



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 585**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06075982 .6**

96 Fecha de presentación : **04.08.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1734368**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Autoanticuerpos contra anexinas utilizados como marcadores para el cáncer de pulmón.**

30 Prioridad: **06.08.1999 US 370337**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2009

73 Titular/es:
**The Regents of the University of Michigan
P.O. Box 0510
Ann Arbor, Michigan 48109-0510, US**

72 Inventor/es: **Hanash, Samir M.;**
Misek, David;
Hinderer, Robert;
Beer, David y
Brichory, Franck

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 320 585 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

Autoanticuerpos contra anexinas utilizados como marcadores para el cáncer de pulmón.

5 1. Introducción

La presente invención se refiere al uso de proteínas anexinas, para la detección de autoanticuerpos para proteínas anexinas, como indicador de diagnóstico, predictivo o pronóstico de cáncer de pulmón. La invención se demuestra mediante ejemplos en los que se han observado niveles elevados de autoanticuerpos circulantes reactivos contra proteínas anexinas en los sueros de sujetos con cáncer.

15 2. Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que varias proteínas celulares aparecen con niveles aumentados en los fluidos corporales de sujetos con diferentes tipos de cáncer. Los niveles aumentados de tales proteínas en sujetos con cáncer proporcionan ensayos diagnósticos y pronósticos para determinar la presencia de cáncer. Por ejemplo, los niveles en suero elevados del antígeno específico de la próstata (PSA) se usan con frecuencia como un indicador de la presencia de cáncer de próstata en hombres.

Se conoce que los autoanticuerpos para proteínas celulares normales o modificadas se producen por pacientes en ciertas enfermedades tales como las enfermedades autoinmunitarias y los trastornos relacionados con el sistema cardiovascular, en algunos casos incluso antes de que la enfermedad haya producido síntomas manifiestos. También existe una evidencia creciente de una respuesta inmunitaria humoral al cáncer en seres humanos, tal como se demuestra por la identificación de anticuerpos contra varios antígenos intracelulares y de superficie en pacientes con diversos tumores (Gourevitch *et al.*, 1995, Br. J. Cancer 72:934-938; Yamamoto *et al.*, 1996, Int. J. Cancer, 69:283-289; Stockert *et al.*, 1998, J. Exp. Med. 187:1349-1354; Gure *et al.*, 1998, Cancer Res. 58:1034-1041). Por ejemplo, las alteraciones somáticas en el gen p53 obtienen una respuesta humoral en el 30-40% de los pacientes afectados (Soussi, 1996, Immunol. Today 17:354-356). En algunos casos, la detección de anticuerpos anti-p53 puede ser anterior al diagnóstico del cáncer (Lubin *et al.*, 1995, Nat. Med. 7:701-702; Cawley *et al.*, 1998, Gastroenterology 115:19-27). La patente de los EE.UU. nº 5.405.749 da a conocer un método para detectar un autoantígeno de la retinopatía asociada al cáncer y para someter a ensayo el suero del paciente para identificar un autoanticuerpo para el autoantígeno. Además, se han observado aumentos en las tasas relativas de la síntesis de las proteínas citoesqueléticas principales en la superficie de las células leucémicas y de los linfocitos transformados por mitógenos y los virus de Epstein-Barr (Bachvaroff, R.J. *et al.*, 1980, Proc. Natl Acad. Sci. 77:4979-4983).

La mayoría de los antígenos derivados de tumores que se han identificado y que obtienen una respuesta humoral no son los productos de genes mutados. Incluyen antígenos de diferenciación y otros productos génicos que se sobreexpresan en tumores (Old y Chen, 1998, J. Exp. Med. 187:1163-1167). No está claro por qué sólo un subconjunto de pacientes con un tipo de tumor desarrollan una respuesta humoral para un antígeno en particular. Los factores que influyen en la respuesta inmunitaria pueden incluir la variabilidad entre individuos en las moléculas del complejo de histocompatibilidad principales. También es posible que las proteínas puedan volverse inmunogénicas tras sufrir una modificación posterior a la traducción, un proceso que puede ser variable entre tumores de un tipo similar.

El cáncer de pulmón es el cáncer más común en los Estados Unidos y asciende a más de un cuarto (28%) de los fallecimientos por cáncer en los EE.UU. (Travis *et al.*, 1996, Cancer 77:2464-2470). Se han identificado varias alteraciones moleculares que incluyen la amplificación de c-myc, mutaciones de Ki-ras o p53 que pueden afectar al comportamiento del tumor (Mao *et al.*, 1994, Cancer Res 54:1634-1637, Mills *et al.*, 1995, J. Natl. Cancer Inst. 87:1056-1060, Gao *et al.*, 1997, Carcinogenesis 18:473-478). Se ha informado acerca de autoanticuerpos séricos contra los oncogenes del producto y los genes supresores del tumor, tales como c-myc (Ben-Mahrez *et al.*, 1990, Int. J. Cancer 46:35-38), c-myc (Sorokine *et al.*, 1991, Int. J. Cancer 47:665-669), c-erbB-2 (Pupa *et al.*, 1993, Cancer Res 53:5864-5866), ras (Takahashi *et al.*, 1995, Clin. Cancer 1:107) y p53 (Peyrat *et al.*, 1995, Lancet 345:621-622; Iizasa *et al.*, 1998, Cancer Immunol. Immunother. 46:345-349) en pacientes con diversas enfermedades malignas. Se ha informado acerca de autoanticuerpos contra los productos del oncogén L-myc en un 10% de los sueros de pacientes con cáncer de pulmón (Yamamoto *et al.*, 1996, Int. J. Cancer 69:283-289). También se han detectado autoanticuerpos séricos contra p53 en sueros de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Iizasa *et al.*, 1998, Cancer Immunol. Immunother. 46:345-349). Los títulos de suero elevados de los autoanticuerpos anti-p53 estaban presentes en aproximadamente el 20% de los casos de (NSCLC), y la incidencia de estos autoanticuerpos refleja la presencia de mutaciones de p53 y una sobreexpresión de p53 (Yamamoto *et al.*, 1996, Int. J. Cancer 69:283-289).

La detección de autoanticuerpos para antígenos celulares y la identificación de proteínas que han obtenido autoanticuerpos se han llevado a cabo usando una diversidad de enfoques. Por ejemplo, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) se describió primeramente como un antígeno nuclear que unía anticuerpos de algunos pacientes con lupus eritematoso (Miyachi, K., Fritzler, M.J., y Tan, E.M., 1978, J. Immunol 121:2228-2234). Posteriormente se observó que los linfocitos restantes no reaccionaron con el anticuerpo, al contrario que los linfocitos estimulados por mitógeno que mostraron tinción nuclear. Esto último condujo a la identificación de la proteína, denominada PCNA que se reconoce por este autoanticuerpo en el lupus (Tan, E.M., Ogata, K., y Takasaki, Y., 1987, J. Rheumatol., 13:89-96). En algunos otros casos, las proteínas candidatas se seleccionan e investigan con respecto a su capacidad para inducir anticuerpos en pacientes, tal como se investigó para p53 (Crawford, L.V., Firm, D.C., Bulbrook, R.D., 1984, Int J Can-

cer 30:403-408). Además, una técnica denominada SEREX se basa en análisis serológicos de genotecas de expresión de ADNc recombinante para identificar antígenos tumorales (Old, L., *et al.* 1998, *J. Exp. Med.* 187:1163-1167). De este modo, se han seguido muchos enfoques para buscar proteínas contra las que puedan producirse anticuerpos.

