



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 512**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06743012 .4**

96 Fecha de presentación : **22.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1889067**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Anexina para averiguar el riesgo de un cáncer.**

30 Prioridad: **21.05.2005 EP 05011042**  
**30.11.2005 EP 05026092**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.07.2011**

73 Titular/es: **PROTEOSYS AG.**  
**Carl-Zeiss-Strasse 51**  
**55129 Mainz, DE**

72 Inventor/es: **Cahill, Michael y**  
**Schrattenholz, André**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

**ES 2 362 512 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

Anexina para averiguar el riesgo de un cáncer

5 El presente invento se refiere al diagnóstico de un cáncer de próstata, particularmente de los tractos urogenital y/o intestinal.

El cáncer es una de las causas principales de muerte de seres humanos en la civilización occidental y con frecuencia está vinculado con dificultades en lo que respecta a su diagnóstico.

10 Por ejemplo, el cáncer de próstata es una de las causas principales de muerte por cáncer en seres humanos, pero es una enfermedad heterogénea que es difícil de diagnosticar. Es casi imposible predecir el curso que adoptará un tumor individual. El estado actual de los marcadores de cánceres de próstata para diagnóstico está basado esencialmente en diferentes isoformas de un antígeno específico de la próstata (PSA, acrónimo de prostate specific antigen) y en su totalidad no es satisfactorio, al proporcionar falsos resultados negativos y falsos resultados positivos. Recientemente, se han sugerido diversos marcadores moleculares alternativos, procedentes de fluidos corporales o de un tejido de próstata. Se han identificado por lo menos tres diferentes subclases de cáncer de 15 próstata, que parecen relacionados con el grado del tumor y con la incidencia de recurrencias y metástasis. La sintasa de ácidos grasos por sí sola define diferentes signaturas moleculares para un cáncer de próstata. Además, está remanente una urgente necesidad de parámetros terapéuticos y diagnósticos más elaborados y confiables para caracterizar a los pacientes de acuerdo con su riesgo de progresión, con el fin de desarrollar nuevas estrategias de terapias multimodales apropiadas para tener un control mejorado de un cáncer individual.

20 El documento de solicitud de patente internacional WO 2004/079368 A se refiere a unos enfoques proteómicos para identificar a unas proteínas que son expresadas en células de cáncer pero no en tejidos normales. Entre las proteínas dianas se menciona a una anexina A4.

25 El documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2004/096916 A1 se refiere a unos marcadores de tumores que se pueden usar para escrutar, diagnosticar, pronosticar e identificar subtipos de un carcinoma de células renales. Entre las proteínas que se han de usar como marcadores de tumores se mencionan las anexinas II, IV y V.

El documento US 2004/033502 A1 describe, entre otros, unos métodos para diagnosticar un cáncer esofágico en pacientes, que comprende la etapa de detectar el nivel de expresión en una muestra de tejido de dos o más genes específicos; se menciona a una anexina A10 como un posible gen diana.

30 El documento US 2003/232399 A1 describe métodos y composiciones para identificar y utilizar marcadores de tumores presentes en fluidos corporales, que se pueden usar más tempranamente en el proceso de una enfermedad y que no dependen de ningún fármaco contra tumores por sí mismo. Las anexinas I y II son mencionadas en una lista de marcadores para su inclusión en una lista de antígenos marcadores tumorales.

35 El documento US 2003/175736 A1 se refiere a composiciones y métodos para diagnósticos de cánceres, inclusive marcadores de cánceres. Entre otros, se describe un método para caracterizar a un tejido de próstata en un individuo, que comprende la detección de un marcador tal como una anexina A1, una anexina A4 y una anexina A11.

40 El documento US 2003/165954 A1 se refiere a perfiles y marcadores genéticos de cánceres y proporciona sistemas y métodos para escrutar unos fármacos que son efectivos para específicos pacientes y tipos de cánceres. La generación de un perfil de sensibilidad a los fármacos puede comprender la detección de un nivel de expresión en un gen de sensibilidad a los fármacos, p.ej. el ANXA4.

El documento US 2003/152923 A1 describe un sistema para diagnosticar formas agresivas de un melanoma maligno, que se basan en la expresión de ciertos genes de marcadores, entre los cuales se menciona a una anexina A2, dentro de una muestra de tumor.

45 El documento US 2002/168696 A1 concierne a unos métodos de escrutinio para la evaluación de diagnóstico y pronóstico de un cáncer. Por ejemplo, se proporcionan métodos para detectar una sobreproducción de proteínas anexinas I y II.

Lee y colaboradores (Journal of Chromatography B, volumen 815, páginas 203-213, 2005) se refieren a la revelación de enfermedades urológicas por técnicas proteómicas. Se menciona que en muestras de tejidos de cáncer renal, una anexina I y una anexina IV son reguladas ascendentemente.

Alaiya y colaboradores (Journal of Chromatography B, volumen 787, páginas 207-222, 2003) se refieren al perfilamiento de la expresión de proteínas en cánceres humanos de pulmón, mama, vejiga, renales, colorrectales y ováricos. Se mencionan diversas proteínas marcadoras de tumores, pero no anexinas.

5 Vaarala y colaboradores (Laboratory Investigation, volumen 80, páginas 1259-1269, 2000) se refieren a unos genes expresados diferencialmente dentro de linajes de células de cáncer de próstata LNCaP que reflejan cambios producidos durante la progresión de un cáncer de próstata. Entre los genes que se confirmó que eran expresados diferencialmente se encontraba una anexina I.

