocido por este segundo anticuerpo comprende tanto un residuo de lisina en la posición 6 de la SEQ ID NO: 2 como un residuo de ácido aspártico en la posición 49 de la SEQ ID NO: 2. En efecto, se ha revelado que la lisina en la posición 6 de la SEQ ID NO: 2 y el ácido aspártico en la posición 49 de la SEQ ID NO: 2 son - durante los procesos de «mapeo» - los residuos más importantes en la interacción anticuerpo-antígeno entre el segundo anticuerpo y el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana de secuencia SEQ ID NO: 2 (véase el ejemplo 7, apartado «Localización precisa del epítipo de los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6»).

40 Según un modo de realización particularmente preferido, el segundo anticuerpo reconoce y se une a un epítipo que comprende, además de los residuos de lisina en la posición 6 y/o ácido aspártico en la posición 49 de D4, un residuo de arginina o glutamina en la posición 3 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y un residuo de isoleucina o alanina en la posición 8 de dicho cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero. Según este modo de realización preferido, cuando se considera la detección y/o la valoración de la anexina A3 humana, el segundo anticuerpo está dirigido contra un epítipo que comprende, además de residuos de lisina en la posición 6 y/o ácido aspártico en la posición 49 de la SEQ ID NO 2, los residuos de arginina en la posición 3 e isoleucina en la posición 8 de la SEQ ID NO: 2. En efecto, la presencia de estos aminoácidos específicos en las posiciones 3, 6, 8 y 49 de la SEQ ID NO 2 (correspondientes respectivamente a las posiciones 260, 263, 265 y 306 de la anexina A3 humana de la secuencia SEQ ID NO: 5) parece ser primordial con respecto a la capacidad de fijación de los anticuerpos que reconocen el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana (SEQ ID NO: 2), a saber los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6, tales como se indican en el Ejemplo 7 más adelante.

50 Preferiblemente, el epítipo reconocido por el segundo anticuerpo comprende un residuo de glicina en la posición 7 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero, un residuo de isoleucina o alanina en la posición 8 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y un residuo de glicina en la posición 9 de dicho cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero. Si se considera la anexina A3 humana, el epítipo

reconocido por el segundo anticuerpo comprende preferiblemente un residuo de glicina en la posición 7 de la SEQ ID NO: 2, un residuo de isoleucina en la posición 8 de la SEQ ID NO: 2 y un residuo de glicina en la posición 9 de la SEQ ID NO: 2.

5 Según un modo de realización particularmente preferido, y en el contexto de la detección y/o la valoración de la anexina A3 humana, el segundo anticuerpo reconoce un epítipo que comprende un residuo de arginina en la posición 3 de la SEQ ID NO: 2, un residuo de lisina en la posición 6 de la SEQ ID NO: 2, un residuo de glicina en la posición 7 de la SEQ ID NO: 2, un residuo de isoleucina en la posición 8 de la SEQ ID NO: 2, un residuo de glicina en la posición 9 de la SEQ ID NO: 2 así como un residuo de ácido aspártico en la posición 49 de la SEQ ID NO: 2.

10 Según un modo de realización particularmente preferido, el mamífero es el hombre y el primer anticuerpo está dirigido contra el primer dominio repetido de dicha anexina A3 humana cuya secuencia se identifica en la SEQ ID NO: 1 y el segundo anticuerpo está dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana cuya secuencia se identifica en la SEQ ID NO: 2.

15 Los anticuerpos específicos del primer dominio repetido de la anexina A3 humana (SEQ ID NO: 1) y los específicos del cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana (SEQ ID NO: 2), son anticuerpos que presentan una afinidad elevada con una constante de afinidad de al menos 10^{-9} , preferiblemente de al menos 10^{-10} y que además presentan una constante de disociación baja inferior a $2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, incluso preferiblemente inferior a $5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

20 Preferiblemente, dicho primer anticuerpo y/o dicho segundo anticuerpo es/son anticuerpos monoclonales. Ventajosamente, tanto el primer anticuerpo como el segundo anticuerpo son anticuerpos monoclonales. Con respecto a la detección y/o la valoración de la anexina A3 humana, los anticuerpos preferidos son los anticuerpos siguientes: TGC42, TGC43, TGC44 utilizados como primer anticuerpo (anticuerpo de captura según un modo de realización preferido) y 13A12G4H2 y 1F10A6 utilizados como segundo anticuerpo (anticuerpo de detección según dicho modo de realización preferido). La pareja preferida está constituida por el primer anticuerpo (anticuerpo de captura según un modo de realización preferido) TGC43 o TGC44 y el segundo anticuerpo (anticuerpo de detección según dicho modo de realización preferido) 13A12G4H2.

25 La invención se refiere igualmente a un procedimiento según la presente invención para el diagnóstico *in vitro* y/o el seguimiento *in vitro* de la evolución de una patología incluida en el grupo constituido por:

- los cánceres, tales como los cánceres urogenitales y principalmente el cáncer de próstata, el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón, el cáncer de páncreas, el cáncer de tiroides papilar, el cáncer de mama,

30 - los trastornos inflamatorios, tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, la septicemia, la poliartritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la diabetes.

35 La invención tiene igualmente por objeto un kit de inmunodetección y/o de inmuovaloración de una muestra biológica de un mamífero, eligiéndose dicha muestra biológica entre la sangre o al menos uno de sus derivados, tales como el plasma y el suero, conteniendo dicho kit un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, estando dirigido el primer anticuerpo contra el primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y estando dirigido el segundo anticuerpo contra el cuarto dominio de la anexina A3 de dicho mamífero. Dicho kit permite realizar el procedimiento de detección y/o de valoración de la anexina A3 de un mamífero según la presente invención. Dichos primer y segundo anticuerpos son tales como se han definido anteriormente. Preferiblemente, dicho kit de inmunodetección y/o de inmuovaloración sanguínea, plasmática o sérica permite detectar y/o valorar la anexina A3 humana. En este caso, el primer anticuerpo está dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 humana, de secuencia SEQ ID NO: 1, y el segundo anticuerpo está dirigido contra el cuarto dominio de la anexina A3 humana cuya secuencia se identifica en la SEQ ID NO: 2.

Según un modo de realización preferido, la invención se refiere a un kit de inmunodetección y/o de inmuovaloración de una muestra biológica de un mamífero, seleccionándose dicha muestra biológica entre la sangre o al menos uno de sus derivados, tales como el plasma y el suero, comprendiendo dicho kit:

45 - un primer anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero, tal como se define en la presente invención;

- un segundo anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero, tal como se define en la presente invención,

permitiendo dicho kit realizar el procedimiento según la presente invención.

50 El primer y el segundo anticuerpo - respectivamente anticuerpo de captura y anticuerpo de detección según un modo de realización preferido - responden a las mismas definiciones y presentan las mismas características que las presentadas anteriormente con respecto al procedimiento de detección y/o de valoración según la presente invención.

Ventajosamente, dicho kit comprende un medio de calibración apropiado.

Por «medio de calibración apropiado» se entiende, en el sentido de la presente invención, un medio de calibración adaptado a la detección y/o la valoración de la anexina A3 en la sangre o en al menos uno de sus derivados, tales como el plasma y el suero.

5 Según un modo de realización preferido, el medio de calibración comprende una muestra de sangre, plasma o suero del mismo origen (mismo mamífero). Se conoce la concentración de anexina A3 en esta muestra. Ventajosamente, dicha sangre, plasma o suero del mismo origen se diluyen en un diluyente apropiado para establecer un intervalo patrón. Preferiblemente, el diluyente apropiado es un tampón apropiado. Como ejemplo, dichos medios de calibración comprenden:

- la anexina A3 de origen endógeno (purificada o no) diluida en un tampón apropiado, o

10 - la anexina A3 de origen exógeno (por ejemplo, la anexina A3 recombinante) diluida en un tampón apropiado.

Como tampón apropiado, se pueden citar principalmente:

- Tris 0,1 M, NaCl 10-200 mM, BSA 1-20%,

- Tris 0,1 M, NaCl 10-200 mM, suero de vaca 1-20 %,

- Tris 0,1 M, NaCl 10-200 mM, suero de caballo 1-20%,

15 - Fosfato de potasio 20-100 mM, NaCl 10-200 mM, BSA 1-20%,

- Glicina 5-200 mM, HEPES 5-200 mM, BSA 1-20%.

Evidentemente, los expertos en la técnica determinarán fácilmente, a partir de sus conocimientos generales, los tampones apropiados que permiten obtener un medio de calibración apropiado según la presente invención.

En particular, el tampón puede comprender o no uno o varios detergentes.

20 Además, con el fin de mejorar el rendimiento del kit, se pueden añadir compuestos adicionales, tales como:

- azúcares: fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, etc.;

- antioxidantes: ácido ascórbico, metionina, etc.;

- anti-reductores;

- anti-quelantes: EDTA, etc.;

25 - anti-proteasas: aprotinina, etc.;

- polímeros para capturar agua: polivinilpirrolidona, dextrano, etc.;

- estabilizantes: ácido cítrico, etc.;

- antibióticos, antimicóticos, bacteriostáticos: azida de sodio, etc.

30 Tal como se ha mencionado anteriormente, es esencial que el medio de calibración esté adaptado a la detección y/o la valoración en la muestra biológica elegida, es decir, la sangre o al menos uno de sus derivados, tales como el plasma y el suero. Por tanto, un medio de calibración utilizado en el contexto de la detección y/o la valoración de la anexina A3 humana en la orina expresada no es adecuado para el kit de inmunodetección y/o de inmuovaloración sanguínea, plasmática o sérica de la invención.

35 Otro objeto de la invención se refiere a la utilización de un kit de inmunodetección y/o de inmuovaloración según la presente invención para llevar a cabo el procedimiento de detección y/o de valoración antes mencionado.

40 Tanto el procedimiento de detección y/o de valoración de la anexina A3 de un mamífero (preferiblemente el hombre) como el kit de inmunodetección y/o de inmuovaloración según la presente invención se pueden emplear, de manera eficaz, para efectuar el diagnóstico *in vitro* y/o el seguimiento *in vitro* de la evolución de diversas patologías y afecciones. Entre las patologías que se pueden así diagnosticar y/o seguir, se pueden citar: los cánceres y en particular los cánceres urogenitales (especialmente los cánceres de próstata), el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón, el cáncer de páncreas, el cáncer de tiroides papilar, el cáncer de mama, etc. Igualmente se pueden diagnosticar/seguir patologías inflamatorias, y en particular patologías inflamatorias. Como patologías inflamatorias se pueden citar principalmente el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, en inglés), la poliartritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la diabetes, etc. Esta lista no es exhaustiva.

45 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 preferidos los anticuerpos que presentan las afinidades más elevadas y las constantes de disociación más bajas.

5 Los anticuerpos policlonales se pueden obtener por inmunización de un animal con el inmunógeno apropiado, seguido de la recuperación de los anticuerpos deseados en forma purificada, extrayendo el suero de dicho animal, y la separación de dichos anticuerpos de los otros constituyentes del suero, principalmente por cromatografía de afinidad en una columna a la que se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos.

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

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

20 Los anticuerpos monoclonales pueden ser igualmente anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

El anticuerpo de captura se fija con preferencia, directa o indirectamente, a un soporte sólido, por ejemplo, un cono, un pocillo de una placa de microtitulación, etc.

25 El anticuerpo de detección se marca con 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 peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa,
- 30 - los cromóforos, como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,
- las moléculas fluorescentes, tales como Alexa o las ficocianinas,
- las moléculas radiactivas, como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I .

35 También se pueden utilizar sistemas indirectos de detección, como por ejemplo ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Las parejas ligando/anti-ligando son bien conocidas por los expertos en la técnica, como es el caso, por ejemplo, de las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina. En este caso, es el ligando el que lleva al compañero de unión. El anti-ligando puede ser detectado directamente por los reactivos marcadores descritos en el párrafo anterior o ser el mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

40 Estos sistemas indirectos de detección pueden conducir, bajo ciertas condiciones, a una amplificación de la señal. Este método de amplificación de la señal es bien conocido por los expertos en la técnica, y se podrá hacer referencia a las solicitudes de patente anteriores FR98/10084 o WO-A-95/08000 de la sociedad solicitante.

Según el tipo de marcaje utilizado, los expertos en la técnica añadirán reactivos que permitirán la visualización del marcaje.

45 Según un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención es una inmunovaloración de tipo «sándwich» efectuado en una muestra de sangre o en fluidos biológicos derivados de ella, como el suero o el plasma, con o sin tratamiento de la muestra.

La invención se comprenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes dados a modo ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las figuras adjuntas.

Figuras

50 Las Figuras 1a y 1b representan respectivamente los alineamientos de las secuencias proteicas del primer y cuarto dominios repetidos de la anexina A3 de ocho mamíferos de referencia (incluido el ser humano). En la línea de consenso en la parte inferior de cada alineamiento, el asterisco (*) indica una posición que corresponde a un residuo

totalmente conservado; los dos puntos (:) indican una posición muy conservada, con residuos que poseen una gran similitud (= puntuación > 0,5 en la matriz PAM 250 de Gonnet); el punto (.) indica una posición conservada moderadamente, con residuos que poseen una similitud moderada (= puntuación < 0,5 en la matriz PAM 250 de Gonnet). Dicha matriz de Gonnet et al., a la que se hace referencia anteriormente está descrita en la siguiente publicación: Gonnet G.H., Cohen M.A., Benner S.A.; "Exhaustive matching of the entire protein sequence database"; Science 256: 1443-1445 (1992) [25].

La Figura 2 representa las curvas de calibración de las valoraciones por ELISA con TGC44/13A12G4H2 (grupo 1) y TGC44/5C5B10 (grupo 2). Para cada valoración, la curva de calibración se estableció valorando un intervalo de concentración de la proteína anexina A3 humana natural purificada. La curva de calibración se trazó representando en abscisas la concentración de la anexina A3 humana y en ordenadas la señal medida por VIDAS® en RFV.

La Figura 3 representa la reactividad de los 4 dominios repetidos D1 a D4 de la anexina A3 humana, expresada en una forma recombinante, con los 6 anticuerpos monoclonales anti-anexina A3 indicados y analizados por la técnica de transferencia de Western. Para los geles TGC42 y 1F10A6, el primer pocillo corresponde al marcador de masa molecular.

La Figura 4 es un alineamiento de secuencias de las diferentes proteínas recombinantes que expresan dominios de la anexina A3 humana y resume la inmunorreactividad de cada uno de estos recombinantes con el anticuerpo monoclonal TGC44, analizada por la técnica de transferencia de Western. Los tres puntos de suspensión en el extremo N-terminal o C-terminal de una secuencia indican que continúa en la construcción, incluso si no está representada completamente en la figura. El codón de parada está representado por una estrella (*).

La Figura 5 ilustra el impacto de las mutaciones de alanina del dominio D4 sobre el reconocimiento de la anexina A3 humana por los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6. El análisis se realizó por la técnica ELISA y el anticuerpo de captura fue TGC44. Los anticuerpos 13A12G4H2, 1F10A6 analizados se usaron en la detección. La posición de las mutaciones de alanina en la secuencia proteica de la anexina A3 humana se representa en abscisas. En ordenadas se representa la «*signal fold change*» que corresponde al logaritmo en base 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 y sirve como control. Las flechas indican las mutaciones para las cuales hay perturbación de la señal de reconocimiento para 13A12G4H2 y 1F10A6, lo que permiten definir los residuos implicados en la fijación de estos anticuerpos.

La figura 6a corresponde al inmunorrevelado de la membrana ALAscan del péptido KGDLSGHFEHLM (residuos 73 a 84) de la anexina A3 que comprende el epítipo reconocido por el anticuerpo 5C5B10 con este anticuerpo. La flecha negra indica una pérdida total de la señal; Las flechas grises indican una disminución significativa de la señal.

La figura 6b corresponde al inmunorrevelado de la membrana ALAscan del péptido VKEYQAAYGKEL (residuos 57-68) de la anexina A3 que comprende el epítipo reconocido por el anticuerpo TGC43 con este anticuerpo. La flecha negra indica una pérdida total o una disminución muy importante de la señal.

La Figura 7 ilustra la ausencia de reactividad cruzada de los formatos de valoración por ELISA descritos con otras 7 proteínas de la familia de las anexinas. El gráfico representa la señal de ELISA obtenida en «*relative fluorescence values*» (RFV) en el VIDAS® para cada uno de los formatos de ensayo con TGC44/5C5B10 y TGC44/13A12G4H2 y para cada anexina indicada en abscisas. A modo de comparación, en las condiciones experimentales utilizadas, la anexina A3 permitió obtener una señal superior a 6000 RFV con cada uno de los formatos de ensayo.