5 Las anexinas son una familia de proteínas que se unen a fosfolípidos dependientes de calcio que se expresan de forma ubicua en diferentes tipos de tejidos y células de eucariotas superiores e inferiores (Benz, J. y Hofmann, A, 1997, *Biol. Chem* 378:177-183). Se han identificado al menos doce proteínas anexinas. Entre las múltiples funciones sugeridas para la familia de proteínas anexinas, las que implican a las proteínas en la regulación de la exocitosis siguen siendo las más convincentes (Donnelly, SR y Moss SE, *Cell*, 1997, *Mol. Life Sci* 53:533-538). Una proteína anexina
10 típica se caracteriza por dos rasgos definidos, (i) unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} ; y (ii) en presencia de un elemento de secuencia conservada de aproximadamente 70 aminoácidos que se repite cuatro u ocho veces en un miembro dado de la familia. Estudios inmunocitoquímicos de anexinas han demostrado que residen subadyacentes a las membranas plasmáticas, cerca de los orgánulos intracelulares que secuestran calcio (Gerke, V y Moss, SE, 1997, *Biochimica et Biophysica Acta* 1357:129-154). Las propiedades físicas asociadas a las anexinas incluyen inhibición de
15 la fosfolipasa A_2 , actividad anticoagulante, unión a proteínas citoesqueléticas, agregación de membranas y vesículas y actividad de canal selectiva de calcio. Se ha encontrado que los niveles aumentados de anexina se asocian a varias enfermedades que incluyen la esclerosis múltiple y la neuritis experimental.

Kraus, M. *et al* en *J. Immunoassay*, 13 (3), (1992), 411-439 describen el desarrollo de inmunoensayos para determinar cuantitativamente autoanticuerpos contra 6 miembros de la familia de anexinas. Resultados preliminares obtenidos de sueros de pacientes con melanoma maligno demostraron una presencia bastante frecuente de autoanticuerpos. Sin embargo, concluyen que el significado patofisiológico de tales autoanticuerpos es todavía desconocido.

Bastian, B.C *et al* en *J Dermatol Science*, 8 (1994) 194-202 observaron que los autoanticuerpos dirigidos contra diversas anexinas podían detectarse tanto en los grupos control como en los grupos enfermos, sin manifestar ninguna correlación significativa con ninguno de los estados de enfermedad, que incluían enfermedades autoinmunitarias, psoriasis, úlcera de pierna, melanoma maligno y enfermedades diversas.

Bastian, B.C. en *CMLS Cellular & Molecular Life Sciences*, 53 (b), (1997), 554-556 describe la detección de autoanticuerpos contra varias anexinas en pacientes con enfermedades autoinmunitarias tales como lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino.

3. Sumario de la invención

35 Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos de detección para la valoración diagnóstica y pronóstica de cáncer de pulmón, para la identificación de sujetos con predisposición a cáncer, y la monitorización de pacientes sometidos a tratamiento de cáncer, basándose en la detección de niveles elevados de autoanticuerpos frente a anexina en muestras biológicas de sujetos.

40 La presente invención se refiere a la valoración diagnóstica y el pronóstico de cáncer mediante la detección de autoanticuerpos para antígenos de proteínas anexinas en el suero de sujetos con cáncer de pulmón o con lesiones de pulmón precancerosas. La detección de niveles séricos aumentados de autoanticuerpos para proteínas anexinas constituye una estrategia novedosa para la selección, el diagnóstico y el pronóstico del cáncer.

45 La presente invención proporciona el uso de antígenos de proteínas anexinas en inmunoensayos diseñados para detectar la presencia de autoanticuerpos séricos para antígenos de proteínas anexinas. Tales inmunoensayos se utilizan para el diagnóstico y el pronóstico de cáncer de pulmón. Según la invención, la medición de los niveles de autoanticuerpos frente a anexina en un suero de un sujeto puede usarse para el diagnóstico temprano de cáncer. Además, puede usarse la monitorización de los niveles de autoanticuerpos séricos con un fin pronóstico para representar la progresión
50 de la enfermedad.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los niveles de expresión de Anexina I y II están aumentados en las muestras de tejido tumoral derivadas de sujetos con adenocarcinoma pulmonar o cáncer de pulmón de células escamosas. Adicionalmente, se detectaron niveles aumentados de autoanticuerpos contra Anexina I y II en el suero de sujetos con adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de células escamosas. El hecho de encontrar que los niveles de proteínas anexinas y autoanticuerpos frente a anexina están aumentados en las muestras derivadas de sujetos con cáncer proporciona una base para el desarrollo de métodos diagnósticos y pronósticos así como de medios para monitorizar la eficacia de diversos tratamientos terapéuticos del cáncer.

60 4. Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Electroforesis en gel bidimensional de lisados de células A549. Se tiñó el gel con plata para visualizar las proteínas.

65 Figura 2. Inmunotransferencia (Western blot) de una separación en gel bidimensional de un lisado de células A549 tratadas con suero de un paciente con cáncer de pulmón. Se observó reactividad en un grupo de manchas de proteínas contiguas denominado A1 con un pI de entre 6,3 y 6,8 y un peso molecular de 37 kDa.

Figura 3. Inmunorreactividad de IgM contra proteínas de cáncer de pulmón. Inmunotransferencia de una separación en gel bidimensional de lisados de A549 tratadas con suero de pacientes con cáncer de pulmón. Posteriormente se incubaron las membranas con un anticuerpo IgM antihumano de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante.

5 Figura 4. Inmunorreactividad del subtipo de IgG contra sueros de pacientes con cáncer de pulmón. Inmunotransferencia de una separación en gel bidimensional de lisados de A549 con suero de pacientes con cáncer de pulmón. Posteriormente se hibridaron las membranas con anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 antihumanos de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante.

10 Figura 5. Especificidad de anticuerpos IgG de A1 y A2 para sueros de pacientes con cáncer de pulmón. Se hibridaron las membranas que contenían lisados de A549 con sueros de pacientes con melanoma, cáncer de mama, cáncer de hígado o cáncer de esófago. Ninguno de los sueros mostró inmunorreactividad basada en IgG contra A2. Se observaron proteínas A1 con sueros de pacientes con cáncer de esófago (5/8), cáncer de mama (1/11), pero estaban ausentes con sueros de pacientes con melanoma (0/7) y cáncer de hígado (0/11).

15 Figura 6. Los anticuerpos anti-Anexina I y anti-Anexina II son inmunorreactivos contra las proteínas en las manchas de A1 y A2, respectivamente.

5. Descripción detallada de la invención

20 La presente invención consigue un objetivo sumamente deseable, concretamente proporcionar métodos para la evaluación diagnóstica y pronóstica de sujetos con cáncer de pulmón y la identificación de sujetos que muestran una predisposición a desarrollar cáncer de pulmón. Los ensayos de la invención comprenden métodos diseñados para detectar la presencia de autoanticuerpos frente a anexina, en muestras de suero u otras muestras biológicas de un sujeto. Para los fines de la presente invención, las proteínas anexinas se caracterizan por un motivo canónico en el que un tramo de aproximadamente 70 aminoácidos se repite al menos cuatro veces (Wallner, B.P. *et al.*, 1986, Nature 320:77-80; Weber, K. y Johnson, N., 1986, FEBS Lett. 203:95-98; Saris, C.J.M. *et al.*, 1986, Cell 46:201-212; Huang K.S. *et al.*, 1986, Cell 46:191-199).

30 Anexina I y II y péptidos derivados de las mismas, se purifican y utilizan para detectar en un suero de un sujeto la presencia de autoanticuerpos circulantes para tales antígenos de proteína, mediante ensayos inmunoabsorbentes sensibles y rápidos o mediante otros procedimientos.

35 Los métodos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando kits diagnósticos previamente empaquetados que comprenden un fragmento de proteína anexina o de proteína antigénica para la detección de autoanticuerpos frente a anexina en una muestra derivada de un sujeto.

40 La presente invención se basa en el descubrimiento de que los niveles de proteínas anexinas I y II están aumentados en el adenocarcinoma y los tumores de pulmón de células escamosas derivados de sujetos con cáncer. Adicionalmente, se han detectado niveles aumentados de autoanticuerpos circulantes reactivos contra proteínas anexinas en el suero de sujetos que tienen adenocarcinoma y tumores de pulmón de células escamosas.

5.1 Ensayos para detectar la producción de anexina

45 Pueden usarse mediciones de los niveles de proteínas anexinas en muestras derivadas de un sujeto para el diagnóstico temprano de enfermedades tales como el cáncer. Por otra parte, pueden usarse la monitorización y cuantificación de los niveles de proteína anexina con un fin pronóstico para representar la progresión de la enfermedad y para valorar la eficacia de los agentes usados para tratar a un sujeto con cáncer.