Ninguno de estos documentos menciona a una anexina A3.

10 El documento US 2003/108963 A1 se refiere a una diversidad de marcadores de cánceres, entre ellos a una anexina A3. En particular, fueron perfiladas unas muestras de ARN que se derivan de muestras de tejidos de próstata y tejidos que no son de próstata; y las que presentaban un aumento en la expresión en especímenes de tumores de próstata se seleccionaron para la secuenciación ulterior. Sin embargo, no se proporcionan datos concernientes a una proteína anexina A3.

El invento, en su forma más amplia, es definido en la reivindicación 1.

15 Un método para diagnosticar un cáncer de próstata para efectuar una discriminación entre un tejido de próstata canceroso y otro no canceroso, que comprende las etapas separadas de  
 - determinar la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 intracelular y/o  
 - determinar la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 extracelular,  
 20 usando muestras de orina o fracciones de las mismas, en las que se observan en el estado canceroso unos niveles más bajos de una anexina A3, y en donde las muestras de orina o las fracciones de las mismas se obtienen a partir de una orina exprimida.

25 Después de la determinación de las abundancias intra- y extracelulares de por lo menos una proteína anexina se pueden determinar las relaciones de la abundancia extracelular por encima de la abundancia intracelular o al revés. Preferiblemente, se determinan las relaciones de la abundancia extracelular por encima de la abundancia intracelular. Las relaciones obtenidas son unos ventajosos parámetros de diagnóstico para un cáncer y/o para la discriminación entre un tejido canceroso y otro no canceroso.

De acuerdo con el presente invento, se entiende el término "extracelular" como el espacio extracelular que incluye a la superficie exterior de membranas plasmáticas de células.

30 De acuerdo con el presente invento, el término "tejido no canceroso" abarca un tejido sano y un tejido patógeno, en particular una hiperplasia prostática benigna, una prostatitis crónica, la enfermedad de Crohn, una colitis ulcerosa, un tejido inflamable y las fibrosis, en particular las fibrosis secundarias.

De acuerdo con el presente invento, se entiende el término "abundancia" como el nivel y la concentración intracelular y/o extracelular respectivamente de una proteína.

35 De acuerdo con el presente invento, los términos de "proteína anexina" y de "proteína" en general comprenden isoformas, mutantes, versiones truncadas y formas de las mismas que han sido modificadas después de la traducción. Las formas modificadas después de la traducción pueden incluir en particular unas formas proteínicas obtenibles mediante un tratamiento proteolítico.

40 En el caso de una forma preferida de realización, se determina la abundancia de una proteína anexina A3 conjuntamente con la abundancia de por lo menos una proteína anexina adicional. Con respecto a dicha proteína adicional, se hace referencia a la descripción que sigue.

Aquí se describe también que la abundancia de por lo menos una proteína anexina es determinada conjuntamente con la abundancia de una pequeña molécula o de un pequeño marcador de ácido nucleico.

45 Las anexinas son unas proteínas que fijan calcio, que se cree que influyen sobre diferentes funciones intra- y extracelulares, incluyendo el tráfico a través de membranas, la migración de linfocitos, la movilidad de células, el flujo de calcio y la transducción de señales. Ellas son altamente abundantes, y el volumen dependiente del calcio, que enmascara a los lípidos membranales cargados negativamente, puede ser importante para la función de una anexina.

50 En un anterior estudio proteómico, que compara la abundancia diferencial de proteínas entre unos tejidos benignos y tumorales procedentes de 31 pacientes de cáncer de próstata, los autores del invento han identificado a una anexina A3 como la más abundante diferencialmente de diversas maneras en tumores, y que representa potencialmente un

marcador de diagnóstico para diferentes subtipos de cáncer de próstata. Una anexina A3 es un miembro relativamente infrecuente de la familia de las anexinas, que era regulado ascendentemente en un promedio de 2,4 veces a lo largo de todos los 31 pacientes (entre 1,1 y 5,4 veces con una confianza de 95 %;  $P = 0,045$ ). En un subconjunto de ensayo de 22 pacientes, que había sido sugerido por análisis de conjuntos, una anexina A3 era regulada ascendentemente en un promedio de 4,4 veces (entre 2,2 y 9,1 veces con una confianza de 95 %;  $P = 0,0008$ ), sugiriendo que en ciertos tipos de tumores la abundancia de una anexina A3 puede estar implicada en el fenotipo canceroso. Acerca de más detalles, se hace referencia a la solicitud de patente PCT/EP2005/001567.

Se informa que varias anexinas son reguladas descendentemente en asociación con un cáncer de próstata, incluyendo a una anexina A1, una anexina A2, una anexina A4, una anexina A7 y una anexina A10. Se ha informado también de “algún valor diferencial (de una anexina A3) entre un tejido de próstata maligno y otro benigno”. Recientemente, se ha mostrado que una anexina A3 es necesaria para la replicación del ADN en hepatocitos cultivados, y parece ser que es expresada en más alto grado en hepatocitos pequeños, que tienen mayores tasas potenciales de crecimiento y de proliferación que los hepatocitos del parénquima. Los resultados obtenidos por los autores del invento sugieren que una anexina A3, que típicamente es un miembro raro de esta familia, puede proporcionar por lo tanto un biomarcador o una diana o un principio terapéutico para el tratamiento de un cáncer de ciertos pacientes.