La Figura 8 representa los sensorgramas obtenidos para cada uno de los 6 anticuerpos monoclonales caracterizados por 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 dada de la anexina A3. Para cada anticuerpo, se analizaron y están representadas 9 diluciones comprendidas entre 0 y 64 nM de la anexina A3.

La Figura 9 representa el análisis por transferencia de Western de exosomas purificados (tratamiento ExoQuick) de los sueros de 2 pacientes con cáncer de próstata. Las membranas se incubaron bien con un anticuerpo anti-CD63 o bien con un anticuerpo anti-ANXA3.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de la anexina A3 humana por ELISA en el suero de pacientes que tienen un cáncer de próstata

Obtención de los anticuerpos monoclonales

Los experimentos de inmunización se realizaron en ratones hembra BALB/c (H-2d) de seis a ocho semanas en el momento de la primera inmunización. La proteína anexina A3 humana natural se adquirió a la sociedad Arodia Arotech Diagnostic™ (Cat No. 25592) y se purificó a partir de neutrófilos humanos. Esta proteína se mezcló volumen por volumen con adyuvante de Freund (Sigma Aldrich™), preparado en forma de una emulsión de agua en aceite y que se sabe que presenta un buen poder inmunógeno. Los ratones recibieron tres dosis sucesivas de 10 µg de

inmunógeno en las semanas cero, dos y cuatro. Todas las inyecciones se realizaron por vía subcutánea. La primera inyección se hizo mezclada con el adyuvante completo de Freund y las dos siguientes mezcladas con el adyuvante incompleto de Freund. Entre el día 50 y el día 70 después de la primera inyección, las respuestas humorales se reestimularon con una inyección intravenosa de 100 µg de la proteína natural.

5 Con el fin de seguir la aparición de los anticuerpos, se toman regularmente muestras de sangre de los ratones. La presencia de los anticuerpos anti-ANXA3 se analizó usando un ELISA. La proteína de interés se utilizó en captura (1 µg/pocillo), después de la saturación se hizo reaccionar con diferentes diluciones del antígeno de los sueros de ensayo (incubación a 37°C durante 1 h). Los anticuerpos específicos presentes en el suero fueron revelados por un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón AffiniPure™ conjugado con fosfatasa alcalina (H+L, Jackson Immunoresearch, Cat No. 115-055-146), que se une a los anticuerpos buscados (0,1 µg/pocillo).

10 Tres días después de la última inyección, se sacrificó uno de los ratones inmunizados; se extrajeron la sangre y el bazo. Los esplenocitos obtenidos del bazo del bazo se cultivaron con células de mieloma Sp2/0-Ag14 para que se fusionaran e inmortalizaran según el protocolo descrito en [22, 23]. Después de un período de incubación de 12-14 días, se cribaron los líquidos sobrenadantes de los hibridomas obtenidos para determinar la presencia de anticuerpos anti-ANXA3 usando el ensayo ELISA descrito en el párrafo anterior. El inmunógeno (ANXA3 natural), la anexina A3 recombinante producida en *E. coli*, y diferentes células humanas que expresan ANXA3 se usaron sucesivamente para cribar los líquidos sobrenadantes de los hibridomas. Las colonias de hibridomas positivas se subclonaron dos veces según el método de la dilución límite, bien conocido por los expertos en la técnica.

20 De este modo se obtuvieron los anticuerpos monoclonales anti-anexina A3 siguientes: 5C5B10, 13A12G4H2, 9C6B4, 6D9D10, 1F10A6.

Selección de los anticuerpos monoclonales anti-ANXA3 para valoración por inmunoensayo del ANXA3

25 La complementariedad de los diferentes anticuerpos anti-ANXA3 obtenidos como se describió anteriormente y los anticuerpos TGC42, TGC43 y TGC44 descritos en la solicitud de patente WO 2010/034825 se analizó utilizando como antígeno el ANXA3 humano natural (inmunógeno) diluido en tampón PBS, realizando un inmunoensayo de tipo sándwich. Este tipo de valoración se puede realizar en microplaca, automatizada o manual, o incluso utilizando autómatas de inmunoanálisis como VIDAS® (bioMérieux).

Se utilizaron los reactivos del kit VIDAS® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat NO. 30315), tales como los descritos en el prospecto correspondiente (ref 11728 D-FR-2005/5), y se modificaron de la siguiente manera:

- 30 • Se sensibilizaron conos con uno de los anticuerpos de captura de ensayo, TGC42, TGC43, TGC44 o 9C6B4 a una concentración de 10 µg/mL.
- El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se reemplazó por 300 µL de anticuerpo de revelado de ensayo (5C5B10, 13A12G4H2, 9C6B4, 6D9D10, 1F10A6, TGC42, TGC43, TGC44), acoplados a biotina, diluidos a 1 µg/mL en el tampón del segundo pocillo del kit VIDAS® HBs Ag Ultra (pocillo X1) que contenía suero de cabra y azida de sodio a 1 g/L.
- 35 • La proteína ANXA3 humana natural se analizó diluida a 100, 25 y 3 ng/mL en tampón PBS. La muestra se depositó (150 µL) en el primer pocillo (pocillo X0) del cartucho HBs Ag Ultra.
- La reacción ELISA se realizó utilizando el autómata VIDAS® y el protocolo descrito para el ensayo HBs Ag Ultra.
- 40 • Los resultados se obtuvieron como valores en brutos después de restar el ruido de fondo. La señal se expresó en RFV «*relative fluorescence value*»

La Tabla 2 siguiente resume los resultados obtenidos (señal RFV), con las diferentes combinaciones de anticuerpos utilizados de captura o de detección, en tres diluciones de la anexina A3 natural purificada de neutrófilos (100, 25 y 3 ng/mL). La dilución 0 ng/mL corresponde al tampón PBS de control, sin anexina A3.

Tabla 2

Anticuerpos de revelado biotinilados		Anticuerpos de captura			
Clon	Dilución de ANXA3. ng/mL	TGC42	TGC43	TGC44	9C6B4
TGC42	0	-	22	11	17
	3	-	44	20	78
	25	-	238	89	500
	100	-	859	297	1837

Anticuerpos de revelado biotinilados		Anticuerpos de captura			
Clon	Dilución de ANXA3. ng/mL	TGC42	TGC43	TGC44	9C6B4
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 3 siguiente resume los resultados obtenidos descritos en la Tabla 2, pero con una rejilla de lectura diferente, para facilitar el análisis y la interpretación:

Si RFV a 3 ng/mL < 1000 entonces « - »

5 Si RFV a 3 ng/mL > 1000 entonces « + »

Si RFV a 25 ng/mL > 3000 entonces « ++ »

Si (RFV a 100 ng/mL > 9000) y (3000 < RFV a 25 ng/mL < 9000) entonces « +++ »

Si RFV a 100 ng/mL y 25 ng/mL > 9000 entonces « ++++ »

Tabla 3

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

mAb = anticuerpo monoclonal

5 Como se puede ver en la tabla anterior, hay 9 combinaciones de anticuerpos monoclonales complementarios que permiten realizar una valoración por ELISA de tipo sándwich de ANXA3, con una dinámica de señal muy satisfactoria (parejas « +++ » y « ++++ »). Son posibles otras combinaciones de anticuerpos monoclonales complementarios, a saber, 9C6B4/TGC42, 9C6B4/TGC43 y 9C6B4/5C5B10, pero estas soluciones no son lo suficientemente robustas desde el punto de vista analítico y no tienen suficiente sensibilidad analítica para ser utilizadas en fluidos biológicos complejos como por ejemplo suero u orina.

10 Para estos experimentos de selección realizados diluyendo la anexina A3 humana purificada en tampón PBS, los anticuerpos monoclonales TGC42, TGC43 y TGC44, tienen en captura rendimientos equivalentes frente a la anexina A3 humana.

En detección, los anticuerpos monoclonales 5C5B10 y 13A12G4H2 también tienen rendimientos equivalentes con respecto a la anexina A3 humana, mientras que el anticuerpo monoclonal 1F10A6 proporciona señales satisfactorias, pero más débiles que con los anticuerpos monoclonales 5C5B10 y 13A12G4H2.

15 Los experimentos presentados en el Ejemplo 7 permitieron demostrar que los anticuerpos monoclonales TGC42, TGC43 y TGC44 reconocían todos la misma región de la anexina A3. Del mismo modo, los anticuerpos monoclonales 13A12G4H2 y 1F10A6 también reconocían el mismo epítipo, pero que es distinto del primero. El anticuerpo 5C5B10 reconocía, por su parte, un tercer epítipo distinto de los dos primeros. Por lo tanto, los diferentes tipos de valoraciones por ELISA que permitían detectar la ANXA3 se dividen en dos grupos. El grupo 1 corresponde a las combinaciones de los anticuerpos de captura TGC42, TGC43 o TGC44 con los clones 13A12G4H2 o 1F10A6 utilizados en detección. El grupo 2 corresponde a las combinaciones de anticuerpos de captura TGC42, TGC43 o TGC44 con el anticuerpo monoclonal 5C5B10 utilizado en detección.

Detección de la anexina A3 humana en el suero de sujetos que tienen un cáncer de próstata.

25 Se recogió sangre completa de 56 sujetos usando el sistema de recogida de S-Monovette (Sarstedt, Cat. No. 02.1388) y se trató según las instrucciones del fabricante para obtener suero. Estos 56 sujetos tenían todos cáncer de próstata (CaPro) comprobado, cuyo diagnóstico fue confirmado por análisis histológico de biopsia posterior. La ANXA3 contenida en estas 56 muestras de suero se cuantificó con una valoración por ELISA del grupo 1 (captura con TGC44, detección con 13A12G4H2) y una valoración por ELISA del grupo 2 (captura con TGC44, detección con 5C5B10). Como indicación, los anticuerpos de detección biotinilados se diluyeron a 0,3 µg/mL para el anticuerpo monoclonal 5C5B10 y 2,5 ng/mL para el anticuerpo monoclonal 13A12G4H2. Para cada valoración por ELISA, se estableció una curva de calibración valorando un intervalo de concentración de la proteína anexina A3 humana natural purificada (Arodia™) diluida en un tampón adecuado. A los sueros de origen animal o humano eventualmente incluidos en este tampón se eliminó previamente de la anexina A3 endógena que contenían para no distorsionar el resultado de la valoración. Alternativamente, se utilizaron lotes de suero de origen animal que no contenían más que cantidades muy pequeñas de la anexina A3 endógena. La curva de calibración se trazó representando concentración en abscisas y la señal medida por VIDAS® en RFV en ordenadas (Figura 2). La concentración de ANXA3 presente en la muestra de suero se calculó, cuando fue posible, interpolando la concentración correspondiente a la señal de RFV leída por VIDAS®, utilizando modelos matemáticos de regresión no lineal como un polinomio de tercer orden o un modelo 4-PL, bien conocido por los expertos en la técnica. Los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación.

ES 2 764 379 T3

Tabla 4

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
CaPro01	153	<0,5	914	5,8
CaPro02	38	<0,5	380	2,7
CaPro03	47	<0,5	779	5,0
CaPro04	38	<0,5	572	3,8
CaPro05	64	<0,5	2431	14,1
CaPro06	41	<0,5	452	3,1
CaPro07	71	<0,5	2095	12,2
CaPro08	44	<0,5	619	4,1
CaPro09	66	<0,5	1493	9,0
CaPro10	39	<0,5	401	2,8
CaPro11	42	<0,5	736	4,8
CaPro12	60	<0,5	2000	11,7
CaPro13	65	<0,5	2419	14,0
CaPro14	51	<0,5	1121	6,9
CaPro15	46	<0,5	566	3,8
CaPro16	58	<0,5	852	5,5
CaPro17	44	<0,5	401	2,8
CaPro18	62	<0,5	1039	6,5
CaPro19	56	<0,5	983	6,2
CaPro20	70	<0,5	601	4,0
CaPro21	55	<0,5	954	6,0
CaPro22	43	<0,5	595	4,0
CaPro23	43	<0,5	680	4,5
CaPro24	55	<0,5	1324	8,1
CaPro25	40	<0,5	564	3,8
CaPro26	45	<0,5	758	4,9
CaPro27	78	<0,5	3106	17,9
CaPro28	60	<0,5	205	1,5
CaPro29	57	<0,5	1583	9,5
CaPro30	63	<0,5	1583	9,5
CaPro31	85	<0,5	583	3,9
CaPro32	47	<0,5	703	4,6
CaPro33	50	<0,5	331	2,3
CaPro34	43	<0,5	361	2,5

ES 2 764 379 T3

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
CaPro35	46	<0,5	1316	8,0
CaPro36	42	<0,5	513	3,5
CaPro37	52	<0,5	872	5,6
CaPro38	36	<0,5	100	0,6
CaPro39	44	<0,5	598	4,0
CaPro40	33	<0,5	643	4,3
CaPro41	93	<0,5	2891	16,7
CaPro42	54	<0,5	141	1,0
CaPro43	54	<0,5	829	5,3
CaPro44	41	<0,5	761	4,9
CaPro45	56	<0,5	742	4,8
CaPro46	53	<0,5	1148	7,1
CaPro47	44	<0,5	382	2,7
CaPro48	48	<0,5	490	3,3
CaPro49	72	<0,5	1422	8,6
CaPro50	47	<0,5	535	3,6
CaPro51	88	<0,5	1414	8,5
CaPro52	72	<0,5	2866	16,5
CaPro53	43	<0,5	315	2,2
CaPro54	83	<0,5	1777	10,5
CaPro55	53	<0,5	1315	8,0
CaPro56	48	<0,5	588	3,9

5 Es posible medir las concentraciones séricas de ANXA3 del orden de ng/mL y de la decena de ng/mL utilizando la valoración por ELISA con TGC44/13A12G4H2 (grupo 1). Sorprendentemente, las señales obtenidas en las mismas muestras séricas con la valoración con TGC44/5C5B10 (grupo 2) son muy débiles y casi indistinguibles del ruido de fondo. Además, una curva de calibración utilizando un modelo 4-PL no permitió transformar estas señales en concentración, por esta razón la concentración se recoge como «<0,5 ng/mL» en la Tabla. 4, que es el límite de cuantificación de la valoración en las condiciones de utilización aquí especificadas. La curva de calibración obtenida con la ANXA3 humana natural purificada indica que la valoración con TGC44/5C5B10 tiene la capacidad de detectar la molécula cuando su concentración es del orden de ng/mL. Pero a pesar de una sensibilidad analítica (límite de 10 cuantificación de aproximadamente 0,5 ng/mL) y una especificidad analítica satisfactoria (véase el ejemplo 3), la valoración con TGC44/5C5B10 no permite valorar la ANXA3 presente en el medio biológico complejo que es el suero

15 Estos resultados son extremadamente sorprendentes y ponen de manifiesto una complejidad de la ANXA3 sérica hasta ahora insospechada. La diferencia entre los dos ensayos ELISA proviene del anticuerpo de detección. En efecto, el anticuerpo monoclonal 5C5B10 permite detectar la ANXA3 purificada capturada por TGC44, pero no la ANXA3 capturada directamente del suero por TGC44. El anticuerpo 13A12GH2 (y también el anticuerpo 1F10A6) permite a su vez detectar la ANXA3 capturada, ya se trate de la proteína purificada o de la proteína presente en el suero.