50 La detección de proteínas anexinas en una muestra de un sujeto puede llevarse a cabo mediante cualquiera de varios métodos. Los métodos diagnósticos preferidos para la detección de proteínas anexinas en la muestra biológica de un sujeto pueden incluir, por ejemplo, inmunoensayos en los que las proteínas anexinas se detectan por su interacción con un anticuerpo específico de anexina. Los anticuerpos pueden usarse para detectar cuantitativa o cualitativamente la presencia de anexinas o fragmentos antigénicos de las mismas. Además, pueden usarse reactivos distintos a los anticuerpos, tales como, por ejemplo, polipéptidos que se unen específicamente a proteínas anexinas en ensayos para detectar el nivel de expresión de proteína anexina. Alternativamente, la detección de proteínas anexinas puede llevarse a cabo mediante la detección y medición de los niveles de las propiedades biológicas asociadas a las proteínas anexinas, tales como por ejemplo, la fosfolipasa A, y la actividad anticoagulante.

60 Los inmunoensayos incluyen sistemas de ensayo que usan técnicas tales como inmunotransferencias, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de intercalación ("sandwich"), ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, para nombrar solamente algunos.

65 Se obtiene una muestra biológica que puede contener proteínas anexinas, tales como tejido de pulmón u otro tejido biológico, de un sujeto sospechoso de tener un cáncer o riesgo de cáncer en particular. Se solubilizan alícuotas de tejidos completos, o células, usando cualquiera de una diversidad de combinaciones de solubilización conocidas por

los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede solubilizarse un tejido mediante la adición de un tampón de lisis que comprende (por litro) urea 8 M, 20 ml de tensioactivo Nonidet P-40, 20 ml de anfólitos (pH 3,5-10), 20 ml de 2-mercaptoetanol, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,2 mM en agua destilada desionizada.

5 Los inmunoensayos para detectar la expresión de la proteína anexina comprenden normalmente poner en contacto la muestra biológica, tal como una muestra de tejido derivada de un sujeto, con un anticuerpo anti-anexina en condiciones tales que pueda producirse una reacción de unión antígeno-anticuerpo inmunoespecífica, y detectar o medir la magnitud de cualquier unión inmunoespecífica por el anticuerpo. En un aspecto específico, puede usarse una unión de anticuerpo de este tipo, por ejemplo, para detectar la presencia y la producción aumentada de proteínas anexinas en
10 las que la detección de la producción aumentada de proteínas anexinas es una indicación de un estado de enfermedad. Los niveles de proteína anexina en una muestra biológica se comparan con normas establecidas para individuos normales que coinciden en edad y sexo y para sujetos con una diversidad de estados de enfermedad no cancerígenos o precancerígenos.

15 La muestra biológica, tal como un extracto de tejido, se pone en contacto con un soporte o portador de fase sólida, tal como nitrocelulosa, para inmovilizar cualquier proteína presente en la muestra. Luego se lava el soporte con tampones adecuados seguido de un tratamiento con un anticuerpo específico de anexina marcado de manera detectable. Luego se lava el soporte de fase sólida con el tampón una segunda vez para eliminar anticuerpos no unidos. La cantidad de anticuerpos unidos en el soporte sólido se determina entonces según métodos bien conocidos. Los
20 expertos en la técnica podrán determinar las condiciones de ensayo opcionales para cada determinación empleando la experimentación habitual.

Una de las maneras en las que los anticuerpos frente a anexina pueden marcarse de manera detectable es ligando el anticuerpo a una enzima, tal como para el uso en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme
25 Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller, A., *et al.*, 1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520; Butler, J.E., 1981, Meth. Enzymol. 73:482-523). La enzima que se une al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente un sustrato cromogénico, de manera que produzca un resto químico que pueda detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar el anticuerpo de manera detectable
30 incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. La detección puede llevarse a cabo también mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima.

La detección de anticuerpos frente a anexina puede llevarse a cabo también usando una diversidad de otros métodos. Por ejemplo, marcando los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de manera radioactiva, es posible detectar
35 la expresión de la proteína anexina a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radioactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

40 El anticuerpo también puede marcarse con un compuesto fluorescente. Entre los compuestos de marcado fluorescente usados más comúnmente se encuentran el isocianato de fluoresceína, la rodamina, ficoeritrina y fluorescamina. Asimismo, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo frente a anexina. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Compuestos de bioluminiscencia importantes para los fines de marcado son la luciferina, luciferasa y aequorina.

45 Los niveles de proteínas anexinas en muestras biológicas pueden analizarse mediante electroforesis bidimensional en gel. Los expertos en la técnica conocen los métodos de electroforesis bidimensional. Las muestras biológicas, tales como muestras de tejidos, se cargan sobre geles electroforéticos para una separación de isoelectroenfoque en la primera dimensión que separa proteínas basándose en la carga. Pueden utilizarse varias preparaciones en gel de
50 primera dimensión que incluyen geles en tubo para separaciones basadas en anfólitos portadores o tiras de gel para separaciones basadas en gradientes inmovilizados. Tras la separación de primera dimensión, las proteínas se transfieren al segundo gel de dimensión, siguiendo un procedimiento de equilibrado y se separan usando la SDS PAGE que separa las proteínas basándose en el peso molecular. Cuando se comparan las muestras biológicas derivadas de diferentes sujetos, se preparan múltiples geles a partir de muestras biológicas individuales (incluyendo muestras de controles
55 normales).

Tras la separación, se transfieren las proteínas desde los geles bidimensionales a las membranas usadas comúnmente para la realización de inmunotransferencias. Las técnicas para la realización de inmunotransferencias y la visualización posterior de proteínas también se conocen bien en la técnica (Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A
60 Laboratory Manual", 2ª edición, volumen 3, 1989, Cold Spring Harbor). Pueden usarse los procedimientos habituales, o pueden modificarse los procedimientos tal como se conoce en la técnica para la identificación de proteínas de un tipo en particular, tales como las muy básicas o ácidas, o solubles en lípidos, etc. (Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, 1999, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, Inc., N.Y.). Los anticuerpos que se unen a las proteínas anexinas se utilizan en una etapa de incubación, tal como en el procedimiento de análisis de inmunotransferencia. Un segundo anticuerpo específico para el primer anticuerpo se utiliza en el procedimiento de análisis de
65 inmunotransferencia para visualizar las proteínas que reaccionaron con el primer anticuerpo.

La detección de niveles de proteína anexina en muestras biológicas también puede usarse para monitorizar la eficacia de los agentes anticancerígenos potenciales durante el tratamiento. Por ejemplo, el nivel de producción de proteína anexina puede determinarse antes y durante el tratamiento. La eficacia del agente puede seguirse comparando la expresión de anexina a lo largo del tratamiento. Los agentes que muestran eficacia son los que reducen el nivel de producción de proteína anexina a medida que progresa el tratamiento con el agente.

Se han detectado niveles elevados de proteínas anexinas en muestras de tejidos derivadas de pacientes con adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón de células escamosas. En particular, se detectaron niveles aumentados de Anexina I y II en muestras derivadas de pacientes con cáncer de pulmón. La detección y/o medición cuantitativa de proteínas anexinas en muestras biológicas puede usarse para detectar sujetos que presentan riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer u otros trastornos proliferativos en los que se sobreexpresan las proteínas anexinas. Además, pueden usarse las diferencias cualitativas en el patrón de incidencia en los diferentes fluidos séricos o biológicos de diferentes miembros de la familia de anexina de proteínas como un indicador de detección, diagnóstico o pronóstico de cáncer o riesgo de cáncer.

5.2 Ensayos para la detección de autoanticuerpos anti-anexina

La presente invención proporciona el diagnóstico y pronóstico de cáncer de pulmón basándose en la detección de autoanticuerpos frente a anexina circulantes en un sujeto. El método obtiene validez mediante el uso de una muestra biológica de un sujeto con cáncer y de controles que coincidan en edad y sexo, sin cáncer. Una muestra biológica que puede contener autoanticuerpos, tal como suero, se obtiene de un sujeto sospechoso de tener un cáncer en particular o sospechoso de tener predisposición a desarrollar cáncer. Un fluido orgánico similar se obtiene de un sujeto control que no tiene cáncer.