Las anexinas se encuentran en el citoplasma, pero también son halladas extracelularmente, aunque ellas carecen de secuencias líderes secretoras. Por ejemplo, una anexina A3 ha sido identificada como un antígeno para anticuerpos anti-esperma implicados en la infertilidad de los varones. Se encontró también que una anexina A1 era expuesta sobre superficies epiteliales en la vecindad de tumores sólidos de pulmón, y que la administración de un anticuerpo marcado radiológicamente contra la proteína causaba la regresión de tumores en experimentos con animales. Desde luego, la translocación de una anexina A5 a superficies de células está asociada con una apoptosis, y una anexina A1, también conocida como lipocortina 1, es liberada hacia el espacio extracelular en grandes abundancias a partir de neutrófilos y monocitos/macrófagos como un agente antiinflamatorio. De hecho, una anexina A1 puede ser el mediador principal del efecto antiinflamatorio de ciertos glucocorticoides.

No hay ningún mecanismo para la secreción de anexinas que se haya informado que combine una secreción, especialmente la expulsión celular de una anexina A3, la ruta de los exosomas y una regulación alterada de la vigilancia inmunitaria de la próstata. Los exosomas son unas vesículas membranales con un diámetro de 30 a 100 nm, que se producen y segregan in vitro por células vivas de diverso origen, y que se piensa que están implicados en la transferencia de antígenos tumorales a células presentadoras de antígenos, así como en la estimulación de respuestas inmunitarias específicas. Ciertos miembros de la familia de las anexinas, incluyendo a una anexina A3 y a una anexina A8, son hallados corrientemente en exosomas.

Se ha supuesto que los exosomas están implicados en la liberación de proteínas de choque térmico hacia el entorno extracelular en la ausencia de una necrosis celular. El entorno de exosomas luminares podría permitir los bajos valores del pH que son necesarios para la función in vivo de los canales de iones de anexinas propuestas, que ha sido discutida controvertidamente a causa de la incompatibilidad con la viabilidad de ciertas células. Desde luego, los casos informados de canales de iones de anexinas, fisiológicos, que se presentan en las vesículas de matriz que están implicadas en la formación de osteoblastos en huesos y en la diferenciación terminal y la muerte de los condrocitos, ambas de las cuales son unas circunstancias atípicas de una viabilidad celular normal. De acuerdo con los autores del invento, los canales de iones de anexinas podrían estar implicados en la rotura osmótica de vesículas de exosomas (ya sea dentro de vesículas multivesiculares antes de una fusión secretora con la membrana citoplasmática, o bien extracelularmente) y de esta manera modulan a un medio extracelular de tumores u otros tejidos, tales como un hueso en el caso de una osteoporosis.

Recientemente, se ha informado de que unas células de tumores irradiados son fagocitadas eficientemente por macrófagos, pero que cuando una fosfatidilserina de superficie de células es enmascarada por una anexina A5, la ruta de los macrófagos es reducida y se produce una fuerte respuesta inmunitaria dependiente de células dendríticas CD8+. En lo que se refiere a lo anterior, una anexina A1 es un modulador antiinflamatorio que reduce el reclutamiento de neutrófilos, y de esta manera reduce la inflamación de ciertos tejidos. Ella se fija a específicos receptores de ALX (lipoxina A) extracelulares en neutrófilos y en macrófagos, y de esta manera puede modular la fagocitosis de macrófagos. En el sitio de la acción dentro de los tejidos, una anexina A1 y su péptido terminal de N (Ac2-26) favorecen la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos, reduciendo de esta manera el nivel de inflamación y la respuesta inmunitaria a través de citocinas antiinflamatorias, tales como el TGF (acrónimo de Transforming Growth Factor = factor de crecimiento en transformación)- $\beta$ 1, y, correspondientemente, la proliferación de células T inducida por antígenos, de células Th1 (T 1 cooperadoras) y Th2 (T 2 cooperadoras) es también inhibida por el péptido Ac2-26. Unos cambios de una anexina A3 en tumores pueden influir sobre la vigilancia inmunitaria de un tejido de próstata por alteración de las propiedades y/o de la concentración de la agrupación de anexinas extracelulares, y modular de esta manera la interacción entre una respuesta dominada por macrófagos/granulocitos y una respuesta humoral.

De acuerdo con una forma de realización del presente invento, la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 es determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos una proteína anexina, preferiblemente del

grupo que consiste en una anexina A1, una anexina A2, una anexina A3, una anexina A4, una anexina A5, una anexina A6, una anexina A7, una anexina A8 y una anexina A10.

5 En el caso de una forma de realización adicional del presente invento, la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 es determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos una proteína adicional del grupo que consiste en el amiloide P de suero, la isopeptidasa T, la proteína de fijación de ácidos grasos del tipo muscular, la galectina 1, la proteína de choque térmico 90, una BiP (proteína humana: precursora de proteína regulada por glucosa P11021 - 78 kDa, la GRP 78, la proteína de fijación de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, la proteína de fijación de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del retículo endoplasmático grp 78), la proteína disulfuro isomerasa, la proteína de fijación de ácidos grasos de tipo epidérmico, la enoíl coenzima A hidratasa y la nucleofosmina.

10 Además, la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 puede ser determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos una proteína adicional del grupo que consiste en la familia 14-3-3, un proteosoma, particularmente un prosoma y/o macrodolor (macropain), la subunidad 2 de activador, la familia de las citoqueratinas, la proteína alfa KNP-1 (NÚMERO DE ACCESO AL NCBI BAA95554.1 GI:7768772) y la proteína beta KNP-I (NÚMERO DE ACCESO AL NCBI BAA21139.1 GI:2250701).