Ejemplo 2: Detección de la anexina A3 humana por ELISA en el suero de pacientes que tienen un cáncer colorrectal

Se recogió sangre completa de 39 sujetos utilizando tubos BD Vacutainer® (BD, Cat No. 367614) y se trató según las instrucciones del fabricante para obtener suero. Estos 39 sujetos tenían cáncer colorrectal comprobado (CCR), cuyo diagnóstico fue confirmado por examen histológico en muestras quirúrgicas. La ANXA3 contenida en estas 39 muestras de suero se cuantificó con una valoración por ELISA del grupo 1 (captura con TGC44, detección con 13A12G4H2) y una valoración por ELISA del grupo 2 (captura con TGC44, detección con 5C5B10). Como indicación, los anticuerpos de detección biotinilados se diluyeron a 0,15 µg/mL para el anticuerpo monoclonal 5C5B10 y a 2 ng/mL para el anticuerpo monoclonal 13A12G4H2. Para cada valoración por ELISA, se estableció una curva de calibración valorando un intervalo de concentración de la proteína anexina A3 humana natural purificada (Arodia). La curva de calibración se trazó representando en abscisas la concentración y en ordenadas la señal medida por VIDAS® en RFV. La concentración de ANXA3 presente en la muestra sérica se calculó, cuando fue posible, interpolando la concentración correspondiente a la señal de RFV leída por VIDAS®, usando modelos matemáticos de regresión no lineal como un polinomio de tercer orden o un modelo 4-PL, bien conocido por los expertos en la técnica. Los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
CCR01	59	<0,5	5358	20,5
CCR02	20	<0,5	889	3,9
CCR03	79	<0,5	3648	13,1
CCR04	289	0,9	2120	7,9
CCR05	68	<0,5	1526	6,0
CCR06	49	<0,5	1127	4,7
CCR07	196	0,5	809	3,6
CCR08	24	<0,5	346	1,8
CCR09	86	<0,5	3692	13,3
CCR10	58	<0,5	2806	10,2
CCR11	77	<0,5	750	3,4
CCR12	46	<0,5	1533	6,0
CCR13	102	<0,5	210	1,1
CCR14	42	<0,5	2338	8,6
CCR15	149	<0,5	5744	22,5
CCR16	32	<0,5	141	0,7
CCR17	98	<0,5	1327	5,4
CCR18	114	<0,5	4228	15,4
CCR19	69	<0,5	4568	16,8
CCR20	161	<0,5	3071	11,1
CCR21	65	<0,5	1469	5,8
CCR22	40	<0,5	764	3,5
CCR23	106	<0,5	1983	7,5
CCR24	53	<0,5	5427	20,8
CCR25	48	<0,5	2743	10,0

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
CCR26	136	<0,5	2445	9,0
CCR27	238	0,7	1382	5,5
CCR28	38	<0,5	1221	5,0
CCR29	33	<0,5	1604	6,3
CCR30	85	<0,5	3063	11,0
CCR31	46	<0,5	2176	8,1
CCR32	42	<0,5	1004	4,3
CCR33	92	<0,5	2383	8,8
CCR34	35	<0,5	1567	6,1
CCR35	88	<0,5	620	2,9
CCR36	166	<0,5	6897	30,3

5 En el suero de pacientes que tenían cáncer colorrectal, fue posible detectar y cuantificar la anexina A3 utilizando la valoración por ELISA con TGC44/13A12G4H2 (grupo 1). La valoración por ELISA con TGC44/5C5B10 (grupo 2) proporcionó señales muy débiles, inferiores o en el límite de lo que es cuantificable. Por lo tanto, no fue posible utilizar el formato TGC44/5C5B10 para cuantificar la anexina A3 presente en el suero de pacientes que tenían un cáncer colorrectal.

Ejemplo 3: Detección de la anexina humana A3 por ELISA en el suero de pacientes que tienen un cáncer de pulmón

10 Las valoraciones de anexina A3 se realizaron en muestras de suero tomadas de 33 pacientes tenían cáncer broncopulmonar confirmado (CaPou) según las modalidades especificadas en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
CaPou01	235	0,7	2347	8,7
CaPou02	619	2,0	928	4,0
CaPou03	1219	4,1	1453	5,8
CaPou04	58	<0,5	729	3,3
CaPou05	253	0,7	5505	21,2
CaPou06	127	<0,5	514	2,5
CaPou07	127	<0,5	4433	16,2
CaPou08	320	1,0	2953	10,7
CaPou09	223	0,6	6373	26,4
CaPou10	329	1,0	9056	61,0
CaPou11	864	2,9	7703	37,9
CaPou12	125	<0,5	3115	11,2

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
CaPou13	354	1,1	8069	42,4
CaPou14	385	1,2	8268	45,3
CaPou15	428	1,4	8060	42,3
CaPou16	333	1,0	4396	16,1
CaPou17	185	<0,5	1770	6,8
CaPou18	670	2,2	1278	5,2
CaPou19	206	0,6	5219	19,8
CaPou20	40	<0,5	615	2,9
CaPou21	330	1,0	6404	26,6
CaPou22	110	<0,5	860	3,8
CaPou23	561	1,8	932	4,0
CaPou24	50	<0,5	573	2,7
CaPou25	166	<0,5	1087	4,6
CaPou26	49	<0,5	844	3,7
CaPou27	82	<0,5	534	2,6
CaPou28	97	<0,5	1288	5,2
CaPou29	121	<0,5	652	3,0
CaPou30	131	<0,5	2969	10,7
CaPou31	99	<0,5	503	2,5
CaPou32	207	0,6	1668	6,5
CaPou33	210	0,6	3770	13,6

En el suero de pacientes que tenían cáncer broncopulmonar, fue posible detectar y cuantificar la anexina A3 utilizando la valoración por ELISA con TGC44/13A12G4H2 (grupo 1). Las concentraciones obtenidas en esta serie de pacientes variaban de 2,5 a 61 ng/mL. La valoración por ELISA con TGC44/5C5B10 (grupo 2) proporcionó señales mucho más débiles, con 15 muestras de 33 para las cuales la concentración no era cuantificable por ser demasiado baja. En esta serie de pacientes, el formato TGC44/5C5B10 proporciona concentraciones de alrededor de 1-2 ng/mL, muchos más bajas en comparación con las concentraciones obtenidas con el formato TGC44/13A12G4H2. Por lo tanto, no fue posible utilizar el formato TGC44/5C5B10 para cuantificar la anexina A3 presente en el suero de pacientes que tenían un cáncer de pulmón.

10 **Ejemplo 4: Detección de la anexina A3 humana por ELISA en el suero de pacientes que tienen una patología inflamatoria crónica**

Las valoraciones de la anexina A3 se realizaron en muestras de suero tomadas de 10 pacientes que tenían una poliartritis reumatoide (AR, enfermedad degenerativa inflamatoria crónica de las articulaciones) y en 21 pacientes que tenían la enfermedad de Crohn (MC, enfermedad inflamatoria intestinal crónica) según las modalidades especificadas en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
PR01	182	<0,5	3060	11,0
PR02	596	2,0	6323	26,1
PR03	577	1,9	4358	15,9
PR04	497	1,6	2482	9,1
PR05	540	1,8	4862	18,1
PR06	336	1,1	3226	11,6
PR07	749	2,5	6067	24,4
PR08	248	0,7	5669	22,1
PR09	688	2,3	8630	51,4
PR10	285	0,9	6369	26,4
MC01	77	<0,5	2279	8,4
MC02	101	<0,5	4034	14,6
MC03	47	<0,5	7029	31,4
MC04	165	<0,5	4575	16,8
MC05	85	<0,5	1947	7,4
MC06	64	<0,5	3924	14,2
MC07	96	<0,5	4267	15,5
MC08	97	<0,5	1797	6,9
MC09	197	0,5	5052	19,0
MC10	32	<0,5	1004	4,3
MC11	246	0,7	3095	11,2
MC12	99	<0,5	2972	10,7
MC13	52	<0,5	3938	14,2
MC14	158	<0,5	7637	37,2
MC15	297	0,9	1640	6,4
MC16	104	<0,5	7952	40,9
MC17	254	0,7	2510	9,2
MC18	58	<0,5	2570	9,4
MC19	46	<0,5	3027	10,9
MC20	41	<0,5	1947	7,4
MC21	129	<0,5	3320	11,9

En el suero de pacientes que tenían una poliartritis reumatoide o la enfermedad de Crohn, fue posible detectar y cuantificar la anexina A3 utilizando la valoración por ELISA con TGC44/13A12G4H2 (grupo 1). Las concentraciones obtenidas en esta serie de pacientes variaban entre 4,3 y 51,4 ng/mL. La valoración por ELISA con TGC44/5C5B10 (grupo 2) proporcionó señales mucho más débiles, con 18 muestras de 31 en las que la concentración no era

cuantificable por ser demasiado baja. En esta serie de pacientes, las concentraciones obtenidas con el formato TGC44/5C5B10 no superaron 2,5 ng/mL, mucho más bajas en comparación con las concentraciones obtenidas con el formato TGC44/13A12G4H2. Por lo tanto, no fue posible utilizar el formato TGC44/5C5B10 para cuantificar la anexina A3 presente en el suero de pacientes que tenían una enfermedad inflamatoria crónica.

5 Ejemplo 5: Detección de la anexina A3 humana por ELISA en el suero de pacientes con riesgo de septicemia

Las valoraciones de la anexina A3 se realizaron en muestras de suero tomadas de 24 pacientes con riesgo de septicemia de acuerdo con las modalidades especificadas en el Ejemplo 2. La procalcitonina (PCT) es un marcador específico y temprano de infección bacteriana. En infecciones localizadas, el nivel de PCT puede alcanzar 0,1 ng/mL y exceder 1-2 ng/mL en infecciones generalizadas. Los sueros incluidos en la serie que se muestra en la Tabla 8 tenían niveles de PCT comprendidos entre 0,3 y 10,3 ng/mL (niveles determinados con el kit PCT KRYPTOR™ de BRAHMS™).

Tabla 8

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
PCT01	176	<0,5	370	1,9
PCT02	352	1,1	3786	13,6
PCT03	225	0,6	902	3,9
PCT04	2630	9,1	7797	39,0
PCT05	719	2,4	5204	19,7
PCT06	1244	4,2	5574	21,6
PCT07	534	1,8	5773	22,7
PCT08	137	<0,5	1681	6,5
PCT09	1365	4,6	9101	62,2
PCT10	815	2,7	8800	54,9
PCT11	563	1,9	6926	30,5
PCT12	331	1,0	6579	27,8
PCT13	405	1,3	2054	7,7
PCT14	458	1,5	3276	11,8
PCT15	2003	6,8	5609	21,8
PCT16	303	0,9	3976	14,4
PCT17	218	0,6	3298	11,9
PCT18	738	2,5	7627	37,1
PCT19	465	1,5	7374	34,5
PCT20	527	1,7	798	3,6
PCT21	236	0,7	1568	6,1
PCT22	200	0,5	1876	7,1
PCT23	601	2,0	5755	22,6
PCT24	3405	12,3	9227	65,8

15 En el suero de pacientes que tenían una infección bacteriana, fue posible detectar y cuantificar la anexina A3 utilizando la valoración por ELISA con TGC44/13A12G4H2 (grupo 1). Las concentraciones obtenidas en esta serie de pacientes variaban de 1,9 a 65,8 ng/mL. La valoración por ELISA con TGC44/5C5B10 (grupo 2) proporcionó

señales mucho más débiles y las concentraciones permanecían bajas con relación a las concentraciones obtenidas con el formato TGC44/13A12G4H2. No parece útil emplear el formato TGC44/5C5B10 para cuantificar la anexina A3 presente en el suero de pacientes que tenían riesgo de septicemia.

Ejemplo 6: Detección de la anexina A3 humana por ELISA en el suero de pacientes que tienen diabetes

- 5 Las valoraciones de la anexina A3 se realizaron en muestras de suero tomadas de 6 pacientes con diabetes, de acuerdo con las modalidades especificadas en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Código de la muestra	Valoración con TGC44/5C5B10		Valoración con TGC44/13A12G4H2	
	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)	Señal (RFV)	Concentración (ng/mL)
Dia01	51	<0,5	444	2,2
Dia02	231	0,7	1664	6,5
Dia03	44	<0,5	585	2,8
Dia04	171	<0,5	3263	11,7
Dia05	213	0,6	3495	12,6
Dia06	289	0,9	2564	9,4

- 10 En el suero de pacientes que tenían diabetes, fue posible detectar y cuantificar la anexina A3 utilizando la valoración por ELISA con TGC44/13A12G4H2 (grupo 1). La valoración por ELISA con TGC44/5C5B10 (grupo 2) proporcionó señales muy débiles, inferiores o en el límite de lo que es cuantificable. Por lo tanto, no fue posible utilizar el formato TGC44/ 5C5B10 para cuantificar la anexina A3 presente en el suero de pacientes que tenían diabetes.

Ejemplo 7: Determinación de epítomos reconocidos por anticuerpos monoclonales anti-ANXA3

- 15 **Expresión de los cuatro dominios repetidos («*annexin repeat*» en inglés) de la anexina A3 humana en forma recombinante y determinación de los dominios repetidos reconocidos por los anticuerpos monoclonales.**

20 Como todos los miembros de la familia de las anexinas, la anexina A3 contiene en su secuencia proteica dominios repetidos llamados «*annexin repeat*». Estos dominios repetidos son cuatro y caracterizan a la familia. Con el fin de determinar el dominio repetido reconocido por cada uno de los anticuerpos monoclonales, estos dominios se expresaron en forma recombinante. Se añadió una secuencia de 8 histidinas a la parte N-terminal de cada dominio para permitir la purificación por cromatografía de afinidad metal-quelato. La Tabla 10 recoge las secuencias proteicas de las construcciones de recombinantes que permiten expresar cada uno de los dominios repetidos de forma aislada.

Tabla 10

Dominio	Real ^a	Expresado ^b	Secuencia proteica
D1	27-87	19-89	MGHHHHHHHHSPSVDAEAIQKAIRGIGTDEKMLISILTERSNAQRQLIVKEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHLMVALVT (SEQ ID NO: 6)
D2	99-159	92-160	MGHHHHHHHHAVFDAQQLKKSMMKGAGTNEDALIEILTTRTSRQMKDISQAYYTVYKSLGDDISSETSGDFRKALLTLA (SEQ ID NO: 7)
D3	183-243	171-245	MGHHHHHHHHHDEHLAKQDAQILYKAGENRWGTDEDKFTEILCLRSFPQLKLTDFEYRNISQKDIVDSIKGELSGHFEDLLLAIVN (SEQ ID NO: 8)
D4	258-318	252-323	MGHHHHHHHHHAFLAERLHRALKGIGTDEFTLNRIMVSRSEIDLLDIRTEFKKHYGYSLYSAIKSDTSGDYEITLLKICGGDD (SEQ ID NO: 9)

Dominio	Real ^a	Expresado ^b	Secuencia proteica
^a Real: Extensión del dominio repetido, del primero al último aminoácido, según la base de datos UniProtKB (http://www.uniprot.org). ^b Expresado: Extensión de la construcción que contiene el dominio repetido, numeración de los aminoácidos según UniProtKB. Las construcciones contienen algunos aminoácidos suplementarios de los lados N y C terminales del dominio, para no interrumpir las hélices alfa y permitir que se formen.			

Las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes a las secuencias proteicas de los dominios D1, D2, D3 y D4 fueron obtenidas por síntesis química por la sociedad Genearth. Estas secuencias nucleicas se optimizaron para promover la expresión de proteínas en *Escherichia coli*. Los fragmentos de ADN se clonaron entre los sitios Nco I y Xba I del vector de expresión procariota pMRCH79 (derivado de pMR78, bioMérieux). Los plásmidos así obtenidos se transformaron en las bacterias BL21 (DE3) (Stratagene). Los cultivos para producir los diferentes dominios se llevaron a cabo a 37°C con agitación en medio 2-YT (Invitrogen). La inducción se realizó con IPTG 0,5 mM (isopropil-beta-1-tiogalactosidasa). Los sedimentos bacterianos se recogieron directamente en el tampón de muestra de los geles NuPAGE Novex (Invitrogen) siguiendo el procedimiento proporcionado con los geles en condiciones reducidas. La separación de las proteínas se realizó en el gel NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12%. El análisis por transferencia de Western de la reactividad de los anticuerpos monoclonales para los diferentes dominios de la anexina A3 se llevó a cabo utilizando un sustrato quimioluminiscente, según el procedimiento descrito por ejemplo en la solicitud de patente WO 2009/019365, bien conocido por la persona experta en la técnica. Los anticuerpos de ensayo se utilizaron a una dilución de 10 µg/mL. El tiempo de exposición fue de 100 segundos a menos que se indique lo contrario.

Cada anticuerpo anti-ANXA3 se analizó con los recombinantes que expresaban los 4 dominios repetidos de ANXA3 humana; los resultados de este análisis por transferencia de Western se presentan en la Figura 3. Los anticuerpos monoclonales TGC42, TGC43, TGC44 y 5C5B10 son específicos para el dominio D1. Los anticuerpos monoclonales 13A12G4H2 y 1F10A6 están dirigidos contra el dominio D4. En cuanto a los anticuerpos 9C6D4 y 6D9D10, no reconocían ninguno de los 4 dominios repetidos, lo que probablemente indica que sus epítomos se encuentran fuera de los dominios repetidos de ANXA3.