La medición de autoanticuerpos reactivos contra los antígenos de proteína anexina puede usarse para el diagnóstico temprano de enfermedades tales como cáncer de pulmón. Por otra parte, la monitorización de los niveles de autoanticuerpos puede usarse de manera pronóstica para representar la progresión de la enfermedad. La detección de autoanticuerpos en una muestra de suero de un paciente puede llevarse a cabo mediante varios métodos. Tales métodos incluyen inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo que usan técnicas tales como inmunotransferencias, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de intercalación ("sandwich"), ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, para nombrar solamente algunos.

Un inmunoensayo de este tipo se lleva a cabo por un método que comprende poner en contacto una muestra de suero derivada de un sujeto con una muestra que contiene los antígenos de proteína anexina en condiciones tales que pueda producirse una reacción de unión antígeno-anticuerpo inmuno-específica, y detectar o medir la magnitud de cualquier unión inmuno-específica por el autoanticuerpo. En un aspecto específico, una unión de este tipo de un autoanticuerpo por secciones tisulares, por ejemplo, puede usarse para detectar la presencia de un autoanticuerpo en el que la detección de un autoanticuerpo es una indicación de un estado de enfermedad. Los niveles de autoanticuerpos en una muestra de suero se comparan con los niveles presentes en una muestra de suero análoga de un sujeto que no tiene el trastorno.

Los inmunoensayos pueden llevarse a cabo de diversas maneras. Por ejemplo, un método para llevar a cabo tales ensayos implica anclar la proteína anexina a un soporte sólido y detectar los anticuerpos anti-anexina unidos específicamente a la misma. Las proteínas anexinas que deben utilizarse en los ensayos de la invención pueden prepararse a través de técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica para una proteína anexina o un fragmento antigénico de la misma pueden crearse mediante ingeniería genética para dar un vector de expresión apropiado para una preparación a gran escala de proteína anexina. Puede ser ventajoso crear proteínas de fusión que puedan facilitar el marcado, inmovilización o detección de proteína anexina. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Alternativamente, la proteína anexina puede purificarse a partir de fuentes naturales, por ejemplo, purificarse a partir de células, usando las técnicas de separación de proteínas bien conocidas en la técnica. Tales técnicas de purificación pueden incluir, pero no se limitan a la cromatografía con tamiz molecular y/o cromatografía de intercambio de iones. En la práctica, se utilizan de manera conveniente placas de microtítulo como soporte sólido para las proteínas anexinas. Las superficies pueden prepararse de antemano y almacenarse.

La presente invención se demuestra mediante ejemplos en los que se han detectado niveles elevados de autoanticuerpos circulantes reactivos contra diversos antígenos de proteína anexina en los sueros de pacientes con cáncer. Puede usarse la detección y/o medición cuantitativa de autoanticuerpos anti-anexina circulantes en suero para detectar sujetos con riesgo de padecer cáncer u otros trastornos proliferativos en los que los niveles de proteína anexina están aumentados.

5.3. Inmunoterapia

Las proteínas anexinas pueden usarse también como antígenos para inmunizar pacientes que padecen enfermedades caracterizadas por la producción de los antígenos de proteína anexina. La estimulación de una respuesta inmunológica para tales antígenos, pretende provocar un ataque más eficaz en las células tumorales; tal como, entre otros, inhibir el

crecimiento de células tumorales o facilitar la destrucción de células tumorales. La identificación de autoanticuerpos para antígenos de proteína anexina asociados a cánceres particulares proporciona una base para el inmunoterapia de la enfermedad.

5 El paciente puede inmunizarse con los antígenos de proteína anexina para provocar una respuesta inmunitaria que facilite la destrucción de células tumorales o la inhibición del crecimiento de células tumorales. Los antígenos de proteína anexina pueden prepararse usando los métodos descritos anteriormente para la purificación de proteínas.

10 Puede usarse un inmunógeno que comprende un antígeno de proteína anexina purificado para el que el paciente con cáncer ha desarrollado autoanticuerpos, para provocar una respuesta inmunitaria. Para la administración, el antígeno de proteína anexina debe formularse con un adyuvante adecuado con el fin de potenciar la respuesta inmunológica para el antígeno de proteína. Adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilos de *Calmett-Guerin*) y (*Corynebacterium parvum*). Pueden usarse muchos métodos para introducir las formulaciones derivadas anteriormente; incluyendo, pero sin limitarse a, formulaciones orales, intradérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas y subcutáneas.

5.4. Kits

20 Los ensayos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando kits diagnósticos previamente empaquetados, que comprenden al menos un péptido de anexina (para la detección de autoanticuerpos frente a Anexina) que pueden usarse convenientemente, por ejemplo, en la práctica clínica para diagnosticar trastornos tales como cáncer.

25 Un kit comprende componentes para detectar y/o medir anticuerpos IgG humanos dirigidos hacia antígeno de anexina. Como un ejemplo, en el que los anticuerpos se detectan y/o miden mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), tales componentes pueden comprender antígeno diana, en forma de al menos uno y preferiblemente una pluralidad de diferentes antígenos de anexina o epítomos de los mismos, ligados a una fase sólida, y un medio para detectar un anticuerpo humano unido a antígeno diana. Tales medios para la detección pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido hacia la región constante de IgG humana (por ejemplo, anticuerpo IgG anti-humano de conejo), que puede en sí marcarse de manera detectable (por ejemplo, con un marcador radioactivo, fluorescente, colorimétrico o enzimático), o que puede detectarse mediante un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, anticuerpo anti-conejo de cabra).

35 6. Ejemplo

Detección de autoanticuerpos específicos para proteínas anexinas y niveles aumentados de la expresión de la proteína anexina en muestras derivadas de pacientes con cáncer

40 Usando los métodos de la presente invención, se detectó la reactividad contra las proteínas anexinas en sueros obtenidos de sujetos con cáncer. Se encontró que las muestras de suero de los sujetos con cáncer eran reactivas contra las proteínas anexinas. Además, se observaron niveles aumentados en la producción de proteínas anexinas en muestras tisulares derivadas de sujetos con cáncer.

45 6.1 Materiales y métodos

6.1.1. Reactivos

50 Todos los reactivos de cultivo celular, incluyendo el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, que contiene L-glutamina, piruvato de sodio y clorhidrato de piridoxina), la solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco, suero bovino fetal y penicilina/estreptomina se obtuvieron de GIBCO-BRL (Grand Island, N.Y.). Se obtuvieron anticuerpos monoclonales anti-Anexina I y II de ratón de ICN (Costa Mesa, C.A). Se compraron anticuerpos monoclonales IgM anti-humanos de ratón en la empresa Sigma Chemical (St. Louis, MO). Se adquirieron anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-humanos de ratones conjugados con peroxidasa de rábano picante en la empresa Zymed (San Francisco, CA). Se obtuvieron anticuerpos IgG anti-humanos de oveja conjugados con peroxidasa de rábano picante y anticuerpos monoclonales IgG anti-ratón, el kit ECL (de quimioluminiscencia intensificada) y la película Hyperfilm MP de Amersham (Arlington Heights, IL). Se compraron membranas Immobilon-P de PVDF (poli(fluoruro de vinilideno)) en Millipore Corp. (Bedford, Mass.). La acrilamida usada en la primera electroforesis dimensional, la urea, el persulfato de amonio y la PDA (piperazina diacrilamida) se compraron todos en Bio-Rad (Rockville Center, N.Y.). La acrilamida usada en la segunda electroforesis dimensional se compró en Serva (Crescent Chemical, Hauppauge, N.Y.) y los anfólitos portadores (pH de 4 a 8) y el NP-40 se compraron ambos en Gallard/Schlessinger (Carle Place, N.Y.). Todos los demás reactivos y productos químicos se obtuvieron o bien de Fisher o bien de Sigma y eran de la mayor pureza disponible.

6.1.2. Cultivo celular y preparación de extractos

65 Se cultivaron líneas celulares de adenocarcinoma humano A549 a 37°C en una incubadora humidificada con el 6% de CO₂ en DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina. Se hicieron pases semanales de las células hasta que habían alcanzado una confluencia del 70-80%.