15 En algunos casos, es limitado el valor como diagnóstico de los marcadores de tumores convencionales para una diagnosis. Por ejemplo, unos valores del antígeno prostático (PSA) en suero altos o extremadamente bajos proporcionan un índice de diagnóstico confiable razonable para un cáncer de próstata. Sin embargo, unos valores preoperatorios de PSA que fluctúan entre 2 y 10 ng/ml, especialmente entre 4 y 10 ng/ml, particularmente entre 2 y 6 ng/ml, son extremadamente malos en lo que se refiere a la confiabilidad para diagnóstico, en particular con respecto a la predicción de tasas de curación postoperatoria en prostatectomías radicales.

20 Por lo tanto, en una forma de realización preferida particular del invento, se determina la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 conjuntamente con la abundancia de por lo menos un marcador en sangre o suero, p.ej. por lo menos un miembro de la familia de proteasas de calicreína, preferiblemente de un antígeno específico de la próstata (PSA). La abundancia de diversas formas de PSA, en particular las abundancias de PSA total (tPSA) las abundancias relativas o absolutas de PSA libre (fPSA) y las abundancias relativas o absolutas de un PSA convertido en un complejo (cPSA), se pueden determinar conjuntamente con la abundancia de una anexina A3. Se pueden usar a este respecto otros miembros de la familia de proteasas de calicreína. Las abundancias de estas proteínas unas con otras se pueden usar también en combinación con uno o más parámetros de anexinas medidos o calculados para finalidades de diagnóstico. Los parámetros de anexinas que pueden ser útiles, no están restringidos

25 evidentemente a los usados por vía de demostración en esta presente divulgación.

30 En el caso de una forma de realización preferida adicional, la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 es determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos un marcador de células epiteliales, particularmente un antígeno de membrana, específico de la próstata (PSMA, acrónimo de prostate specific membrane antigen).

35 De acuerdo con el presente invento, el cáncer que se ha de diagnosticar es un cáncer de próstata opcionalmente en común con un cáncer de colon. Con respecto a un cáncer de próstata, el método del invento permite preferiblemente la discriminación entre muestras de tejidos de cáncer de próstata, muestras de tejidos con hiperplasia prostática benigna (BPH, acrónimo de benign prostatic hyperplasia), muestras de tejidos con prostatitis crónica, muestras de tejidos afligidos con fibrosis y muestras de tejidos sanos.

40 En lo que concierne a un cáncer de colon, el método del invento permite preferiblemente la discriminación entre una muestra de un tejido con cáncer y unas muestras de tejidos que están afectados por enfermedades inflamatorias del vientre, particularmente la enfermedad de Crohn y/o una colitis ulcerosa.

45 De acuerdo con otra forma de realización adicional, es posible diagnosticar subgrupos de cánceres. Además, se pueden diagnosticar diferentes etapas de cáncer. Es posible adicionalmente vigilar la transición de un tejido no canceroso a un tejido canceroso, por medio del presente invento.

50 En el caso de una forma de realización preferida adicional del invento, unas muestras o fracciones de orina exprimida son sometidas a un proceso de separación antes de determinar la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 con el fin de proporcionar sedimentos y sobrenadantes celulares. Preferiblemente, el proceso de separación se realiza por centrifugación, especialmente por centrifugación de células a baja velocidad a partir de un medio líquido (p.ej. a 200 x g durante 5 minutos a 4°C), tal como resulta evidente para los expertos en la especialidad. Evidentemente, cualquier apropiado protocolo de centrifugación, incluyendo centrifugaciones sucesivas en condiciones diferentes, o combinaciones de centrifugaciones con otros métodos, se podría emplear de manera concebible para separar una anexina soluble o fijada a exosomas con respecto de una anexina intracelular, para realizar una medición. Se pueden emplear también otros medios de separación de una anexina soluble o fijada

a exosomas con respecto de una anexina intracelular, o combinaciones de dichos medios, tal como resulta evidente para los expertos en la especialidad (p.ej., perlas magnéticas, filtración, cromatografía, etc).

De acuerdo con una forma adicional de realización del presente invento, los sedimentos celulares se usan para determinar la abundancia intracelular de por lo menos una proteína anexina A3, o de por lo menos una proteína anexina.

Tal como ya se ha mencionado en la descripción anterior, las anexinas están implicadas de una manera intrincada en procesos de osteoblastosis y osteolisis. Las anexinas están implicadas en el proceso de mineralización de los huesos. Esto es digno de señalarse, puesto que unas metástasis de cánceres de próstata son inusuales entre los cánceres al exhibir una alta frecuencia de lesiones osteoblásticas de los huesos. La mayor parte de las metástasis de cánceres están caracterizadas por una actividad osteolítica (de disolución de hueso) de los osteoclastos, mientras que las metástasis de próstata exhiben una actividad tanto osteoclástica como osteoblástica depositadora de minerales.