Análisis fino de los epítomos reconocidos por los anticuerpos anti-ANXA3

La determinación de los epítomos se efectuó con la técnica Spotscan de acuerdo con Frank et Döring [24], que se describe en detalle en la solicitud de patente WO 2009/019365. Para este fin, la totalidad de la secuencia proteica de la anexina A3 se reprodujo sobre una membrana de nitrocelulosa en forma de péptidos de 12 aminoácidos superpuestos, desplazados en 2 aminoácidos. Luego, en una segunda síntesis, la secuencia de ANXA3 se reprodujo de forma péptidos de 15 aminoácidos superpuestos, desplazados en un aminoácido. La inmunoreactividad de estas membranas de péptidos superpuestos se analizó con los anticuerpos anti-ANXA3.

De este modo fue posible delimitar de forma más fina los epítomos de 5 anticuerpos monoclonales anti-ANXA3 entre los 8 estudiados. Los epítomos deducidos de la comparación de las secuencias de los péptidos superpuestos reconocidos se resumen en la Tabla 11. El epítomo mínimo es la secuencia mínima necesaria para tener 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, incluido o idéntico al epítomo mínimo. Los resultados obtenidos confirman que TGC42 y TGC43 están bien dirigidos contra un único epítomo, lo que está descrito inicialmente en la solicitud WO 2010/034825. Sorprendentemente, el anticuerpo 5C5B10 define un nuevo epítomo que no había sido descrito en la técnica anterior. Los anticuerpos 6D9D10 y 9C6D4 son específicos del extremo N-terminal de la proteína, como el anticuerpo monoclonal TGC7 de la solicitud WO 2007/141043. Los anticuerpos monoclonales TGC44, 13A12G4H2 y 1F10A6 no muestran ninguna reactividad en Spotscan, incluso en una membrana que lleve péptidos con una longitud de 20 aminoácidos. Probablemente tienen epítomos conformacionales o al menos semi-conformacionales cuyas estructuras no son suficientemente bien reproducidas por péptidos de síntesis.

Tabla 11

Anticuerpos	Dominio	Epítomo óptimo ^a	Epítomo mínimo ^b
TGC42	D1	SNAQRQLIVKEYQAAYG (49-65) (SEQ ID NO: 10)	LIVKEYQAAYG (55-65) (SEQ ID NO: 11)
TGC43	D1	IVKEYQAAYGKE (56-67) (SEQ ID NO: 12)	KEYQAAYG (58-65) (SEQ ID NO: 13)

Anticuerpos	Dominio	Epítipo óptimo ^a	Epítipo mínimo ^b
5C5B10	D1	DLSGHFEHL (75-83) (SEQ ID NO: 14)	LSGHFEH (76-82) (SEQ ID NO: 15)
6D9D10	N-terminal	ASIWVGHRGTVRDYPDFSPS (2-21) (SEQ ID NO: 16)	SIWVGHRGTVRDYPDFSP (3-20) (SEQ ID NO: 17)
9C6D4	N-terminal	YPDF (15-18) (SEQ ID NO: 18)	YPDF (15-18) SEQ ID NO: 18)

^aEpítipo óptimo: Secuencia ideal que permite el mejor reconocimiento posible del anticuerpo (incluido o idéntico al epítipo mínimo).

^bEpítipo mínimo: Secuencia mínima necesaria para tener un reconocimiento del anticuerpo (señal más o menos intensa).

Localización precisa del epítipo del anticuerpo TGC44 por la técnica Novatope

El sistema Novatope (Merck, Cat. No. 69279) es una tecnología que permite el análisis de una proteína con el fin de seleccionar dominios que contienen epítipos. El método se basa en la creación de un banco de clones bacterianos, cada uno de los cuales expresa un fragmento de la proteína, cortado al azar. Estos clones se analizan por inmunorreveado con el anticuerpo que se va a caracterizar. La secuenciación de ADN de los clones positivos permite deducir la secuencia proteica de un fragmento que contiene el epítipo. La técnica se aplicó siguiendo el procedimiento proporcionado con el kit.

Así, se pudieron aislar y secuenciar dos clones que reaccionan con el anticuerpo TGC44. El clon 2J7 expresa la secuencia KEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHLMVALVTPPAVFD (SEQ ID NO: 19) que corresponde a los residuos 58-95 de la ANXA3. El clon 2Z13 expresa la secuencia QKAIRGIGTDEKMLISILTERSNAQRQLIVKEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHL (SEQ ID NO: 20) que corresponde a los residuos 28-83 de la ANXA3. La parte común entre las secuencias de estos dos clones son los residuos 58-83 de la anexina A3, es decir, la secuencia KEYQAAYGKELKDDLKGDLSGHFEHL (SEQ ID NO: 21). Además, los anticuerpos TGC44 y 5C5B10 al ser complementarios (véase el Ejemplo 1), sus dos epítipos no pueden solaparse, por lo tanto, se puede retirar los aminoácidos correspondientes al epítipo del anticuerpo 5C5B10 o sea DLSGHFEHL (75-83) (SEC ID: 14). Por lo tanto, el epítipo del anticuerpo TGC44 está comprendido en la secuencia KEYQAAYGKELKDDLKG (58-74) (SEQ ID NO: 22). Se trata por tanto de la misma región que la reconocida por TGC42 y TGC43. Por el contrario, el hecho de que el anticuerpo TGC44 no presente reactividad en Spotscan indica una restricción conformacional para el reconocimiento. TGC44 es capaz de fijarse a su epítipo solo cuando la secuencia KEYQAAYGKELKDDLKG (58-74) (SEQ ID NO: 22) está fusionada en el lado N-terminal con una secuencia larga de al menos 30 residuos. Por lo tanto, el dominio repetido recombinante D1, cuya secuencia se identifica en la SEQ ID NO: 6, los clones 2J7 y 2Z13 fusionados a una proteína portadora o incluso el fragmento recombinante vANA-7 descrito en la solicitud WO 2010/034825 son todos reconocidos por el clon TGC44. A la inversa, no es reconocido el fragmento recombinante vANA-3, que carece de los 34 primeros aminoácidos N-terminales (Figura 4).

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

El experimento presentado en la Figura 3 muestra que los epítipos de los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6 están contenidos en el dominio D4 de la anexina A3. Los inventores construyeron por mutagénesis dirigida 12 proteínas recombinantes para mejorar el mapeo de los anticuerpos dirigidos contra el dominio D4. Se trata de la secuencia completa de la ANXA3 natural madura (aa 2-323), fusionada en el lado N-terminal a una etiqueta de histidina (secuencia no mutada). Se utilizó la mutagénesis por PCR con el fin introducir mutaciones de alanina en las posiciones 253, 257, 260, 263, 265, 268, 270, 274, 306, 311 y 317 de la secuencia proteica (GeneArt Mutagenesis Service, Invitrogen). Todos estos fragmentos de ADN se clonaron en el vector pMRCH79 (que se deriva del vector pMR78), y luego se transformaron en las bacterias BL21 (DE3). La producción y la purificación de las proteínas se llevaron a cabo según los métodos con las técnicas bien conocidos por los expertos en la técnica y que han sido citado al comienzo de este ejemplo.

Estas 12 proteínas (11 mutantes y 1 de control no mutado) se utilizaron luego para evaluar la capacidad de fijación de los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6 en un ELISA con formato sándwich, utilizando el anticuerpo TGC44 en captura. Se utiliza como control 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. Los resultados se muestran en la Figura 5. El gráfico representa la «*signal fold change*» (en ordenadas) de cada mutación (en abscisas). El «*signal fold change*» corresponde al \log_2 (señal de proteína mutada/señal de proteína no mutada). Cuanto mayor sea el valor absoluto del «*signal fold change*», más mutaciones para las que se observa esta variación afectan a la fijación del anticuerpo. Así, para 5C5B10, el «*signal fold change*» siempre está alrededor de 0, lo que indica que ninguna de las mutaciones

analizadas perturba la fijación de este anticuerpo monoclonal. Por el contrario, para 13A12G4H2 y 1F10A6, fue posible identificar aminoácidos cuya mutación impide o perturba la fijación de manera muy significativa. 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. Los inventores pudieron llegar a la conclusión que los aminoácidos 260, 263, 265 y 306 de la ANXA3 pertenecían al epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales 13A12G4H2 y 1F10A6, siendo los dos residuos más importantes en la interacción antígeno-anticuerpo la lisina de la posición 263 y el ácido aspártico de la posición 306.

Determinación de los aminoácidos esenciales en el primer dominio repetido de la anexina A3 humana para el reconocimiento por los anticuerpos 5C5B10 et TGC43

Con el fin de determinar los aminoácidos esenciales de los epítipos incluidos en D1 para el reconocimiento por los anticuerpos 5C5B10 y TGC43, se utilizó entonces la técnica llamada «ALAScan». Esta técnica «ALAScan» consiste, durante una síntesis de péptidos, en reemplazar sucesivamente los aminoácidos contenidos en un epítipo por un residuo de alanina. Por lo tanto, esta técnica permite determinar los aminoácidos esenciales para el reconocimiento del epítipo por un anticuerpo dado. Cuando el aminoácido es estrictamente necesario para la interacción con el anticuerpo, su reemplazo por una alanina provoca la desaparición de la inmunorreactividad del péptido. Cuando el aminoácido es menos importante para dicha interacción con el anticuerpo, la inmunorreactividad disminuye ligeramente o permanece inalterada. Esta técnica ha sido descrita por Geysen et al. en 1987 [26] y puede ampliarse reemplazando cada aminoácido por los otros 19.

Por lo tanto, para determinar los aminoácidos esenciales para el reconocimiento del anticuerpo 5C5B10 mencionado anteriormente, la secuencia óptima de consenso del epítipo, tal como se muestra en la Tabla 11 anterior (SEQ ID NO: 14), «alargada» por uno o dos aminoácidos a cada lado de esta secuencia, se sintetizó en la membrana reemplazando sucesivamente cada aminoácido por una alanina. El péptido de referencia utilizado es KGDLSGHFEHLM (residuos 73 a 84 de la anexina A3 humana). El resultado obtenido después del inmunorevelado de esta membrana por el anticuerpo 5C5B10 se presenta en la Figura 6a.

Este análisis muestra que el residuo primordial para el reconocimiento del epítipo DLSGHFEHL por el anticuerpo 5C5B10 es fenilalanina (F) en la posición 54 de la SEQ ID NO: 1. De hecho, hay una pérdida total de reconocimiento cuando es reemplazado por una alanina. Otros residuos que contribuyen de manera importante al reconocimiento son ácido aspártico (D), serina (S), histidina (H) y leucina (L) respectivamente en las posiciones 49, 51, 56 y 57 de la SEQ ID NO: 1. Es importante recordar que otras mutaciones, a saber, el reemplazo de un aminoácido por un aminoácido análogo, tendrán poco o ningún impacto sobre la reactividad antigénica. Por lo tanto, el reemplazo de ácido glutámico por ácido aspártico no debería en principio influir en la fijación del anticuerpo 5C5B10 a su epítipo incluido en el primer dominio repetido (D1) de la anexina A3.

Tal como se indicó anteriormente, la expresión «aminoácido análogo» se refiere a un aminoácido que, cuando reemplaza al aminoácido presente en el epítipo de interés, no causa ninguna destrucción de la reactividad antigénica de dicho epítipo con respecto al anticuerpo de interés.

Los análogos particularmente preferidos incluyen sustituciones de naturaleza conservadora, es decir, sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos. Hay varias clasificaciones de aminoácidos en una familia, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Por lo tanto, de acuerdo con un ejemplo de clasificación, los aminoácidos se pueden dividir en cuatro familias, a saber: (1) aminoácidos ácidos, tales como el ácido aspártico o el ácido glutámico, (2) aminoácidos básicos tales como lisina, arginina e histidina, (3) aminoácidos no polares tales como leucina, isoleucina y metionina y (4) aminoácidos no cargados polares, tales como glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede predecir razonablemente que un reemplazo aislado de un residuo de leucina por un residuo de isoleucina o valina, un residuo de aspartato por un residuo de glutamato, un residuo de treonina por un residuo de serina o un reemplazo conservador similar de un aminoácido por otro aminoácido que tenga una relación estructural, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Otro ejemplo de un método que permite predecir el efecto sobre la actividad biológica de una sustitución de aminoácidos ha sido descrito por Ng et Henikoff, 2001 [27].

De manera similar, los aminoácidos esenciales para el reconocimiento de anticuerpos TGC43 se determinaron usando el péptido de referencia VKEYQAAYGKEL (residuos 57-68 de la anexina A3). Las dos alaninas contenidas en esta secuencia fueron reemplazadas por glicinas durante la síntesis ALAScan. El resultado obtenido después del inmunorevelado de la membrana ALAScan por el anticuerpo TGC43 se muestra en la Figura 6b.

Este análisis muestra que 9 de cada 10 residuos son indispensables para el reconocimiento del epítipo KEYQAAYGKE. En efecto, hay una pérdida total o muy importante de reconocimiento cuando cada residuo de la secuencia se reemplaza por una alanina (o una glicina, si es el caso) con la excepción de la glutamina (Q) en la posición 35 de SEQ ID NO: 1. Como se mencionó anteriormente es importante recordar que otras mutaciones, a saber, el reemplazo de un aminoácido por un aminoácido análogo no tendrá poco o ningún impacto sobre la reactividad antigénica. Así, el reemplazo de los residuos de lisina por residuos de arginina, o incluso de ácido glutámico por ácido aspártico no debería influir en la fijación del anticuerpo TGC43

Ejemplo 8: Especificidad analítica de los formatos de valoración por ELISA con anti-ANXA3

Las anexinas son una familia de proteínas que comparten homologías de función y de secuencia. Una consulta con el programa BLAST realizada en la base de datos UniProtKB, reducida a las secuencias de origen humano, permitió identificar las proteínas que tenían la mayor homología de secuencia con la anexina A3. Estas son, en orden descendente de homología, la anexina A4, la anexina A11, la anexina A6 y la anexina A5.

En consecuencia, era importante demostrar la especificidad de las valoraciones por ELISA para la anexina A3 y la ausencia de reacción cruzada con otros miembros de la familia. Dado que los 3 anticuerpos TGC42, TGC43 y TGC44 están dirigidos contra el mismo epítipo, la valoración con TGC44/13A12G4H2 (denominada únicamente en lo sucesivo 13A12G4H2) se eligió como la valoración prototipo del grupo 1 definido en el Ejemplo 1. De la misma manera, la valoración con TGC44/5C5B10 (denominada únicamente en lo sucesivo 5C5B10) se eligió como valoración prototipo que representa el grupo 2. La ausencia de reactividad cruzada se analizó utilizando antígenos disponibles comercialmente obtenidos de Abnova™: anexina A1 (Cat No. H00000301-P01), anexina A2 (Cat No. H00000302-P01), anexina A4 (Cat No. H00000307-P01), anexina A5 (Cat No. H00000308-P01), anexina A6 (Cat No. H00000309-P01) y Anexina A11 (Cat No. H00000311-P01). La anexina A13 se expresó de forma recombinante en el laboratorio por clonación en el vector de expresión pMRCH79; fusionada con una etiqueta de histidina, y luego purificada por cromatografía de afinidad con metal-quelato. Las proteínas se diluyeron en tampón de pocillos X1 de VIDAS® a una concentración de 12,5 µg/mL para ELISA con TGC44/5C5B10 y a una concentración de 16 µg/mL para ELISA con TGC44/13A12G4H2. Los resultados se muestran en la Figura 7. Los dos formatos de ELISA con TGC44/13A12G4H2 y con TGC44/5C5B10 son los dos muy específicos para la anexina A3 y no muestran reactividad cruzada con otras anexinas analizadas.

Ejemplo 9: 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 a un biosensor (en lengua inglesa *sensor chip*) mientras que la otra especie implicada en la interacción está en un flujo continuo de tampón. Las mediciones por resonancia plasmónica de superficie se realizaron usando un Biacore T100. Los reactivos, que incluyen el *sensor chip* CM5, el anti-IgG de ratón, específica para el fragmento Fc, obtenido de conejo (RAM Fc), y el kit de acoplamiento a través de aminas para la inmovilización de los anticuerpos, se obtuvieron todos de GE-Healthcare Bioscience AB.