Se obtuvo tejido tumoral fresco en el momento del diagnóstico (por ejemplo, tejido de biopsia) de pacientes con cáncer de pulmón. El protocolo experimental fue aprobado por el "Institutional Review Board for Approved Research Involving Human Subjects" (Consejo de revisión institucional para la investigación aprobada que implica sujetos humanos) de la Universidad de Michigan. Antes del estudio se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes (o de sus familias). Tras la escisión, se congeló inmediatamente el tejido tumoral a -80°C, tras lo cual se solubilizaron cantidades reducidas de tejido tumoral en tampón de solubilización y se conservaron a -80°C hasta su uso. Se lisaron las células cultivadas por adición de 200 μ l de tampón de solubilización que comprendía urea 8 M, NP-40 al 2%, anfólitos portadores al 2% (pH de 4 a 8), β -mercaptoetanol al 2% y PMSF 10 mM, y se recogieron usando un rascador de células. Tras añadir 100 μ l adicionales de tampón de solubilización, se transfirió la disolución que contenía los extractos celulares a tubos de microfuga y se conservaron a -80°C hasta su uso.

6.1.3. Page 2-d e inmunotransferencia

Se separaron proteínas derivadas a partir de extractos, tanto de células cultivadas como de tumores sólidos, en dimensiones tal como se describió previamente (Strahler *et al.*, 1989, Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. En "Protein Structure: A Practical Approach" T.E. Creighton (ed.) IRL Press, Oxford, R.U., págs. 65-92), con algunas modificaciones. Brevemente, tras la lisis celular en tampón de solubilización, se aplicaron 35 μ l de alícuotas de células cultivadas o de tejido tumoral solubilizadas derivadas de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células sobre geles de isoenfoque. Se llevó a cabo un isoelectroenfoque usando anfólitos portadores con un pH de 4 a 8 a 700 V durante 16 h, seguido de 1000 V durante 2 h adicionales. Se cargó el gel de tubo de primera dimensión sobre un casete que contenía el gel de segunda dimensión, tras equilibrado en un tampón de muestra de segunda dimensión (Tris 125 mM (pH 6,8), que contenía glicerol al 10%, SDS al 2%, ditiotretitol al 1% y azul de bromofenol). Para la separación de segunda dimensión, se usó un gradiente de acrilamida de desde el 11% hasta el 14%, y las muestras se sometieron a electroforesis hasta que la parte delantera del colorante había alcanzado el extremo opuesto del gel. Se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de PVDF Immobilon-P. Se visualizaron los patrones de proteína en algunos geles mediante tinción con plata, y en algunas membranas Immobilon-P mediante tinción de las membranas con azul de Coomassie. Se incubaron las membranas no teñidas preparadas para la hibridación con tampón de bloqueo (que comprendía solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía el 1,8% de leche en polvo desnatada y el 0,1% de Tween 20) durante 2 h, luego se lavó y se incubó con suero obtenido o bien de pacientes, o con suero control normal (300 μ l de suero, a una dilución de 1:100) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados con tampón de bloqueo, se incubaron las membranas con un anticuerpo IgG anti-humano de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante (a una dilución de 1:1000) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas 5 veces con TBS que contenía el 0,1% de Tween 20, una vez en TBS, se incubaron brevemente en ECL y se expusieron a HyperfilmTM MP durante 10-30 min. Se compararon directamente los patrones visualizados tras la hibridación con los sueros de pacientes, tanto con las inmunotransferencias teñidas con azul de Coomassie de la misma muestra para determinar la correlación con proteínas, así como con los patrones obtenidos de la hibridación de las inmunotransferencias derivadas de la misma muestra con los sueros de pacientes con otros tumores sólidos o sueros control para determinar la especificidad de los autoantígenos. Alternativamente, se incubaron membranas con un anticuerpo IgM anti-humano de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante y se procesaron para incubaciones con un anticuerpo IgG anti-humano.

Adicionalmente, se caracterizaron las manchas de proteína tanto en los tumores como en los lisados de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón que se visualizaron con los sueros de paciente, pero no con los sueros control. Se sometieron los lisados celulares de A549 a PAGE 2-D, tras lo cual se transfirieron las proteínas separadas a membranas Immobilon-P y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie. Se cortaron las manchas de proteína de interés de la membrana y se sometieron a una secuenciación de aminoácidos N-terminal y análisis espectrométrico de masa. Se utilizaron las secuencias resultantes y masas peptídicas para búsquedas en bases de datos para una identificación proteica.

6.1.4. Detección de anexina I y anexina II mediante inmunotransferencia

Se utilizaron dos anticuerpos monoclonales de anti-Anexina I y II. Se usaron estos anticuerpos primarios a una dilución de 1:5000 en ensayos de inmunotransferencia y se procesaron para incubaciones con sueros de paciente.

6.2 Resultados

6.2.1. Reactividad de sueros de pacientes con cáncer de pulmón con una proteína de cáncer de pulmón detectada mediante análisis de inmunotransferencia

Se separaron proteínas celulares de A549 mediante PAGE 2-D y se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P. Para el análisis de inmunotransferencia, se trató cada membrana con una muestra de suero. Las muestras incluían sueros obtenidos en el momento del diagnóstico de 18 pacientes con adenocarcinoma de pulmón, 11 pacientes con carcinoma de pulmón de células escamosas, 4 con carcinoma de pulmón de células pequeñas, 2 con carcinoma de pulmón de células grandes, 19 con cáncer de pulmón sin clasificar; 37 pacientes con otros tipos de cáncer (11 con cáncer de mama, 7 con melanoma, 11 con cáncer de hígado, y 8 con cáncer de esófago; y de 15 sujetos sanos sin historia previa de cáncer o enfermedad autoinmunitaria.

En la figura 1 se muestra un ejemplo de un gel de 2-D de células A549 teñidas con plata. La hibridación de las membranas usando sueros de paciente como anticuerpo primario e IgG anti-humano de oveja como anticuerpo secundario revelaron patrones variables de reactividad entre sueros de paciente con cáncer de pulmón. Las hibridaciones duplicadas dieron como resultado patrones similares. En general, se observaron diversas manchas reactivas con la mayoría de los sueros. Se observaron algunas de las manchas reactivas con sueros control y de este modo, se consideró que representaban una reactividad no específica. Otros se restringieron a sueros de paciente con cáncer de pulmón. Lo más destacable entre estos últimos fue su intensa reactividad en un grupo de manchas de proteínas contiguas denominado A1, con un pI de entre 6,3 y 6,8 y un PM de 37 kDa (figura 2), que se observó con sueros de 8 de 18 pacientes con adenocarcinoma de pulmón, 4 de 11 pacientes con carcinoma de pulmón de células escamosas, 1 de 4 pacientes con carcinoma de pulmón de células pequeñas, y 2 de 19 pacientes con cáncer de pulmón sin clasificar y que estaba ausente en membranas de A549 hibridadas con sueros de individuos normales. Un segundo grupo de manchas de proteínas contiguas denominado A2 (figura 3), con un pI de entre 7,2 y 7,8 y un PM de aproximadamente 36 kDa se observó con sueros de 7 de 18 pacientes con adenocarcinoma de pulmón, 3 de 11 pacientes con carcinoma de pulmón de células escamosas, 2 de 4 pacientes con carcinoma de pulmón de células pequeñas, y 6 de 19 pacientes con cáncer de pulmón sin clasificar pero estaban ausentes en sueros de individuos normales. En total, 11 de 18 sueros de pacientes con adenocarcinoma de pulmón y 6 de 11 sueros de pacientes con carcinoma de pulmón de células escamosas y 3 de 4 con carcinoma de pulmón de células pequeñas mostraron reactividad hacia A1 y/o A2.

6.2.2. Inmunorreactividad de IgM contra proteínas de cáncer de pulmón

Para determinar si los sueros que mostraron inmunorreactividad basada en IgG contra proteínas A1 y/o A2 también mostraron inmunorreactividad basada en IgM, se incluyeron en este análisis el suero de tres pacientes con adenocarcinoma de pulmón que mostró inmunorreactividad basada en IgG contra A1 y/o A2 y de dos controles negativos. Se hibridaron membranas que contenían lisados de A549 con sueros de paciente y control y posteriormente se incubaron con un anticuerpo IgM anti-humano de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante. Sólo el suero de paciente que mostró reactividad basada en IgG contra A1 y A2 mostró reactividad basada en IgM contra estas dos proteínas de conjunto contiguas (figura 3).