Una mineralización fisiológica es un proceso altamente complejo y regulado. Una mineralización de huesos es iniciada por pequeñas vesículas, denominadas vesículas de matriz, que son liberadas desde la membrana plasmática de células del esqueleto sujetas a mineralización. La primera fase mineral se forma dentro de las vesículas de matriz. Puesto que éstas son encerradas por membranas, se requieren unas proteínas de canal para que entren los iones minerales. Las anexinas forman dentro de las vesículas de matriz unos canales, a través de cuales entra el  $\text{Ca}^{2+}$ , que conduce a la iniciación de una mineralización con fosfato de calcio. Una vez que los cristales intravesiculares han alcanzado un cierto tamaño, ellos rompen a la membrana. Esto está relacionado a su vez con una inflamación, que es una característica corriente en la biología de los cánceres y de las anexinas, e implica una interacción entre un hueso y el sistema inmunitario. Por lo tanto, se describe también un método que se puede usar para diagnosticar y/o tratar una osteoporosis. En particular, las abundancias de anexinas, preferiblemente la abundancia de una anexina A3 y/o de una anexina A8, se determinan en fluidos corporales, secreciones corporales, muestras de tejidos, grupos de células o células, especialmente por métodos conocidos para los expertos en la especialidad, con el fin de diagnosticar y/o tratar una osteoporosis. Dicho tratamiento puede implicar la aplicación de unas sustancias que influyen sobre la abundancia, la localización subcelular/extracelular, la modificación posterior a la traducción o la actividad de proteínas anexinas. Una actividad a este respecto incluye especialmente una actividad de canales de iones, que puede ser apropiadamente aumentada o disminuida. Unas sustancias que se pueden usar para el tratamiento de una osteoporosis, incluyen explícitamente una anexina A3, versiones truncadas o mutantes de la misma, o anticuerpos u otros reactivos con afinidad, en particular conocidos en el estado de la técnica. Dichas sustancias pueden incluir además ácidos nucleicos, o sustancias relacionadas químicamente con ellos, tales como ácidos nucleicos peptídicos (pAN), que también se pueden usar como ARNs interferentes pequeños (siRNAs acrónimo de small interferent RNA), en particular los conocidos en el estado de la técnica.

Ejemplos de análisis en cuanto a proteínas de sedimentos celulares de orina de próstatas masajeadas y exprimidas, procedentes de pacientes a los que se ha diagnosticado un cáncer, una hiperplasia prostática benigna (BPH) o pacientes testigos con unas condiciones que se han diagnosticado como no relacionadas con un cáncer, se muestran en la fig. 3, la fig. 4 y la fig. 5 respectivamente. Las secciones superiores en cada una de las fig. 3 hasta 5 muestran una señal de quimioluminiscencia intensificada (ECL, acrónimo de enhanced chemiluminescence) por una anexina 3, procedente de una transferencia Western blot y las secciones inferiores muestran toda la señal de proteína cargada tal como se ha teñido con Ponceau S ("proteína"). Cada gel contiene una escalera de pesos moleculares (M) así como duplicados de 7,5  $\mu\text{g}$  de un material lisado de proteína celular total procedente de un tumor de próstata que contiene una anexina A3 como un testigo positivo (+C). Las señales de anexina A3 procedentes de muestras tomadas en diferentes geles, se pueden comparar por normalización con el valor medio de los testigos positivos respectivos de réplicas. Se encontró por parte de los autores del invento, en un estudio preliminar, que los sedimentos de muestras de orina exprimida de pacientes de cáncer tienen mucha menor cantidad de anexina A3 que uno cualquiera de los pacientes de hiperplasia prostática benigna (BPH) o los pacientes testigos sanos (Fig. 6). Por ejemplo, en relación con el valor de referencia de 0,2 veces la magnitud de la señal de anexina A3 (abundancia) como en PR\_26CA, solamente 5/30 (5:25) de las muestras de orina exprimida de pacientes de cáncer tienen más de 0,2 veces el valor de referencia, mientras que 23/30 (23:7) de las muestras de orina exprimida de pacientes de BPH y 18/30 (18:12) de las muestras de orina exprimidas de pacientes testigos sanos, superaban este valor de referencia. Estos resultados muestran que, en promedio, estos sedimentos celulares procedentes de muestras de orina exprimida de pacientes de cáncer contienen menos cantidad de anexina A3 que las muestras de orina exprimida procedentes de pacientes de BPH o de pacientes testigos sanos.

De acuerdo con una forma de realización adicional del invento, los sobrenadantes que resultan del proceso de separación de las muestras de orina exprimida y de las fracciones de las mismas, se usan para determinar la abundancia extracelular de por lo menos una proteína anexina A3 o de por lo menos una proteína anexina.

Se prefiere particularmente usar los sobrenadantes para diagnosticar un cáncer, en particular de los tractos urogenital y/o intestinal y/o para la discriminación entre un tejido canceroso y otro no canceroso.

En el caso de una forma de realización preferida adicionalmente del presente invento, un agente quelador de cationes, especialmente un agente quelador de  $\text{Ca}^{2+}$ , particularmente el EDTA y/o el EGTA, se añade a la muestra de orina o a la fracción de la misma antes de determinar la abundancia de anexina A3 o de por lo menos una proteína anexina. En una forma de realización preferida, la adición del agente quelador de cationes se realiza antes de someter las muestras o las fracciones de las mismas al proceso de separación.

Preferiblemente, la determinación de la abundancia de por lo menos una proteína anexina extracelular, particularmente de una anexina A3, se realiza en un sobrenadante tratado con un agente quelador de cationes, particularmente tratado con EDTA y/o EGTA, y como comparación en un sobrenadante que carece de un agente quelador de cationes, particularmente EDTA y/o EGTA. El sobrenadante se deriva de la misma muestra de orina exprimida, o de una fracción de la misma.