Para estudiar las características cinéticas de fijación de los anticuerpos anti-anexina A3, estos últimos se inmovilizaron por captura en el *sensor chip*, sobre el que el anticuerpo RAM Fc se había acoplado previamente de forma covalente. Los experimentos de fijación se realizaron en tampón, HEPES, a 25°C, con un caudal de 30 µL/min. La modificación de la señal de resonancia en RU (*Resonance Unit*) permite seguir en tiempo real la fijación y después la disociación de las biomoléculas en la superficie del biosensor. En un primer momento, el anticuerpo monoclonal que se iba a estudiar se inyectó en el canal 2 para obtener una señal de aproximadamente 250 RU. Posteriormente, se inyectó la anexina A3 (Arodia) en los canales 1 y 2. Los tiempos de asociación y disociación fueron respectivamente de 5 y 15 minutos. Después de medir las respuestas de resonancia, la superficie del biosensor se regeneró lavando con HCl 50 mM a 10 µL/min durante 120 segundos. Se repitió el mismo procedimiento de medición para cada dilución de la proteína anexina A3; en total, se analizaron 9 diferentes diluciones de la proteína comprendidas entre 0 y 64 nM. Los sensorogramas obtenidos se trazaron y analizaron con el programa informático Biacore T100, según el modelo de interacción 1:1. Las constantes cinéticas de asociación (Kon) y disociación (Koff) se midieron utilizando los anticuerpos a una concentración de 3 µg/mL, excepto para 13A12G4H2 y 1F10A6 que se utilizaron a 0,75 µg/mL para limitar el impacto del ruido de fondo. La afinidad, representada por la constante de disociación (Kd) se calculó ($Kd = Koff / Kon$).

Para cada anticuerpo anti-anexina A3, los gráficos que representan la señal de resonancia en función del tiempo se muestran en la Figura 8. Los valores medidos de las constantes de asociación y disociación, así como el valor calculado de las constantes de afinidad, se indican en la Tabla 12.

El conjunto de anticuerpos anti-ANXA3 estudiados presenta altas afinidades, con valores de Kd que varían de 10^{-9} a 5×10^{-10} M. Fue posible clasificar los anticuerpos en dos grupos distintos en función de su Kd. El primer grupo correspondiente a los anticuerpos 13A12G4H2, TGC42 y TGC44 cuya Kd es superior a 10^{-10} M, es el grupo de anticuerpos de muy alta afinidad. El segundo grupo correspondiente 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 anticuerpos de alta afinidad.

Los tres anticuerpos utilizados en captura, TGC42, TGC43 y TGC44, tienen constantes cinéticas de asociación equivalentes. El anticuerpo 13A12G4H2 tiene igualmente una constante cinética de asociación comparable. La constante cinética de asociación del anticuerpo 5C5B10 es aproximadamente 1 log menor que la del TGC44.

Con respecto a las constantes cinéticas de disociación, también es 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 se ha producido la fijación antígeno-anticuerpo, la anexina A3 es retenida por los anticuerpos de este grupo retienen y no se disocia. El segundo grupo

contiene TGC43 y 1F10A6; se caracteriza por una constante cinética de disociación más alta, del orden de 10^{-3} s^{-1} . Los anticuerpos de este grupo, incluso si logran fijarse a la anexina A3, se disocian mucho más rápidamente. Por lo tanto, aunque tienen constantes cinéticas de asociación comparables, TGC42 y TGC44 son mejores anticuerpos de captura que TGC43 para ser utilizados para el desarrollo de una valoración por ELISA.

5 Tabla 12

Anticuerpo fijado sobre el biosensor	Kon ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	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 10: Presencia de ANXA3 en los exosomas séricos del hombre

10 Los exosomas son vesículas con membrana de 40-100 nm de diámetro secretadas por diferentes tipos de células *in vivo*. Se encuentran en la sangre, la orina, los líquidos ascíticos malignos y contienen marcadores nucleicos y proteicos de células tumorales de las que se secretan.

15 Para detectar la presencia de ANXA3 exosomal en suero, se realizó un enriquecimiento de exosomas a partir de suero para 2 pacientes A y B afectados de tumores prostáticos, utilizando la solución de precipitación de exosomas ExoQuick (System Biosciences, Cat No. EXOQ20A-1), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada muestra de suero A y B, las proteínas aisladas por enriquecimiento exosomal se analizaron por migración en el gel SDS-PAGE al 10%. Después de la nueva puesta en suspensión del sedimento exosomal en tampón RIPA (G-Biosciences, Cat No. 786-489), una porción de ensayo correspondiente a 1/10 de la solución se calentó durante 4 minutos a 95°C en presencia de tampón de carga Laemmli 5X y luego se depositó sobre el gel en condiciones reductoras. El marcador de masa molecular de proteínas Precision Plus (Bio-Rad) se depositó simultáneamente sobre el gel como control de masa molecular. Para analizar la presencia específica del ANXA3 exosomal, se realizó una transferencia de Western según un protocolo estándar. El gel SDS-PAGE se transfirió a la membrana de PVDF (*iblot Gel Transfer Stacks PVDF*, Cat No. IB4010-02), la membrana se coloreó durante 1 minuto en solución de *amino-black* y luego se enjuagó con agua destilada.

25 Para el estudio, un anticuerpo monoclonal anti-CD63 (Santa Cruz, Cat No. SC-5275) dirigido contra el marcador proteico exosomal común tetraspanina CD63, y una mezcla de 3 anticuerpos monoclonales anti-ANXA3 (TGC44, 13A12G4H2, 5C5B10) se utilizaron en detección. La reacción inmunitaria se llevó a cabo por incubación de la membrana durante una noche a +4°C con agitación lenta en presencia de anticuerpos primarios diluidos en tampón TNT-leche al 5% a concentraciones de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para anti-CD63 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la mezcla de anticuerpos anti-ANXA3. Los complejos inmunitarios fueron revelados por un conjugado secundario de cabra anti-IgG de ratón AffiniPure conjugado a peroxidasa (H + L, Jackson Immunoresearch Cat No. 115-035-062) diluido 1:5000 en TNT-leche al 5% e incubado. 1 hora a temperatura ambiente. Las señales reveladas por "*enhanced chemiluminescence*" (ECL, Supersignal West substrate Pierce) se visualizaron en la plataforma Molecular Imager ChemiDoc XRS + (BioRad) con el programa informático Quantity One 4.6.9. Los resultados se muestran en la Figura 9. Muestran que es posible detectar la anexina A3 en los exosomas precipitados por ExoQuick del suero de pacientes.

35 Igualmente es posible valorar la anexina A3 después de la purificación de los exosomas. Para esto, se realizó en formato Luminex una adaptación de la valoración sándwich desarrollada en VIDAS® utilizando en captura el anticuerpo TGC44 y en detección el anticuerpo 13A12G4H2 biotinilado. La técnica permite a partir de microesferas en suspensión detectar y cuantificar varias biomoléculas en una misma muestra de bajo volumen con una alta sensibilidad.

40 Bolas magnéticas de 5,6 μm de diámetro, que presentan una dirección espectral basada en su contenido rojo/infrarrojo, sirvieron como soporte para la valoración. Se injertó una cantidad de 9 μg de anticuerpo de captura TGC44 en la superficie de las bolas magnéticas (Bio-Rad, Bio-Plex Pro Magnetic COOH Beads Amine Coupling Kit) según las instrucciones del proveedor.

45 La anexina A3 se valoró en el suero de 4 pacientes afectados de tumor de próstata antes y después del enriquecimiento exosomal (solución de precipitación ExoQuick). Para la valoración del suero, las muestras B, C, D, E se diluyeron 1/5 en tampón TBST. La valoración de la anexina A3 después del tratamiento del suero y la purificación de los exosomas se llevó a cabo a partir de 1/3 del sedimento exosomal recogido en agua destilada csp 100 μL . Las

- 5 muestras se incubaron en presencia de 5000 bolas acopladas al anticuerpo de captura en placa de 96 pocillos (Bio-Rad, Cat No. 171025001) durante 2 horas a 37°C, 650 rpm, protegidas de la luz. Entre cada etapa, los pocillos se lavaron 3 veces con TBST al 0,05%. La detección se llevó a cabo con 100 µL de anticuerpo secundario 13A12G4H2 biotinilado a una concentración de 0,005 µg/mL durante 1 hora a 37°C con agitación. El revelado del complejo inmunitario tuvo lugar por incubación de 100 µL de solución de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (RPE) a una concentración de 2 µg/mL (Dako) durante 30 minutos a 37°C con agitación. La etapa final consistía en volver a poner en suspensión los complejos inmunitarios en 100 µL de TBS para un análisis de fluorimetría de flujo realizado por el autómata Bio-Plex 200 (Bio-Rad). Cada bola se sometería a una doble excitación por un láser rojo (633 nm) para su identificación y un láser verde (532 nm) para la cuantificación del analito por medición del conjugado fluorescente.
- 10 Los resultados de la valoración directa en el suero y después del enriquecimiento en exosomas por el tratamiento ExoQuick se muestran en la Tabla 13 a continuación. Este experimento muestra que es posible valorar directamente la anexina A3 en exosomas purificados a partir del suero por el procedimiento de la invención.

Tabla 13

	Concentración de ANXA3 en ng/mL	
Suero	Valoración directa del suero	Valoración después del tratamiento con ExoQuick (enriquecimiento)
D	4,38	27,98
E	4,78	23,25
B	5,62	53,58
C	17,98	148,28

15 **Ejemplo 11: Reactividad antigénica conseguida entre las secuencias proteicas homólogas de los epítomos de diferentes mamíferos y ciertos anticuerpos anti-ANXA3 humana**

20 Como se muestra en la Tabla 1 y se representan en las Figuras 1a y 1b, las secuencias de los dominios repetidos primero y cuarto (respectivamente D1 y D4) de la anexina A3 están bien conservadas entre los principales mamíferos y presentan un alto porcentaje de identidad. Como resultado, los inventores han intentado predecir la reactividad antigénica entre los homólogos de los epítomos LIVKEYQAAYGKE y DLSGHFEHL de diferentes mamíferos y los anticuerpos TGC42, TGC43 y TGC44 por un lado y 5C5B10 por otro lado.

25 Como saben los expertos en la técnica, ciertas sustituciones de aminoácidos pueden influir, es decir, disminuir o aumentar la reactividad antigénica de un epítopo frente a un anticuerpo dado, mientras que la sustitución por otro aminoácido de la misma posición no tendrá influencia. La clasificación de los aminoácidos mencionados en la descripción, así como las matrices de sustitución, incluida por ejemplo la de Gonnet, [25], permiten predecir con posibilidades razonables de éxito el impacto que una determinada mutación puede tener en un sitio preciso de un epítopo.

30 Los datos experimentales de ALAScan presentados en el Ejemplo 7 permitieron identificar los aminoácidos directamente implicados en la interacción epítopo-anticuerpo para cada uno de los epítomos LIVKEYQAAYGKE y DLSGHFEHL. Del mismo modo, los datos de mutagénesis por PCR presentados en el mismo ejemplo permitieron determinar los residuos estrictamente necesarios para el reconocimiento del epítopo por los anticuerpos monoclonales 13A12G4H2 y 1F10A6, cuyo epítopo resulta ser igualmente el sitio de fijación primario del Ca²⁺ del dominio D4 de la anexina A3. A partir de estos datos experimentales y apoyándose en la enseñanza de las matrices de sustitución (tales como la de Gonnet), es posible predecir la reactividad antigénica entre los homólogos de los epítomos LIVKEYQAAYGKE y DLSGHFEHL en la anexinas A3 de otros mamíferos y los anticuerpos correspondientes que se fijan al primer dominio repetido de la anexina A3 humana. Estos análisis se presentan a continuación, respectivamente, en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14 - Secuencia del epítopo LIVKEYQAAYGKE de la anexina A3 de otros mamíferos y reconocimiento esperado por los anticuerpos TGC42, TGC43 et TGC44

Identificador	Secuencia	Reactividad esperada	Comentario
SP P12429 ANXA3_HUMAN	LIVKEYQAAYGKE	+	
SP O35639 ANXA3_MOUSE	LIVKQYQAAYEQE	-	
SP P14669 ANXA3_RAT	LIVKQYQEAYEQA	-	
SP Q3SWX7 ANXA3_BOVIN	LIAKEYQALCGKE	+/-	

Identificador	Secuencia	Reactividad esperada	Comentario
TR E2R0N3 E2R0N3_CANFA	LIVREYQAAYGKE	+	K y R son análogos
TR G1TEM7 G1TEM7_RABIT	LIVREYQAAYGKE	+	K y R son análogos
TR F6Z8Y2 F6Z8Y2_MACMU	LIVKEYQAAYGKE	+	
TR G3R3Y9 G3R3Y9_GORGO	LIVKEYQAAYGKE	+	

Tabla 15 – Secuencia del epítipo DLSGHFEHL de la anexina A3 de otros mamíferos y reconocimiento esperado por el anticuerpo 5C5B10

Identificador	Secuencia	Reactividad esperada	Comentario
SP P12429 ANXA3_HUMAN	DLSGHFEHL	+	
SP O35639 ANXA3_MOUSE	DLSGHFEHV	+	L y V son análogos
SP P14669 ANXA3_RAT	DLSGHFEHV	+	L y V son análogos
SP Q3SWX7 ANXA3_BOVIN	DLSGHFKHL	+	K reemplaza la E que no está implicada en la fijación
TR E2R0N3 E2R0N3_CANFA	DLSGHFKQL	+/-	
TR G1TEM7 G1TEM7_RABIT	DLSGHFEHL	+	
TR F6Z8Y2 F6Z8Y2_MACMU	DLSGHFEHL	+	
TR G3R3Y9 G3R3Y9_GORGO	DLSGHFEHL	+	

- 5 Con respecto al epítipo que corresponde al sitio de fijación del ion Ca^{2+} en el dominio D4 (epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales 13A12G4H2 y 1F10A6), la mutagénesis por PCR (véase el Ejemplo 7) permitió mostrar que la lisina (K) en la posición 263 era estrictamente necesaria para la interacción epítipo-anticuerpo. Este residuo se conserva en todas las secuencias presentadas en la Figura 1b, se encuentra en la posición 6 de la secuencia de aminoácidos del cuarto dominio repetido de la anexina A3 (dominio D4). El segundo residuo más importante es el ácido aspártico (D) en la posición 306 de la anexina A3. Está igualmente conservado en todas las secuencias que se muestran en la Figura 1b y se encuentra en la posición 49 de la secuencia de aminoácidos del cuarto dominio repetido de la anexina A3 (dominio D4). La conservación de estas dos posiciones permite predecir que los anticuerpos 13A12G4H2 y 1F10A6 podrán fijarse a todas las anexinas A3 de mamíferos presentadas en este alineamiento. Por el contrario, la arginina (R) en la posición 260 y la isoleucina (I) en la posición 265 no siempre se conservan. Los datos de mutagénesis por PCR muestran que estas posiciones también están implicadas en el reconocimiento, pero en menor grado (véase el Ejemplo 7). La señal de fijación del anticuerpo disminuye cuando estas posiciones son reemplazadas por una alanina, pero la fijación no se elimina por completo. Será posible compensar esta caída de la señal gracias a un aumento de la concentración de utilización de los anticuerpos de detección. Los anticuerpos descritos tienen una afinidad muy alta por la anexina A3 humana y, por lo tanto, se utilizan bastante diluidos en las valoraciones de la invención. Por ejemplo, el anticuerpo 13A12G4H2 se puede utilizar a una concentración en el intervalo de 1-20 pg/mL (concentración en el tampón conjugado X1 que también es el tampón de dilución de la muestra, dilución = 300 μ L de tampón conjugado + 150 μ L de muestra biológica). Para poder valorar las anexinas A3 de mamíferos que portan mutaciones en las posiciones 260 y 265, un experto en la técnica podrá determinar fácilmente una nueva concentración óptima de utilización del anticuerpo que puede ser 10, 100 o incluso 1000 veces mayor que cuando el objetivo de la valoración es la anexina A3 humana, permaneciendo siempre inferior a una concentración de aproximadamente 30 μ g /mL en el tampón conjugado X1.

Ejemplo 12: Reproducibilidad de las valoraciones con TGC44/13A12G4H2 y TGC44/5C5B10

El objetivo del experimento presentado en este ejemplo es estudiar una característica analítica importante de las valoraciones por ELISA con TGC44/13A12G4H2 y TGC44/5C5B10, a saber, la reproducibilidad. Este análisis se realizó utilizando muestras biológicas, es decir, suero u orina recogida justo después del tacto rectal (TR) (orina post-TR, también llamada «orina expresada») obtenida de pacientes afectados de patologías prostáticas (cáncer de próstata o hiperplasia benigna de la próstata), para acercarse lo más posible a las condiciones reales de uso de las valoraciones. La reproducibilidad de la valoración con TGC44/5C5B10 en muestras de suero no se estudió porque esta valoración no permite valorar la anexina A3 humana en suero.