6.2.3. Inmunorreactividad de los subtipos de IgG contra proteínas de cáncer de pulmón

Para determinar el subtipo de IgG de sueros que mostraron inmunorreactividad basada en IgG contra proteínas A1 y/o A2, se incluyeron en este análisis el suero de tres pacientes con adenocarcinoma de pulmón que mostró inmunorreactividad de IgG contra las proteínas A1 y/o A2 y de dos controles negativos. Se hibridaron membranas que contenían lisados de A549 con sueros de paciente y control y posteriormente se incubaron con un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 anti-humano de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante. Sólo los sueros de paciente que mostraron reactividad basada en IgG contra A1 y/o A2 mostraron reactividad basada en IgG1 contra estos dos conjuntos contiguos de proteínas (figura 4).

6.2.4. Especificidad de los anticuerpos IgG de A1 y A2 hacia el cáncer de pulmón

Se hibridaron membranas que contenían lisados de A549 con sueros de pacientes con melanoma, cáncer de mama, cáncer de hígado o cáncer de esófago. Ninguno de los sueros mostró inmunorreactividad basada en IgG contra las proteínas A2 y A1 con sueros de pacientes con cáncer de esófago (5/8) (figura 5), con sueros de pacientes con cáncer de mama (1/11), pero estaban ausentes en sueros de pacientes con melanoma (0/7) y cáncer de hígado (0/11).

6.2.5. Reactividad de sueros de pacientes con cáncer de pulmón con isoformas de Anexina I Y II

Para determinar la identidad de las proteínas A1 y A2, se prepararon membranas adicionales de lisados celulares de adenocarcinoma de pulmón de A549 y se visualizaron las proteínas mediante tinción con azul de Commassie. Se cortaron las manchas de A1 y A2 de las membranas, se eluyeron y se sometieron a digestión con tripsina. Se analizaron fragmentos peptídicos mediante espectrometría de masas. Para secciones contiguas, se cortaron las denominadas A1a, A1b (justo a la izquierda de A1a, es decir, más ácida), A1c (justo a la izquierda de A1b, es decir, más ácida) y A1d (justo a la izquierda de A1c, es decir, más ácida) de las inmunotransferencias. Estas cuatro áreas comprendieron, en total, toda la región A1 que era inmunorreactiva. Los análisis espectrométricos de masas de los péptidos derivados de estas secciones revelaron que las variantes de Anexina I y Anexina II eran las isoformas de Anexina I predominantes presentes excepto la sección A1a que no produjo ningún resultado. Para las proteínas A2, se cortaron dos secciones contiguas, denominadas A2a y A2b (justo a la izquierda de A1b, es decir más ácida) de las inmunotransferencias. Los análisis espectrométricos de masa de los péptidos derivados de estas secciones revelaron que la variante de Anexina II (A2a) y la variante de Anexina II (A2b) eran las isoformas de Anexina II predominantes presentes. Adicionalmente, las manchas de A1 y A2 se cortaron de las membranas y se sometieron a secuenciación N-terminal directa. Dado que las anexinas estaban bloqueadas de forma N-terminal por acetilación, no se obtuvieron resultados.

6.2.6. Confirmación adicional de las isoformas de Anexina I Y II

Para confirmar que las manchas de A1 y A2 consistían en una mezcla de Anexina I y Anexina II respectivamente, se hibridaron membranas preparadas a partir de ambas líneas celulares de adenocarcinoma de A549 con o bien un anticuerpo monoclonal de ratón comercialmente disponible que reacciona con Anexina I, o bien con el anticuerpo monoclonal frente a Anexina II de ratón. Se compararon los patrones de inmunorreactividad obtenidos tanto con

ES 2 320 585 T3

las inmunotransferencias teñidas con azul Commassie del mismo tipo de lisado celular como con los patrones de inmunorreactividad observados con sueros de pacientes con cáncer de pulmón. Los anticuerpos anti-Anexina I, y anti-Anexina II inmunorreaccionaron con las proteínas en las manchas de A1 y A2 visualizadas respectivamente con sueros de pacientes con cáncer de pulmón (figura 6). Sorprendentemente, se observaron diversas manchas inmunorreactivas de bajo peso molecular adicionales resultado de la hibridación de ambos anticuerpos monoclonales anti-Anexina I y II utilizados. Estas manchas no han mostrado inmunorreactividad con ningún suero de paciente sometido a ensayo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 585 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una proteína anexina seleccionada de Anexina I y Anexina II para detectar autoanticuerpos para antígeno de proteína anexina en una muestra biológica derivada de un sujeto sospechoso de tener cáncer de pulmón.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que se usa la proteína anexina para diagnosticar adenocarcinoma de pulmón o carcinoma de pulmón de células escamosas.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la muestra biológica es una sección de tejido o muestra de suero.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