Basándose en el razonamiento de que en particular la translocación de una anexina A3 desde el interior hasta el exterior de las células es afectada diferencialmente durante el desarrollo de un cáncer de próstata, el presente invento incluye la determinación de si hay alguna diferencia en la localización intracelular/extracelular de una anexina A3 en asociación con un cáncer. El entorno extracelular, como ya se ha mencionado en la anterior memoria descriptiva, se entiende como el espacio extracelular que incluye la superficie exterior de membranas plasmáticas de células. Una orina exprimida obtenida subsiguientemente a un masaje clínico de próstata, contiene células exudadas a partir de la próstata. Al igual que la posibilidad de existencia de una anexina A3 extracelular en exosomas, una anexina A3 libre podría fijarse a grupos cargados negativamente, tales como fosfolípidos, sobre la superficie de las células de una manera dependiente del calcio. La última fracción de anexina A3 podría ser liberada desde la superficie de células hacia dentro del sobrenadante por adición de EDTA/EGTA al medio con el fin de quelar al calcio.

Una investigación adicional en un estudio de cuatro centros, doble ciego, demostró que la relación de la anexina A3 total de un sedimento por encima de un sobrenadante era apta para diagnosticar casos marcados como fibrosis en el grupo de pacientes no cancerosos. Una fibrosis está asociada con procesos benignos y es indicativa de un caso no canceroso. El AUROC (Área bajo la curva ROC) es de 0,7072 para la "relación pu.anx.tot.ratio" para un total de 103 casos no cancerosos. La correlación para la relación era negativa, y por lo tanto unas cantidades aumentadas de anexina A3 total en sobrenadantes eran cruciales para la clasificación dentro de este grupo. Esto es lógico, puesto que para los casos de cáncer se observaba en sobrenadantes un valor de anexina A3 disminuido (véase más adelante).

El perfilamiento adicional de pacientes no cancerosos (BPH, prostatitis crónica, fibrosis, PIN 1-3) por medio de las relaciones de anexina A3 en sedimentos/sobrenadantes es un aspecto importante del invento para subsiguientes etapas secuenciales y/o de parámetros múltiples del análisis de los datos más allá de la decisión diagnóstica de un caso de cáncer frente a un caso no canceroso.

Adicionalmente, los autores del invento determinaron las abundancias de anexina A3 en sobrenadantes y sedimentos celulares de una serie independiente separada de pacientes, con el fin de comparar la abundancia relativa de anexina A3 tanto en sedimentos celulares como en sobrenadantes de muestras de orina exprimida. Nuevamente, se encontró para esta diferente cohorte de pacientes que las abundancias de anexina A3 en muestras de sedimentos de orina exprimida procedentes de pacientes de cáncer son más bajas que las abundancias de anexina A3 en sedimentos de orina exprimida procedentes de pacientes de BPH o pacientes sanos. En lo que concierne a los sobrenadantes, las abundancias de anexina A3 procedentes de estos mismos pacientes son más altas en los sobrenadantes tratados con EDTA de muestras de orinas exprimida de pacientes de cáncer que en los sobrenadantes tratados con EDTA de muestras de orina exprimida de pacientes de BPH o de pacientes sanos. A partir de las relaciones individuales de fracciones extracelulares (sobrenadantes tratados con EDTA) e intracelulares (sedimentos de 1000 x g) de una orina exprimida surgió una imagen incluso más clara, tal como se muestra en la fig. 7. Tomados conjuntamente, estos datos indican unas tasas de falsos resultados positivos que están situadas alrededor o por debajo de 10 % y además las relaciones de la expresión de anexina A3 en sobrenadantes (anexina A3-S) frente a la expresión de anexina A3 en sedimentos (anexina A3-P) permiten una discriminación de un cáncer con respecto a una BPH y con respecto a testigos, tal como se muestra en la Tabla 1: esencialmente, la anexina A3-S es alta en un cáncer y en una BPH y baja en testigos, mientras que la anexina A3-P es alta en una BPH y en testigos y baja en un cáncer; teniendo por lo tanto una alta S (o S/P) o una baja P para un cáncer; una alta S (o S/P) y una alta P para una BPH, y una baja S (o S/P) y una alta P para testigos; las relaciones individuales (S/P) proporcionan la imagen más clara en comparación con los sedimentos a solas (fig. 7). Una calibración adicional en cuanto a abundancias de proteínas mejora adicionalmente la imagen obtenida.

De acuerdo con una forma adicional de realización del invento, la abundancia de una anexina A3 o de por lo menos una proteína anexina es determinada por métodos inmunohistoquímicos, en particular usando unas muestras de tejidos, tales como secciones de tejidos.

La solicitud describe adicionalmente el uso de por lo menos un anticuerpo anti-anexina, en particular de un anticuerpo anti-anexina A3, para el diagnóstico de un cáncer, en particular de los tractos urogenital y/o intestinal, y/o

para una discriminación entre un tejido canceroso y otro no canceroso. En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-anexina se usa para teñir de manera patohistológica y diagnóstica muestras de tejidos, en particular secciones de tejidos. Las muestras se pueden obtener por medio de biopsias o por excisión completa de un tejido. En particular, las muestras de tejidos que han de ser teñidas por el anticuerpo anti-anexina se derivan de biopsias de próstata o de un tejido de próstata después de una prostatectomía.