35 Para cada valoración y cada tipo de muestra, se valoraron 5 muestras en 1 instrumento en 3 días, a razón de 2

series por día y 2 repeticiones por serie. Por lo tanto, había n = 12 repeticiones de la medición para cada muestra. El coeficiente de variación (CV) correspondiente a esta serie de 12 mediciones se calculó y se presenta en la Tabla 16 a continuación. Este coeficiente de variación es el indicador que permite juzgar la reproducibilidad de la medición: cuanto más pequeño sea el CV, más reproducible es la medición.

- 5 Este análisis necesita disponer de grandes volúmenes de muestras para poder realizar mediciones repetidas. La obtención de grandes volúmenes de suero es menos fácil en comparación con la orina. Por lo tanto, experimentos en orina se realizaron en orinas individuales, mientras que ciertos sueros se «agruparon» para obtener el volumen necesario.

Tabla 16 - Reproducibilidad de los ELISA con TGC44/13A12G4H2 y TGC44/5C5B10

TGC44/13A12G4H2 en orina post-TR		TGC44/13A12G4H2 en suero		TGC44/5C5B10 en orina post-TR	
Muestra	% de CV	Muestra	% de CV	Muestra	% de CV
50237	8	L02+L13	4	50222	15
10204	11	L04+L07	6	10204	9
30299	5	L01	6	50237	13
1001450	7	L41	4	1001450	14
1001425	7	N03+N05+N11	4	1001425	11

- 10 El ELISA con TGC44/13A12G4H2 posee buena reproducibilidad cuando se usa para la valoración de orina post-TR. En efecto, para las 5 muestras analizadas, los CV son inferiores al 15%, lo que representa el límite superior permitido. El ELISA con TGC44/13A12G4H2 tiene también una muy buena reproducibilidad para valorar sueros, mejor que en orina. Entre las muestras de suero analizadas, ninguna superó un CV del 6%. La valoración con TGC44/5C5B10 posee igualmente una reproducibilidad correcta en orina post-TR, aunque ligeramente inferior al ELISA con TGC44/13A12G4H2.

Referencias bibliográficas

1. Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome biology* 2004; 5: 219.

2. Barton GJ, Newman RH, Freemont PS, Crumpton MJ. Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *Eur J Biochem* 1991; 198: 749-760.

3. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiological reviews* 2002; 82: 331-371.

4. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2005; 6: 449-461.

5. Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin-actin interactions. *Traffic* 2004; 5: 571-576.

25 6. Rescher U, Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *Journal of cell science* 2004; 117: 2631-2639.

7. Harashima M, Niimi S, Koyanagi H et al. Change in annexin A3 expression by regulatory factors of hepatocyte growth in primary cultured rat hepatocytes. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2006; 29: 1339-1343.

30 8. Le Cabec V, Russo-Marie F, Maridonneau-Parini I. Differential expression of two forms of annexin 3 in human neutrophils and monocytes and along their differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 1471-1476.

9. Le Cabec V, 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* 1994; 303 (Pt 2): 481-487.

10. Bianchi C, Bombelli S, Raimondo F et al. 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: 1660-1670.

35 11. Tait JF, Sakata M, McMullen BA et al. Placental anticoagulant proteins: isolation and comparative characterization four members of the lipocortin family. *Biochemistry* 1988; 27: 6268-6276.

12. Ernst JD, Hoye E, Blackwood RA, Jaye D. Purification and characterization of an abundant cytosolic protein from human neutrophils that promotes Ca²⁺(+)-dependent aggregation of isolated specific granules. *The Journal of clinical investigation* 1990; 85: 1065-1071.

13. Chong KW, Chen MJ, Koay ES et al. Annexin A3 is associated with cell death in lactacystin-mediated neuronal injury. *Neuroscience letters* 2010; 485: 129-133.
14. Kollermann J, Schlomm T, Bang H et al. Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate cancer. *Eur Urol* 2008; 54: 1314-1323.
- 5 15. Wozny W, Schroer K, Schwall GP et al. Differential radioactive quantification of protein abundance ratios between benign and malignant prostate tissues: cancer association of annexin A3. *Proteomics* 2007; 7: 313-322.
16. Madoz-Gurpide J, Lopez-Serra P, Martinez-Torrecuadrada JL et al. Proteomics-based validation of genomic data: applications in colorectal cancer diagnosis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2006; 5: 1471-1483.
- 10 17. Marshall KW, Mohr S, Khettabi FE et al. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2010; 126: 1177-1186.
18. Liu YF, Xiao ZQ, Li MX et al. Quantitative proteome analysis reveals annexin A3 as a novel biomarker in lung adenocarcinoma. *The Journal of pathology* 2009; 217: 54-64.
19. Baine MJ, Chakraborty S, Smith LM et al. Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. *PLoS One* 2011; 6: e17014.
- 15 20. Jung EJ, Moon HG, Park ST et al. Decreased annexin A3 expression correlates with tumor progression in papillary thyroid cancer. *Proteomics. Clinical applications* 2010; 4: 528-537.
21. Wang XM, Wu TX, Hamza M et al. Rofecoxib modulates multiple gene expression pathways in a clinical model of acute inflammatory pain. *Pain* 2007; 128: 136-147.
- 20 22. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.
23. Kohler G, Howe SC, Milstein C. Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* 1976; 6: 292-295.
24. Frank R, Döring R. Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose papers discs as segmental solid synthesis. *Tetrahedron* 1988; 44: 6031-6040.
- 25 25. Gonnet G.H., Cohen M.A., Benner S.A.; "Exhaustive matching of the entire protein sequence database."; *Science* 256:1443-1445(1992).
26. Geysen MS, Rodda T, Mason TJ, Triubbick G, Schoofs P. Strategies of epitope analysis using synthetic peptide synthesis. *J. Immunol. Meth.* 1987. 102 : 259-265.
27. Ng et Henikoff, 2001, *Genome Res* 11: 863-874.
- 30 **Lista de secuencias**
- <110> bioMérieux et ProteoSys
- <120> Procedimiento de detección y/o de valoración de la anexina A3 de un mamífero en la sangre o en al menos uno de sus derivados
- <130> P124405.FR.01
- 35 <160> 50
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 61
- <212> PRT
- 40 <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 764 379 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

<210> 2
 <211> 61
 <212> PRT
 5 <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> 3
 <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

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

15 <210> 4
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 764 379 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

5 <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

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr

ES 2 764 379 T3

<220>

<223> D1 Recombinante

<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> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> D2 Recombinante

<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

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

- 15 <210> 8
- <211> 85
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> D3 Recombinante

<400> 8

ES 2 764 379 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

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> D4 Recombinante

<400> 9

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

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

10

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

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

15 <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

<210> 11

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Leu Ile Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <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
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Asp Leu Ser Gly His Phe Glu His Leu
 1 5
 20 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Leu Ser Gly His Phe Glu His
 25 1 5
 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <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
 <210> 17
 <211> 18
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Ser Ile Trp Val Gly His Arg Gly Thr Val Arg Asp Tyr Pro Asp Phe
 1 5 10 15
 Ser Pro
 <210> 18
 <211> 4
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

ES 2 764 379 T3

Tyr Pro Asp Phe
 1
 <210> 19
 <211> 38
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <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
 <211> 56
 10 <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
 <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
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 22
 Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys
 1 5 10 15
 25 Gly
 <210> 23
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 764 379 T3

<400> 23

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

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

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

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

<210> 24

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 24

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

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

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

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

<210> 25

10 <211> 61

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 25

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

15 <212> PRT

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

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

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

<210> 26

<211> 61

<212> PRT

20 <213> Canis familiaris

<400> 26

ES 2 764 379 T3

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

Ser Ile Leu Thr Glu Arg Thr Asn Ala Gln His Gln Leu Ile Val Arg
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 Lys Gln Leu Met Val Ala Leu
50 55 60

<210> 27

<211> 61

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 27

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

Ser Ile Leu Ala Glu Arg Ser Ser 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

<210> 28

<211> 61

<212> PRT

10 <213> *Macaca mulatta*

<400> 28

Ile Arg 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

<210> 29

<211> 61

<212> PRT

15 <213> *Gorilla gorilla*

<400> 29

ES 2 764 379 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

<210> 30

<211> 61

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 30

Leu His Gln Ala Leu Lys Gly Ala 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 His
 20 25 30

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

Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Arg Thr Val Leu Leu Lys Ile

50 55 60

10 <210> 31

<211> 61

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 31

Leu His Gln Ala Leu Lys Gly Ala 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 Arg
 20 25 30

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

15 Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Arg Thr Val Leu Leu Lys Ile
 50 55 60

<210> 32

<211> 61

<212> PRT

<213> Bos taurus

20 <400> 32

ES 2 764 379 T3

Leu Tyr Arg Ala Leu Lys Gly Ala 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 Ala
 20 25 30

Glu Phe Lys Lys Leu Ser 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

<210> 33

<211> 61

<212> PRT

5 <213> Canis familiaris

<400> 33

Leu His Gln Ala Leu Lys Gly Ala 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 Ala
 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 Leu Thr Leu Leu Lys Ile
 50 55 60

10 <210> 34

<211> 61

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 34

Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Gly Ala 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 Ala
 20 25 30

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

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

15 <210> 35

<211> 61

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

20 <400> 35

ES 2 764 379 T3

Leu His Arg Ala Leu Lys Gly Ala 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 Ile
 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

<210> 36

<211> 61

<212> PRT

5 <213> Gorilla gorilla

<400> 36

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> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> epítopo incluido en el seno del primer dominio repetido de la Anexina A3 de mamífero

<220>

<221> Xaa1

<222> (1)..(1)

20 <223> Xaa1 representa un resto serina, un resto treonina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto serina o un resto treonina

<220>

<221> Xaa2

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa2 representa un resto asparagina, un resto serina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto asparagina o un resto serina

<220>

<221> Xaa3

<222> (5)..(5)

30 <223> Xaa3 representa un resto arginina, un resto histidina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto arginina o un resto histidina

<220>

<221> Xaa4

<222> (6)..(6)

35 <223> Xaa4 representa un resto glutamina, un resto leucina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto glutamina o un resto leucina

<220>

- <221> Xaa5
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa5 representa un resto valina, un resto alanina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto valina o un resto alanina
- 5 <220>
 <221> Xaa6
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa6 representa un resto lisina, un resto arginina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto lisina o un resto arginina
- 10 <220>
 <221> Xaa7
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa7 representa un resto ácido glutámico, un resto glutamina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto ácido glutámico o un resto glutamina
- 15 <220>
 <221> Xaa8
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa8 representa un resto alanina, un resto ácido glutámico o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto alanina o un resto ácido glutámico
- 20 <220>
 <221> Xaa9
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa9 representa un resto alanina, un resto leucina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto alanina o un resto leucina
- 25 <220>
 <221> Xaa10
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa10 representa un resto tirosina, un resto cisteína o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto tirosina o un resto cisteína
- 30 <220>
 <221> Xaa11
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa11 representa un resto glicina, un resto ácido glutámico o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto glicina o un resto ácido glutámico
- 35 <400> 37
 Xaa Xaa Ala Gln Xaa Xaa Leu Ile Xaa Xaa Xaa Tyr Gln Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
- Xaa**
- <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
- 40 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> epítipo incluido en el seno del primer dominio repetido de la Anexina A3 de mamífero
- <220>
 <221> Xaa5
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa5 representa un resto valina, un resto alanina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto valina o un resto alanina
- 45 <220>
 <221> Xaa6
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa6 representa un resto lisina, un resto arginina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto lisina o un resto arginina
- 50 <220>

ES 2 764 379 T3

- <223> Xaa9 representa un resto alanina, un resto leucina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto alanina o un resto leucina
- <220>
<221> Xaa10
5 <222> (9)..(9)
<223> Xaa10 representa un resto tirosina, un resto cisteína o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto tirosina o un resto cisteína
- <220>
<221> Xaa11
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa11 representa un resto glicina, un resto ácido glutámico o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto glicina o un resto ácido glutámico
- <220>
<221> Xaa12
15 <222> (11)..(11)
<223> Xaa12 representa un resto lisina, un resto glutamina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto lisina o un resto glutamina
- <220>
<221> Xaa13
20 <222> (12)..(12)
<223> Xaa13 representa un resto ácido glutámico, un resto alanina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto ácido glutámico o un resto alanina
- <400> 39
Ile Xaa Xaa Xaa Tyr Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10
- 25 <210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
30 <223> epítipo incluido en el seno del primer dominio repetido de la Anexina A3 de mamífero
- <220>
<221> Xaa6
<222> (1)..(1)
35 <223> Xaa6 representa un resto lisina, un resto arginina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto lisina o un resto arginina
- <220>
<221> Xaa7
<222> (2)..(2)
40 <223> Xaa7 representa un resto ácido glutámico, un resto glutamina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto ácido glutámico o un resto glutamina
- <220>
<221> Xaa8
<222> (5)..(5)
45 <223> Xaa8 representa un resto alanina, un resto ácido glutámico o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto alanina o un resto ácido glutámico
- <220>
<221> Xaa9
<222> (6)..(6)
50 <223> Xaa9 representa un resto alanina, un resto leucina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto alanina o un resto leucina
- <220>
<221> Xaa10
<222> (7)..(7)
55 <223> Xaa10 representa un resto tirosina, un resto cisteína o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto tirosina o un resto cisteína

- <220>
 <221> Xaa11
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa11 representa un resto glicina, un resto ácido glutámico o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto glicina o un resto ácido glutámico
- 5
- <400> 40
Xaa Xaa Tyr Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
- <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 10
- <220>
 <223> epítipo incluido en el seno del primer dominio repetido de la Anexina A3 de mamífero
- <220>
 <221> Xaa6
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa6 representa un resto lisina, un resto arginina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto lisina o un resto arginina
- 15
- <220>
 <221> Xaa7
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa7 representa un resto ácido glutámico, un resto glutamina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto ácido glutámico o un resto glutamina
- 20
- <220>
 <221> Xaa8
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa8 representa un resto alanina, un resto ácido glutámico o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto alanina o un resto ácido glutámico
- 25
- <220>
 <221> Xaa9
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa9 representa un resto alanina, un resto leucina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto alanina o un resto leucina
- 30
- <220>
 <221> Xaa10
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa10 representa un resto tirosina, un resto cisteína o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto tirosina o un resto cisteína
- 35
- <220>
 <221> Xaa11
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa11 representa un resto glicina, un resto ácido glutámico o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto glicina o un resto ácido glutámico
- 40
- <220>
 <221> Xaa12
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa12 representa un resto lisina, un resto glutamina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto lisina o un resto glutamina
- 45
- <220>
 <221> Xaa13
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa13 representa un resto ácido glutámico, un resto alanina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto ácido glutámico o un resto alanina
- 50
- <220>
 <221> Xaa14
- 55

<222> (13)..(13)

<223> Xaa14 representa un resto ácido aspártico, un resto alanina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto ácido aspártico o un resto alanina

<400> 41

Xaa Xaa Tyr Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Lys Xaa Asp Leu Lys
1 5 10 15

5 Gly

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> epítipo incluido en el seno del primer dominio repetido de la Anexina A3 de mamífero

<220>

<221> Xaa20

<222> (7)..(7)

15 <223> Xaa20 representa un resto ácido glutámico, un resto lisina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto ácido glutámico o un resto lisina

<220>

<221> Xaa21

<222> (8)..(8)

20 <223> Xaa21 representa un resto histidine, un resto glutamina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto histidine o un resto glutamina

<220>

<221> Xaa22

<222> (9)..(9)

25 <223> Xaa22 representa un resto leucina, un resto valina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto leucina o un resto valina

<400> 42

Asp Leu Ser Gly His Phe Xaa Xaa Xaa

1 5

30 <210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> epítipo incluido en el seno del primer dominio repetido de la Anexina A3 de mamífero

35 <220>

<221> Xaa20

<222> (6)..(6)

<223> Xaa20 representa un resto ácido glutámico, un resto lisina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto ácido glutámico o un resto lisina

40 <220>

<221> Xaa21

<222> (7)..(7)

<223> Xaa21 representa un resto histidine, un resto glutamina o un aminoácido análogo, ventajosamente un resto histidine o un resto glutamina