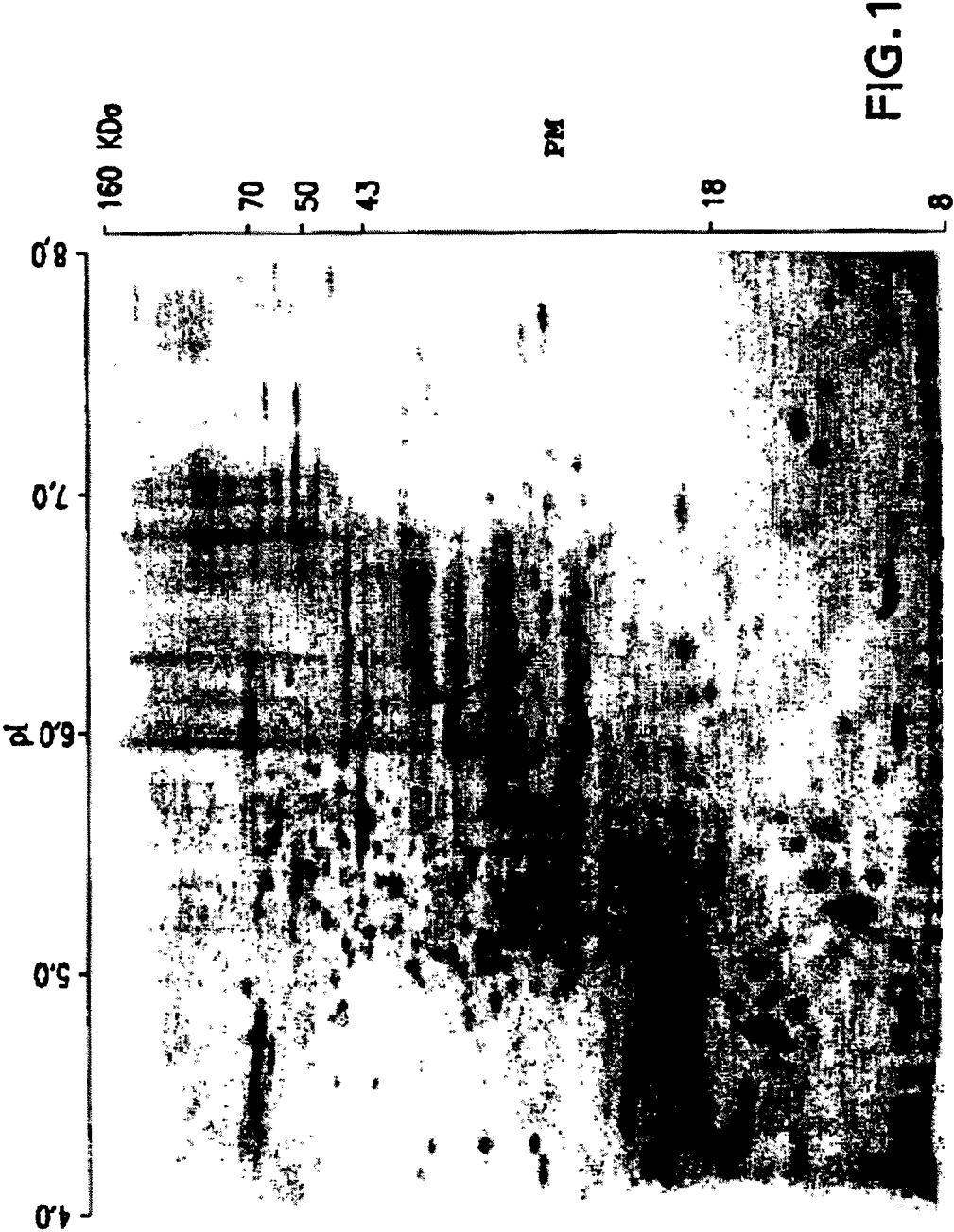
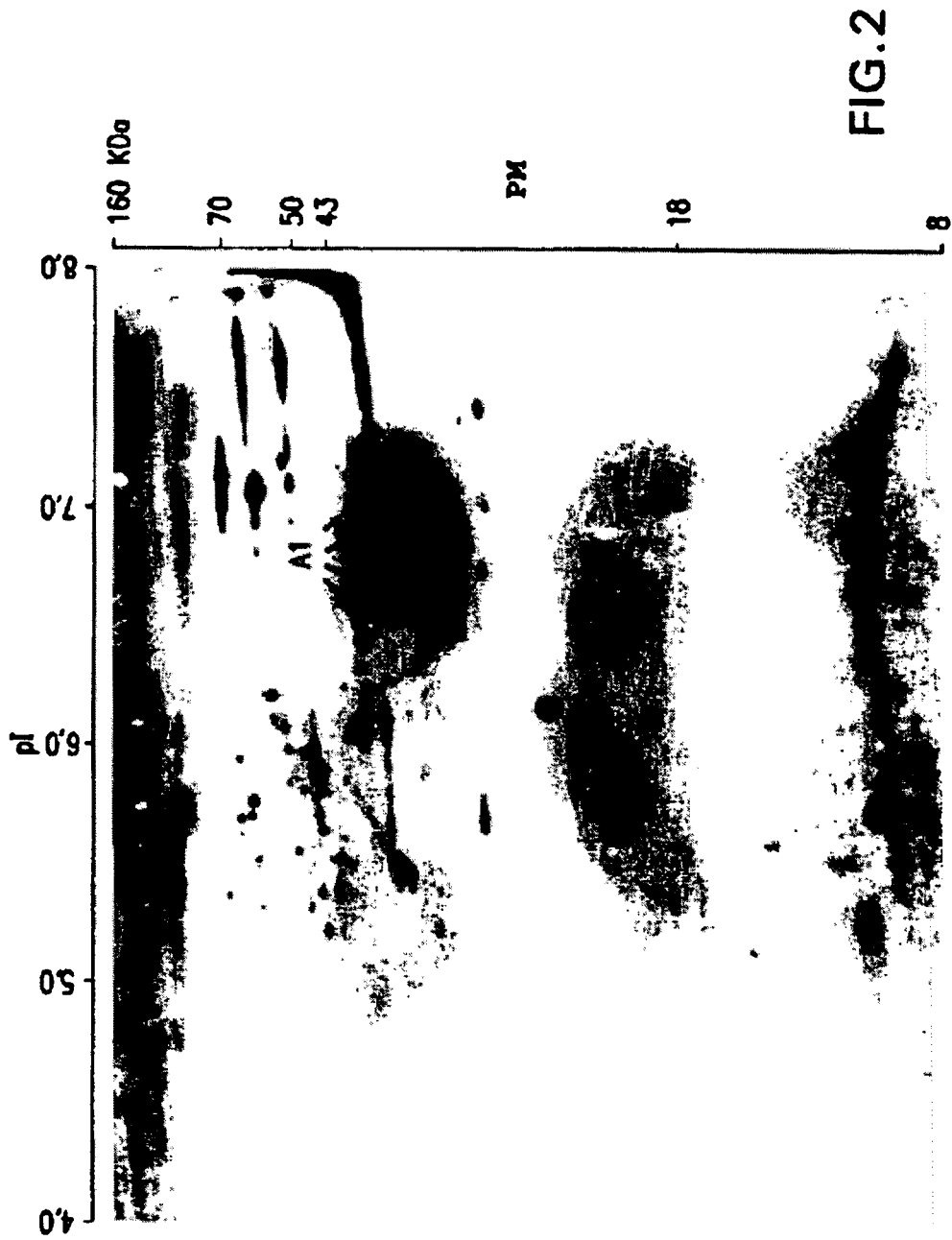