Se obtuvo un suero policlonal de conejo que contenía anticuerpos contra una anexina A3 y se usó para localizar una anexina A3 en tejidos de próstata mediante una inmunohistoquímica. A causa del gran número de miembros de la familia de las anexinas, los autores del invento caracterizaron la especificidad del anticuerpo policlonal anti-anexina A3 mediante una transferencia Western blot para una inmunohistoquímica. La enorme mayoría de las señales obtenidas mediante la transferencia Western blot de materiales lisados celulares de tejidos benignos y de cáncer de próstata procede de una anexina A3 (fig. 1). Se observó una abundancia marginal de una señal para una proteína de peso molecular más alto, que presumiblemente es una anexina A6. Este anticuerpo produjo una banda limpia fuerte usando aproximadamente 120 ng de GST(glutati6n-S-transferasa)-anexina A3 de 60 kDa en las mismas condiciones. Una cuantificación realizada a fondo, basándose en los valores de radiactividad a partir de geles 2D procedentes de biopsias, tinciones de proteínas de geles 1D y 2D y borrones de transferencia Western blot 1D y 2D procedentes de biopsias y de orinas exprimidas, condujo a una determinación de los límites de detección de las concentraciones de proteínas en muestras de orinas exprimidas, que fluctuaban entre 0,02 y > 15 mg/ml. El límite de detección estaba en un valor algo más bajo, pero cercano a 0,01 mg/ml. En términos del contenido de proteínas, el intervalo es de desde 0,001 hasta más de 0,3 mg/μg de proteína total.

Es, por lo tanto, probable que este anticuerpo reconozca predominantemente una anexina A3 en una inmunohistoquímica, como se muestra en la fig. 2, en donde la correspondiente señal de anexina A3 está restringida a células epiteliales en una próstata sana, y adicionalmente a células cancerosas en tumores. Las células estromales exhibían una tinción acrecentada en un cáncer precoz. El fundamento racional del mecanismo para las diferencias de anexina A3 en un cáncer de próstata y en un tejido de BPH indica de primera intención una transición desde una expresión intracelular, más localizada y en total más baja, a una expresión extracelular y en total más alta, cuando se compara con unas muestras testigos.

La distribución de una tinción de anexina A3 era sugerente de una localización en el citoplasma y en membranas (fig. 2), aunque el nivel global de tinción en células individuales parecía ser más bajo en un cáncer que en un tejido benigno (fig. 2), el nivel global de anexina A3 en el mismo tejido de cáncer era más alto (p.ej. la fig. 1) lo que puede ser explicado por más cantidad de células que contienen anexina A3 en un tejido canceroso, y/o por más cantidad de anexina A3 extracelular en un tejido canceroso.

En un estudio amplio (de cuatro centros, doble ciego) que toma en cuenta y mide por primera vez las cantidades totales de anexinas en sobrenadantes y sedimentos de la orina exprimida de 250 pacientes, y que además cuantifica la contribución potencial de los neutrófilos a la señal de anexina A3 (por cuantificación paralela del marcador de neutrófilos NGAL), se observó que los niveles de anexina A3 eran reducidos en los sobrenadantes de la orina exprimida de pacientes con cáncer. En términos generales, este resultado indica que se observan unos niveles más altos de anexina A3 en la orina exprimida de pacientes no cancerosos, con fibrosis o BPH, que en pacientes con cáncer, sin embargo, estos niveles eran muy reducidos hasta llegar a ser despreciables en una orina convencional no exprimida. Por lo tanto, se saca la conclusión de que la anexina A3 medida en una orina exprimida se origina predominantemente en la próstata, y es liberada dentro de la orina como una consecuencia del proceso de masaje prostático. Se ha mostrado anteriormente que una anexina A3 es expresada principalmente en las células epiteliales ductales de la próstata sana. Para la discriminación entre un cáncer y un caso no canceroso a solas, los presentes datos indican que la cantidad de anexina A3 en sobrenadantes tiene el valor para diagnóstico más grande (los valores de AUROC para una lectura combinada de anexina A3 por μg de proteína y de anexina A3 total en sobrenadantes de una orina exprimida de pacientes con cáncer de próstata, con unos valores iniciales de PSA entre 4 y 10, fueron de 0,78-0,82). Aquí se observó una perturbación de la anexina A3 en un sedimento en el caso de unos valores más altos de NGAL; (así los valores de AUROC para la anexina A3 en un sedimento estaban situados en el intervalo de 0,55-0,65).

Es conocido también que en una próstata con cáncer, solamente un pequeño porcentaje de las células ductales epiteliales son cancerosas, y por lo tanto las diferencias medidas en la abundancia de anexina A3 extracelular no deberían ser significativas de acuerdo con un razonamiento lógico. No obstante, se observó una reducción considerable y significativa de la abundancia media de anexina A3 en la orina exprimida de pacientes de cáncer en relación con pacientes no cancerosos. No es posible explicar racionalmente porqué esto debería ocurrir, puesto que las células epiteliales no cancerosas deberían continuar segregando anexina A3 de acuerdo con el conocimiento convencional intuitivo. Posiblemente, la presencia de un cáncer causa la secreción de una sustancia que actúa desde una molécula diferente, tal como una citocina, que afecta a la secreción de anexina A3 desde la masa de células epiteliales en una próstata con una lesión cancerosa. No está claro si este factor que actúa desde una molécula diferente se originaría en las células cancerosas propiamente dichas, o en otras células. Está bien demostrado documentalmente que unos factores que actúan desde una molécula diferente influyen sobre la relación entre células cancerosas y su entorno mesenquimal/estromal, y viceversa. Independientemente del (de los)

mecanismo(s) responsable(s), las presentes observaciones empíricas no son ambiguas, y demuestran de una manera clara pero sorprendente que unos niveles más bajos de anexina A3 de la orina exprimida proporcionan una medición predictiva de la probabilidad de que el paciente tenga células tumorales en la próstata. Este uso para diagnóstico de los niveles de anexina A3 en una orina exprimida pueden ser combinados con otros índices de diagnóstico, tales como el nivel del antígeno específico de la próstata (PSA), tal como se demuestra a título de ejemplo. Estos resultados sugieren también que la presencia de la proteína anexina A3 está asociada con el fenotipo sano. Por lo tanto, la proteína anexina A3 puede ser usada de una manera terapéutica para tratar un cáncer, aumentando los niveles de anexina A3 extracelular.