45 <400> 43

Leu Ser Gly His Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

50 <213> Canis familiaris

ES 2 764 379 T3

<400> 44
 Thr Asn Ala Gln His Gln Leu Ile Val Arg Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr
 1 5 10 15

Gly

<210> 45
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 45
 Leu Ile Val Arg Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly
 1 5 10

<210> 46
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 46
 Ile Val Arg Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu
 1 5 10

<210> 47
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 47
 Arg Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly
 20 1 5

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 48
 Asp Leu Ser Gly His Phe Lys Gln Leu
 25 1 5

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Canis familiaris

<400> 49
 Leu Ser Gly His Phe Lys Gln
 1 5

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 50
 Arg Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys
 1 5 10 15

40 Gly

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección y/o de valoración *in vitro* de la anexina A3 en una muestra biológica de un mamífero, eligiéndose dicha muestra biológica entre sangre o al menos uno de sus derivados, tales como plasma y suero, en el que la muestra biológica se pone en contacto con un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, estando dirigido el primer anticuerpo contra el primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y estando dirigido el segundo anticuerpo contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer anticuerpo es un anticuerpo de captura y el segundo anticuerpo es un anticuerpo de detección.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el primer anticuerpo 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 del primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el primer anticuerpo se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo incluido en el primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero, teniendo dicho epítipo una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias siguientes:
- Xaa1-Xaa2-A-Q-Xaa3-Xaa4-L-I-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11 (SEQ ID NO: 37),
L-I-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11 (SEQ ID NO: 38),
I-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13 (SEQ ID NO: 39),
Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11 (SEQ ID NO: 40),
Xaa6-Xaa7-Y-Q-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-L-K-Xaa14-D-L-K-G (SEQ ID NO: 41) con la condición que la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41 esté fusionada en el lado N-terminal con una secuencia de al menos 30 aminoácidos,
DLSGHF-Xaa20-Xaa21-Xaa22 (SEQ ID NO: 42),
LSGHF-Xaa20-Xaa21 (SEQ ID NO: 43),
en las que:
- Xaa1 representa un residuo de serina, un residuo de treonina o un aminoácido análogo,
Xaa2 representa un residuo de asparagina, un residuo de serina o un aminoácido análogo,
Xaa3 representa un residuo de arginina, un residuo de histidina o un aminoácido análogo,
Xaa4 representa un residuo de glutamina, un residuo de leucina o un aminoácido análogo,
Xaa5 representa un residuo de valina, un residuo de alanina o un aminoácido análogo,
Xaa6 representa un residuo de lisina, un residuo de arginina o un aminoácido análogo,
Xaa7 representa un residuo de ácido glutámico, un residuo de glutamina o un aminoácido análogo,
Xaa8 representa un residuo de alanina, un residuo de ácido glutámico o un aminoácido análogo,
Xaa9 representa un residuo de alanina, un residuo de leucina o un aminoácido análogo,
Xaa10 representa un residuo de tirosina, un residuo de cisteína o un aminoácido análogo,
Xaa11 representa un residuo de glicina, un residuo de ácido glutámico o un aminoácido análogo,
Xaa12 representa un residuo de lisina, un residuo de glutamina o un aminoácido análogo,
Xaa13 representa un residuo de ácido glutámico, un residuo de alanina o un aminoácido análogo,
Xaa14 representa un residuo de ácido aspártico, un residuo de alanina o un aminoácido análogo,
Xaa20 representa un residuo de ácido glutámico, un residuo de lisina o un aminoácido análogo,
Xaa21 representa un residuo de histidina, un residuo de glutamina o un aminoácido análogo,
Xaa22 representa un residuo de leucina, un residuo de valina o un aminoácido análogo.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo anticuerpo 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 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.
- 5 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segundo anticuerpo se selecciona entre los anticuerpos dirigidos contra un epítipo cuya secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo 3 y termina en el residuo 49 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.
- 10 7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, en el que el epítipo comprende un residuo de lisina en la posición 6 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y/o un residuo de ácido aspártico en la posición 49 de dicho cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el epítipo comprende un residuo de arginina o glutamina en la posición 3 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y un residuo de isoleucina o alanina en la posición 8 de dicho cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.
- 15 9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que el epítipo comprende un residuo de glicina en la posición 7 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero, un residuo de isoleucina o alanina en la posición 8 del cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero y un residuo de glicina en la posición 9 de dicho cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero.
- 20 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el mamífero es el hombre y en el que el primer anticuerpo está dirigido contra el primer dominio repetido de dicha anexina A3 humana cuya secuencia está identificada en la SEQ ID NO: 1 y el segundo anticuerpo está dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 humana cuya secuencia está identificada en la SEQ ID NO: 2.
- 25 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10 para el diagnóstico *in vitro* y/o el seguimiento *in vitro* de la evolución de una patología comprendida en el grupo constituido por cánceres, tales como cánceres urogenitales y en particular cánceres de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides papilar, cáncer de mama, trastornos inflamatorios, tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, poliartritis reumatoide, enfermedad de Crohn y diabetes.
- 30 12. Kit de inmunodetección y/o de inmunovaloración de una muestra biológica de un mamífero, eligiéndose dicha muestra biológica entre sangre o al menos uno de sus derivados, tales como plasma y suero, comprendiendo dicho kit:
- 35 - un primer anticuerpo dirigido contra el primer dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero, tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 10,
- un segundo anticuerpo dirigido contra el cuarto dominio repetido de la anexina A3 de dicho mamífero, tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 10,
- un medio de calibración apropiado,
- permitiendo dicho kit realizar el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Utilización del kit según la reivindicación 12 para realizar el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11.

Alineamiento de secuencias de los dominios D1 de la anexina A3 en diferentes especies de mamífero

SP P12429 ANXA3_HUMAN	IQKAI	RIGT	DEKMLISIL	TERSNAQRQLIV	KEYQAA	YGKELKDD	LKGDLSGH	FEHLMVAL
SP O35639 ANXA3_MOUSE	IRKAI	RGLG	TDEKTLINIL	TERSNAQRQLIV	KYQAA	YEQELKDD	LKGDLSGH	FEHVMVAL
SP P14669 ANXA3_RAT	IRKAI	KIGT	DEKTLINIL	TERSNAQRQLIV	KYQEA	YEQALKAD	LKGDLSGH	FEHVMVAL
SP Q3SWX7 ANXA3_BOVIN	IRKAI	RIGT	DEKTLISIL	TERNAQRLI	IAKEYQAL	CGKELKDD	LKGDLSGH	FKHLMVAL
TR E2RON3 E2RON3_CANFA	IRKAI	RIGT	EEKTLISIL	TERNAQRLIV	REYQAA	YGKELKDD	LKGDLSGH	FKQLMVAL
TR G1TEM7 G1TEM7_RABIT	IRKAI	RIGT	DEKTLISILA	ERSNAQRQLIV	KEYQAA	YGKELKDD	LKGDLSGH	FEHLMVAL
TR F6Z8Y2 F6Z8Y2_MACMU	IRKAI	RIGT	DEKMLISIL	TERSNAQRQLIV	KEYQAA	YGKELKDD	LKGDLSGH	FEHLMVAL
TR G3R3Y9 G3R3Y9_GORGO	IQKAI	RIGT	DEKMLISIL	TERSNAQRQLIV	KEYQAA	YGKELKDD	LKGDLSGH	FEHLMVAL

*:****:*** ** **::***:***: **::***: ** *****:***:****

FIG. 1a

Alineamiento de secuencias de los dominios D4 de la anexina A3 en diferentes especies de mamíferos

SP P12429 ANXA3_HUMAN	LHRAL	KGIGT	DEFTLNR	IMVSRSEIDL	LDIRTE	FKKH	YGSLYSAIK	SDTSGDYEITLLKI
SP O35639 ANXA3_MOUSE	LHQAL	KGAGT	DEFTLNR	IMVSRSEIDL	LDIRHE	FKKH	YGSLYSAIQ	SDTSGDYRTVLLKI
SP P14669 ANXA3_RAT	LHQAL	KGAGT	DEFTLNR	IMVSRSEIDL	LDIRRE	FKKH	YGSLYSAIQ	SDTSGDYRTVLLKI
SP Q3SWX7 ANXA3_BOVIN	LYRAL	KGAGT	DEFTLNR	IMVSRSEIDL	LDIRAE	FKKLS	YGSLYSAIK	SDTSGDYEITLLKI
TR E2RON3 E2RON3_CANFA	LHQAL	KGAGT	DEFTLNR	IMVSRSEIDL	LDIRAE	FKKH	YGSLYSAIK	SDTSGDYEITLLKI
TR G1TEM7 G1TEM7_RABIT	LYQAL	KGAGT	DEFTLNR	IMVSRSEIDL	LDIRAE	FKKQ	YGSLYSAIK	SDTSGDYEITLLKI
TR F6Z8Y2 F6Z8Y2_MACMU	LHRAL	KGAGT	DEFTLNR	IMVSRSEIDL	LDIRIE	FKKH	YGSLYSAIK	SDTSGDYEITLLKI
TR G3R3Y9 G3R3Y9_GORGO	LHRAL	KGIGT	DEFTLNR	IMVSRSEIDL	LDIRTE	FKKH	YGSLYSAIK	SDTSGDYEITLLKI

*:**** *****:***** ***** * **** * *****:***** . ****

FIG. 1b

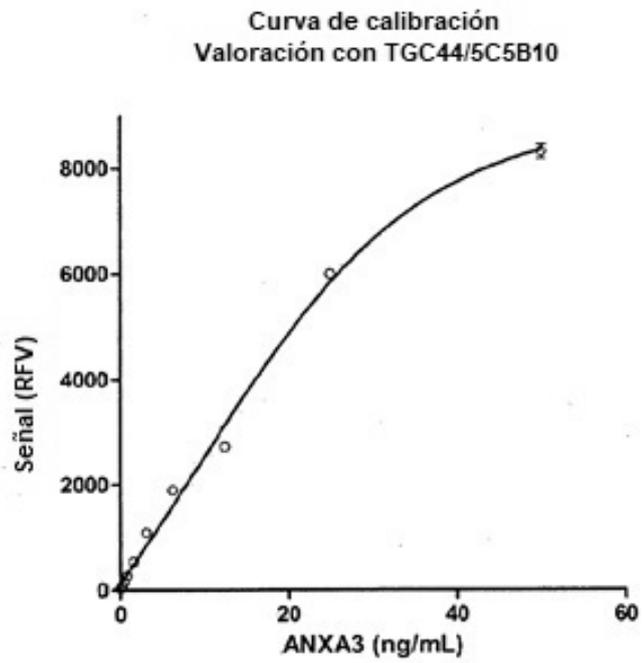
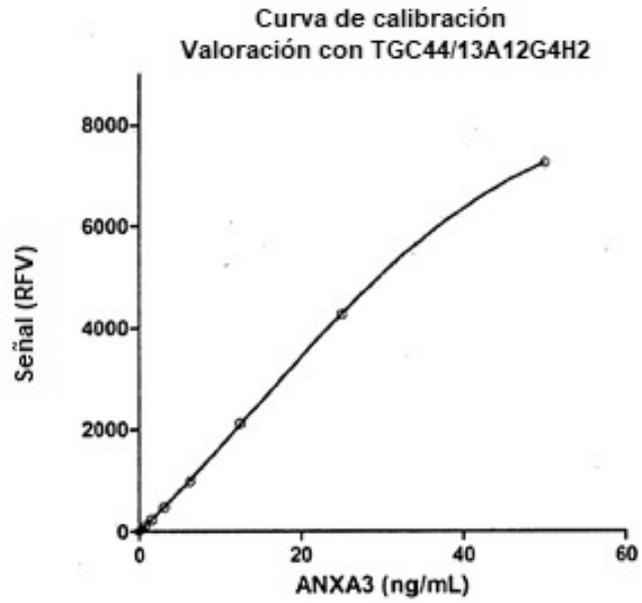


FIG. 2

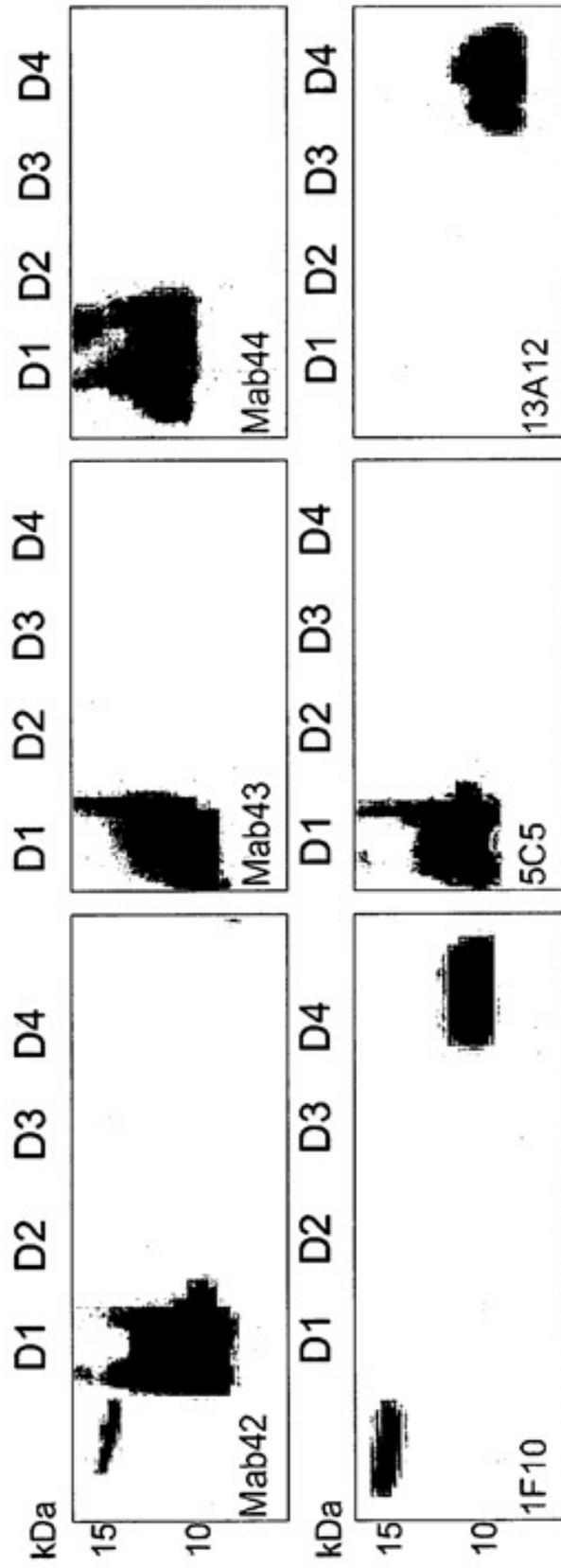


FIG. 3

Construcciones	Secuencia	Reconocimiento
D1	MCHHHHHHSPVDAEAIQXAIRGIGTDERMLISILTERSNAQRQLIVKEYQAAYGKELKDDLKGDLSCGHFEHLMVALVT* (SEQ ID : 1)	TGC44 OUI
VANA-7	MASIWGHRGTVRDPFSPVDAEAIQXAIRGIGTDERMLISILTERSNAQRQLIVKEYQAAYGKELKDDLKGDLSCGHFEHLMVALVTPPAVFDKQLKKSXKGA*	OUI
VANA-3	GTDERMLISILTERSNAQRQLIVKEYQAAYGKELKDDLKGDLSCGHFEHLMVALVTPPAVFDKQLKKSXKGA...	NON
2J7	...VPRGSMKETAANKTERQHMDSPDLHLGDTIEYQDLGTDGDDDKAMAIKEYQAAYGKELKDDLKGDLSCGHFEHLMVALVTPPAVFDSPNSSSVDKLAALAEFG*	OUI
2Z13	...DLHLGDTIEYQDLGTDGDDDKAMAIQXAIRGIGTDERMLISILTERSNAQRQLIVKEYQAAYGKELKDDLKGDLSCGHFEHLMVALVTPPAVFDKQLKKSXKGA*	OUI