FIG.1



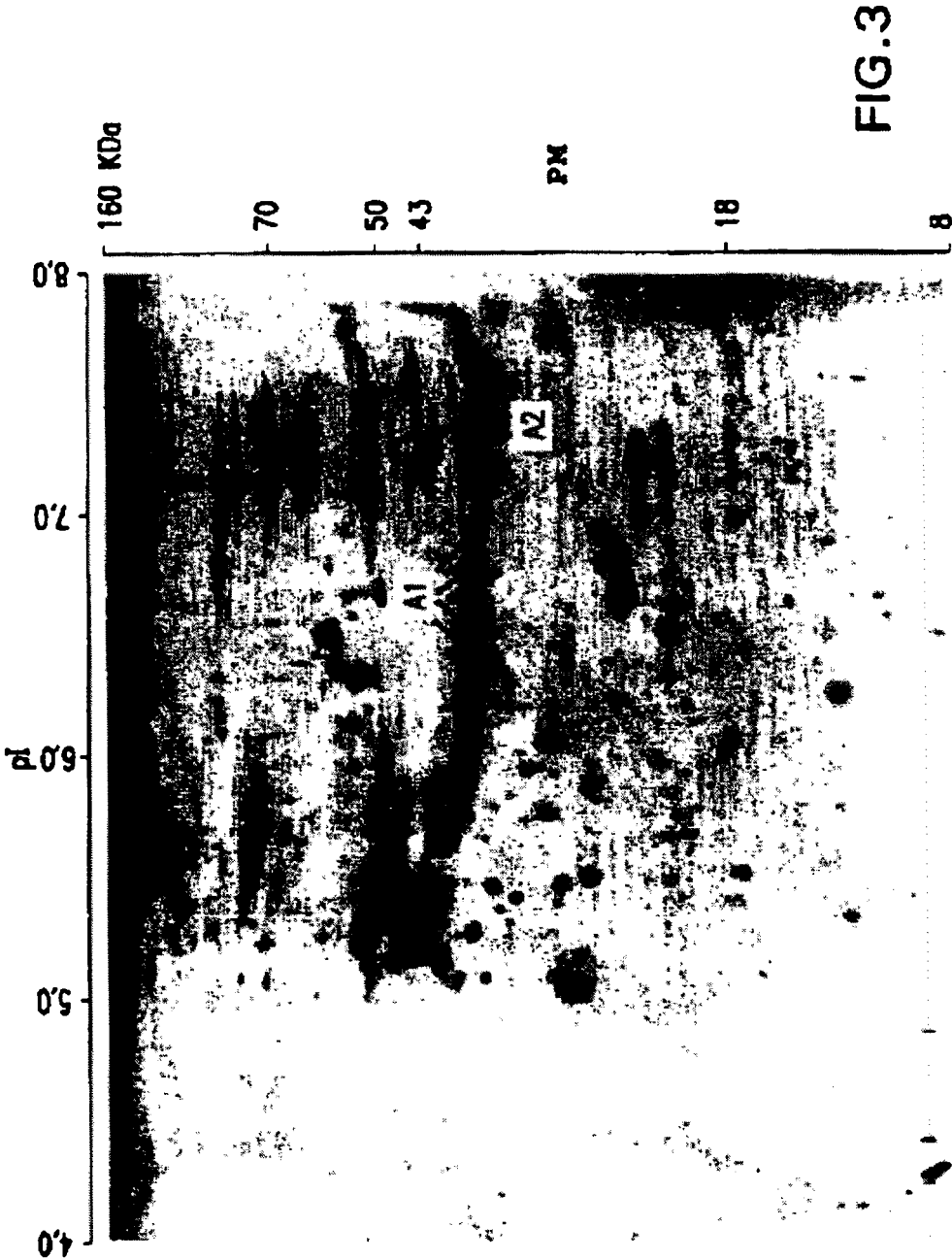


FIG.3

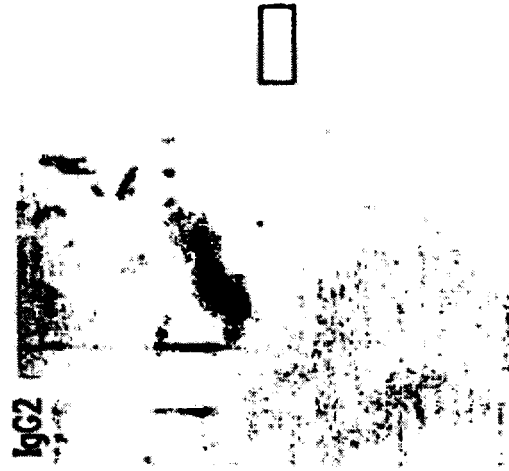


FIG.4B



FIG.4A



FIG. 4D

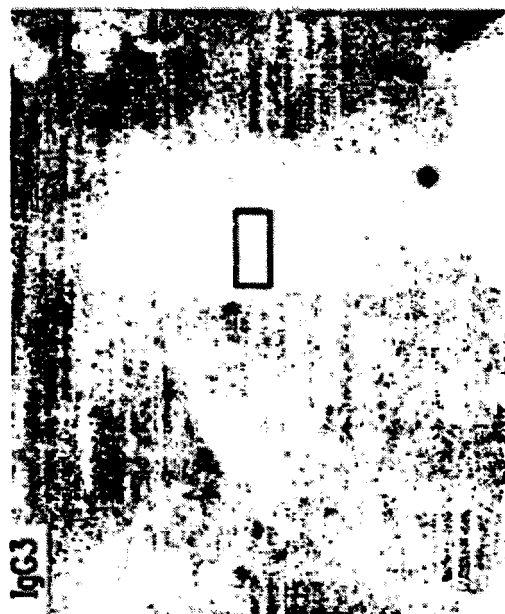
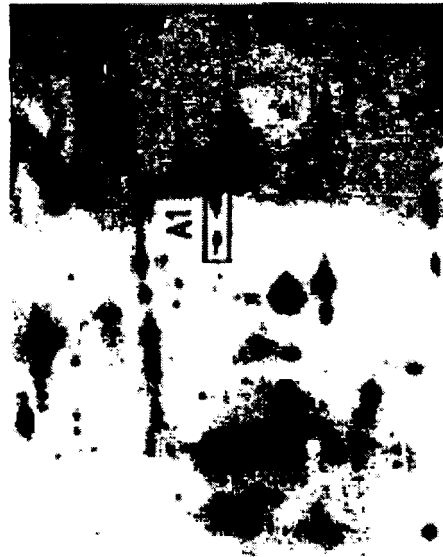


FIG. 4C



SUERO DE PACIENTE CON CÁNCER DE ESÓFAGO

FIG.5A



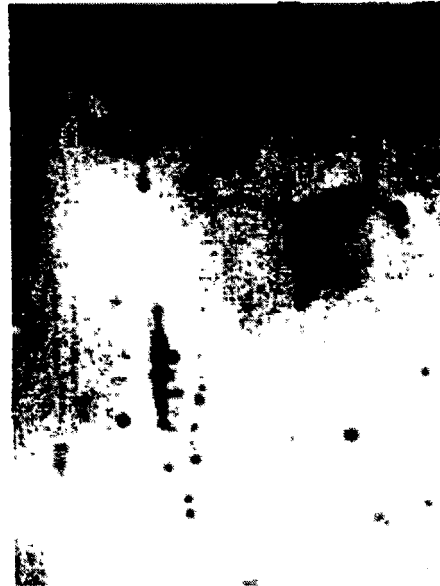
SUERO DE PACIENTE CON CÁNCER DE MAMA

FIG.5B



SUERO DE PACIENTE CON CÁNCER DE HÍGADO

FIG.5D



SUERO DE PACIENTE CON MELANOMA

FIG.5C

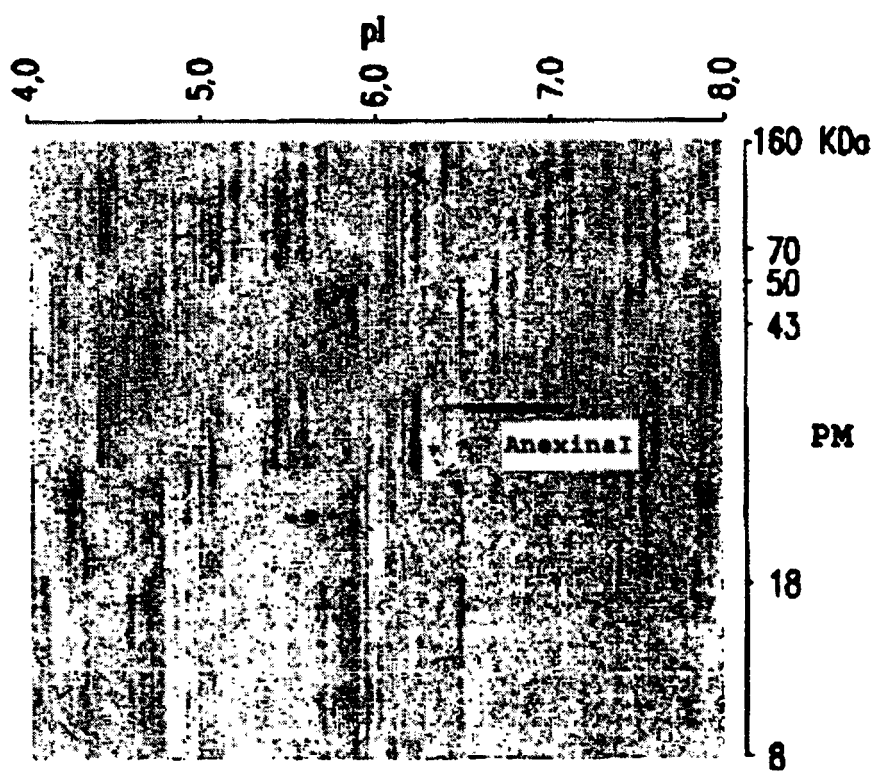


FIG.6A

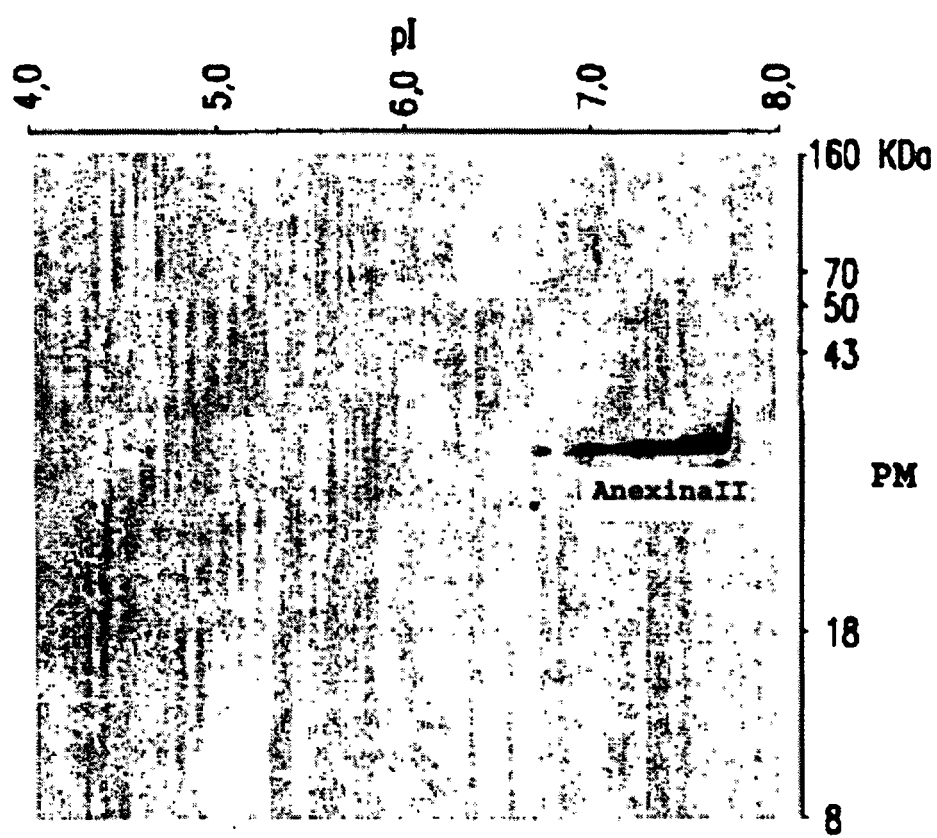


FIG.6B