FIG. 4

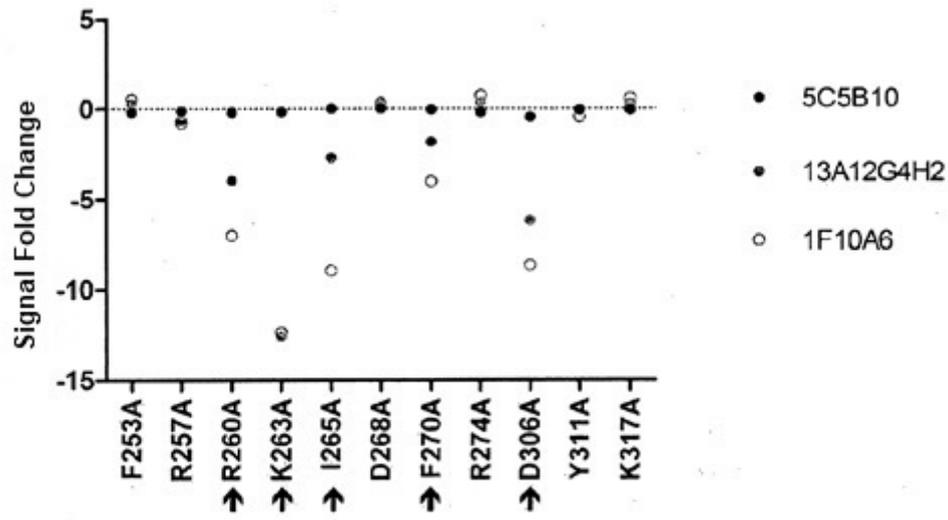


FIG. 5

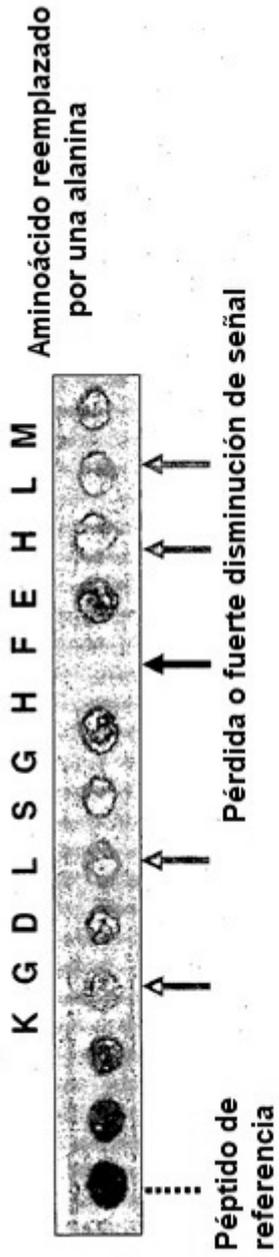


FIG. 6a

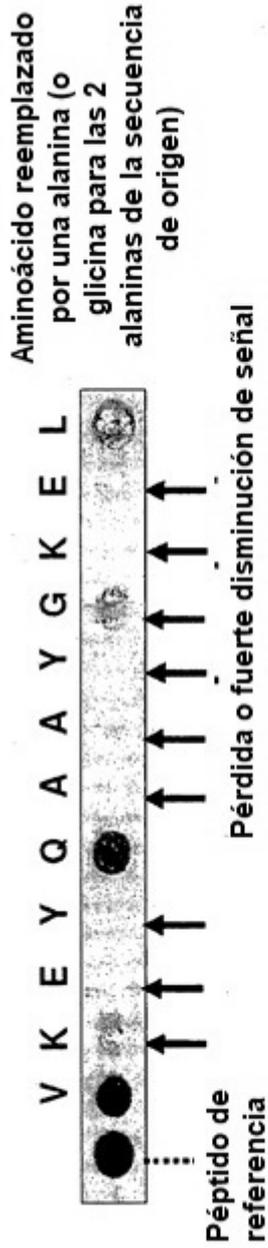


FIG. 6b

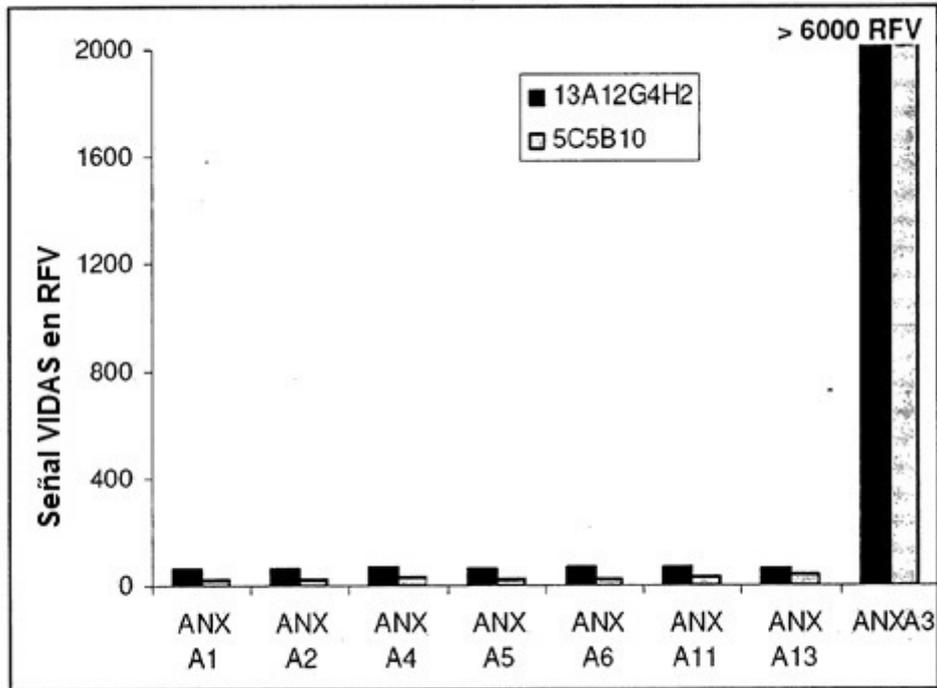


FIG. 7

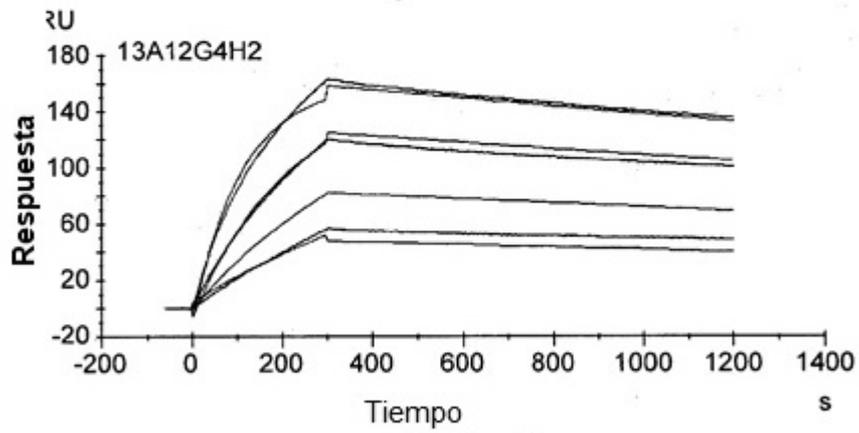
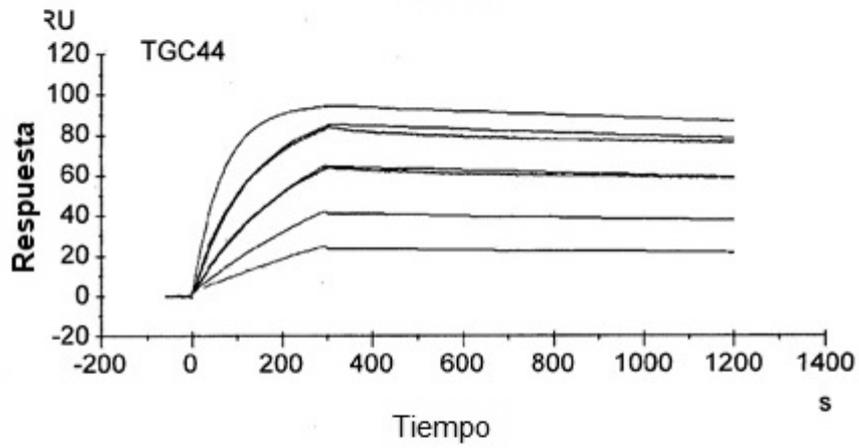
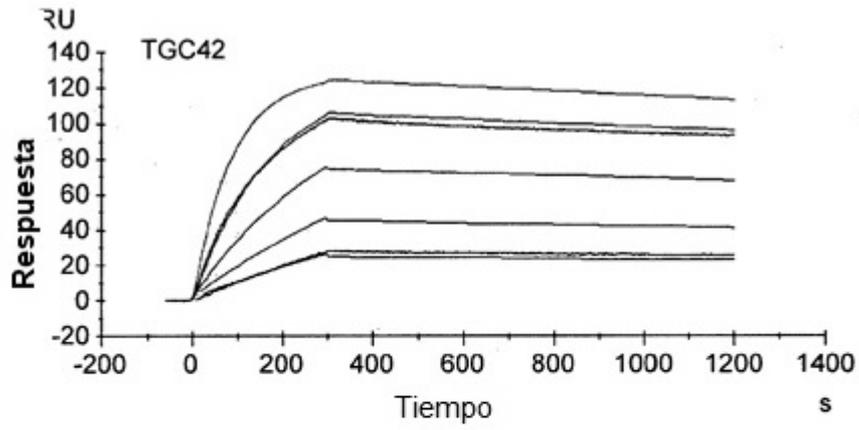


FIG. 8

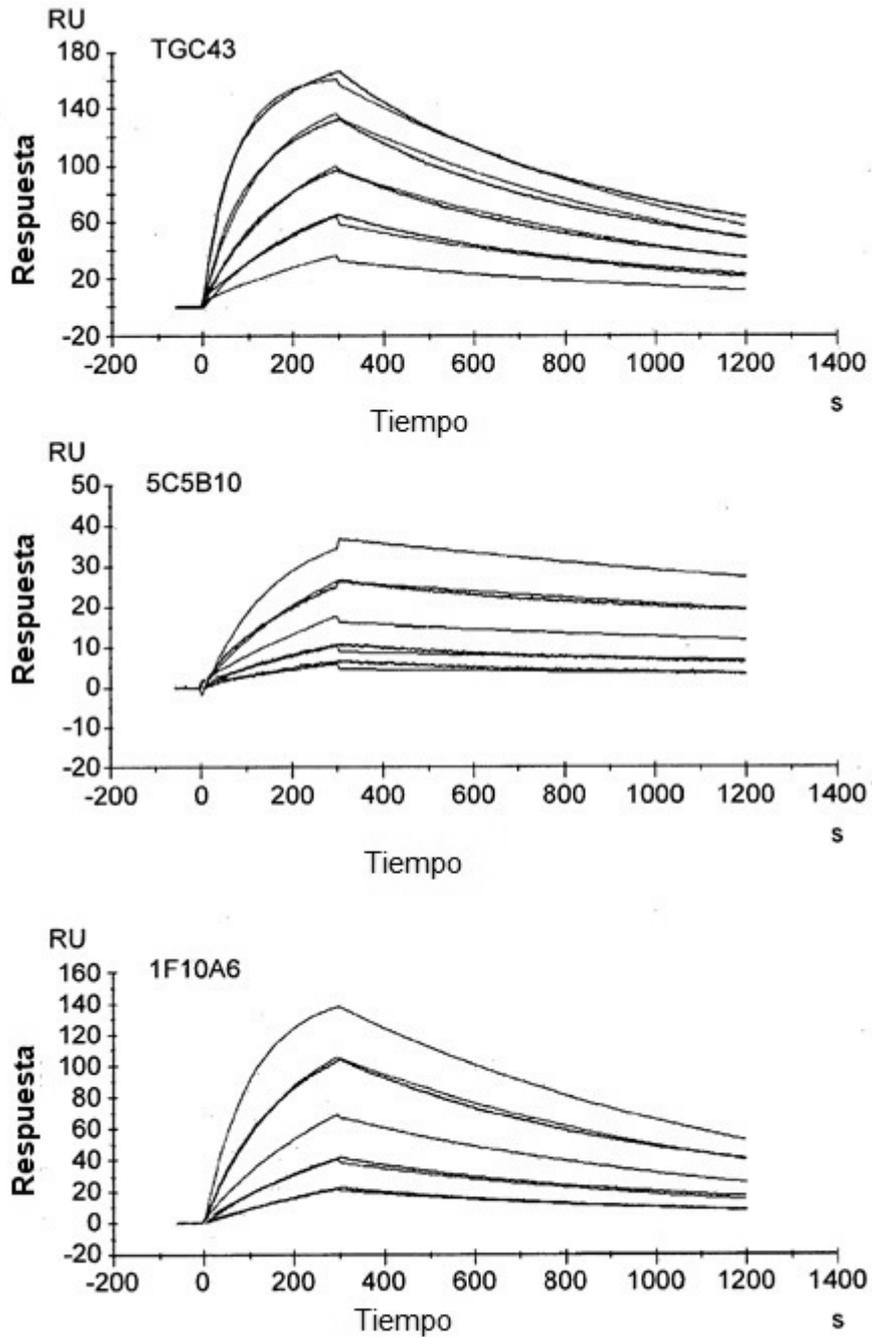


FIG. 8 (continuación)

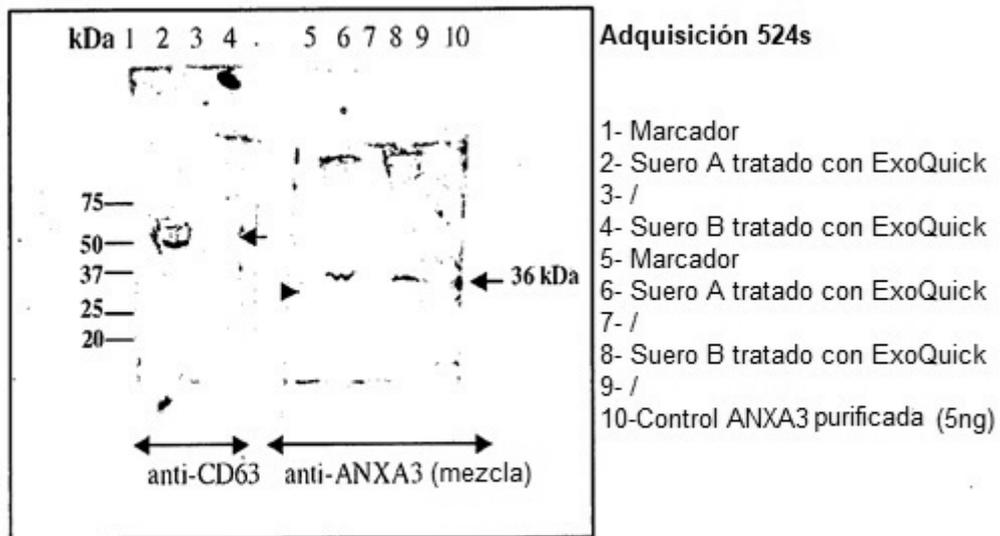
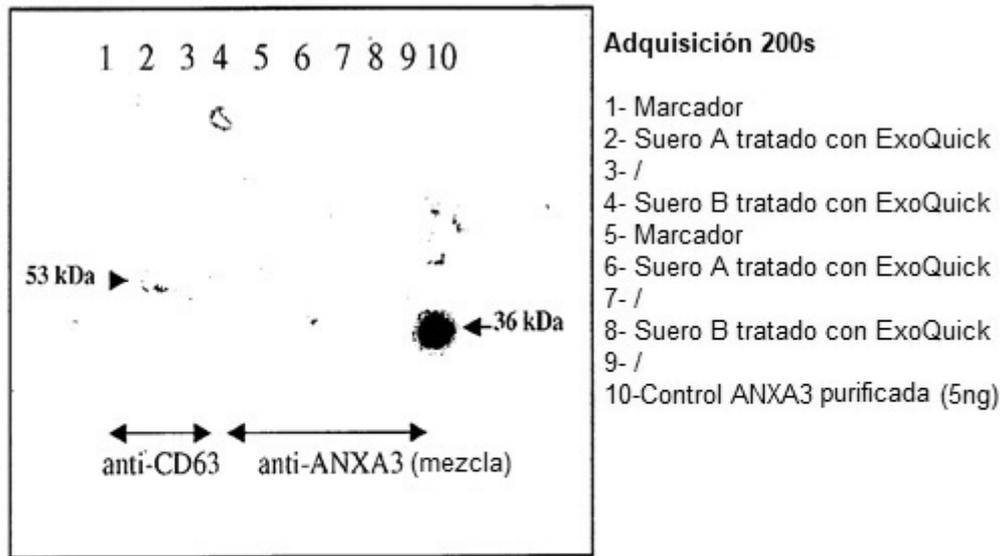


FIG. 9