Los mecanismos que subyacen a los resultados observados están sometidos a investigación y ellos reflejan potencialmente una transición desde una cierta clase de epitelio de próstata completamente sano a una etapa no cancerosa (fibrosis/BPH), que está asociada con niveles elevados de anexina A3 tanto en los sedimentos como sobrenadantes de orina exprimida, teniendo la anterior relación de anexina A3 total (p/s) el más alto valor para diagnóstico. En un cáncer, hay una correlación evidente y sorprendente con unas cantidades disminuidas de anexina A3 en sobrenadantes de orina exprimida de pacientes con cáncer; se manifiesta que las cantidades de anexina A3 en sedimentos tienen una contribución contaminante por leucocitos/neutrófilos positivos para NGAL.

Por lo tanto, es altamente deseable medir los niveles de anexina A3 tanto en un sedimento como en un sobrenadante. Esta información sobre el nivel de proteínas no es accesible por métodos genómicos, p.ej., tal como se insinúa superficialmente pero no demuestra sustancialmente mediante la solicitud de patente en los EE.UU. US2003/0108963A1.

En resumen, una anexina A3 exhibió una tinción predominantemente intracelular en un tejido sano y una localización extra-epitelial en un tejido canceroso precoz: exhibiendo un cáncer avanzado una tinción de anexina A3 notablemente reducida dentro de células cancerosas.

De acuerdo con el invento, las muestras de orina o las fracciones de las mismas se obtienen a partir de una orina exprimida, que es recuperada después de un masaje de próstata, particularmente por introducción de un dedo en el recto.

En una forma adicional de realización, las muestras de orina o las fracciones de las mismas son purificadas, particularmente son liberadas de neutrófilos, monocitos o células mononucleares de sangre periférica (PMBC, acrónimo de peripheral blood mononuclear cells), especialmente por medio de perlas magnéticas. Preferiblemente, se usan muestras o fracciones de las mismas de una orina obtenida por la mañana.

De acuerdo con una forma de realización del invento, se miden los niveles de anexinas en las heces o en las células epiteliales del tracto intestinal. Además, los niveles de anexinas se pueden usar para diagnosticar cánceres epiteliales del tracto gastrointestinal en cualquier fracción o preparación de heces (cualquier superficie epitelial potencialmente productora de exosomas). Los niveles de anexinas se usan además para diagnosticar un cáncer colorrectal. De acuerdo con una forma de realización preferida, los métodos del invento se pueden combinar con una determinación de neutrófilos, en particular de calprotectina y/o de lipocalina asociada con una gelatinasa de neutrófilos (NGAL, acrónimo de neutrophil gelatinase-associated lipocalin), para discriminar condiciones inflamatorias (la enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa con respecto de un cáncer).

Aquí se describe también que es posible tratar un cáncer, en particular de los tractos urogenital y/o intestinal. Esto se consigue preferiblemente por la intensificación de la abundancia in vivo de por lo menos una proteína anexina, por ejemplo de por lo menos una anexina extracelular.

Además, el presente invento permite realizar el diagnóstico de un cáncer de próstata y/o la discriminación entre un tejido canceroso y otro no canceroso. Esto se consigue particularmente mediante la determinación de las relaciones de las abundancias intracelulares frente a las extracelulares y de las abundancias extracelulares frente a las intracelulares, respectivamente, de proteínas anexinas que pueden ser, llegado el caso, combinadas con la determinación de las correspondientes relaciones para otras proteínas. Preferiblemente, el diagnóstico de un cáncer y/o la discriminación entre un tejido canceroso y otro no canceroso se basan en la abundancia extracelular de por lo menos una proteína anexina. Las relaciones entre proteínas y las abundancias de proteínas, que se determinan respectivamente, revelan diferencias entre tejidos cancerosos y no cancerosos, permitiendo de esta manera un perfilamiento de un paciente. Por lo tanto, las proteínas anexinas, en particular una anexina A3, son unos confiables marcadores diagnósticos que pueden incluso reemplazar completamente a los marcadores tumorales que se usan convencionalmente en el diagnóstico de cánceres.

Para una descripción más detallada del presente invento se hará referencia a las tablas y figuras anejas.

Tabla 1:

Nº (#) de muestras	Cáncer 40	BPH 40	Testigos 40	Falsos valores negativos (% de 120)	Falsos positivos (% de 120)
ANXA3-P (% de 40)					
Biomarcador descendente	84	23	40		
Biomarcador ascendente	16	77	60	6	13,3
ANXA3-S (% de 40)					
Biomarcador descendente	5	20	91		
Biomarcador ascendente	95	80	9		
Relación ANXA3-S/ANXA3-P y clasificación					
Cáncer	92	12	3		
BPH	6	8	6	1,5	7,5
Testigo	2	8	91		

5 Tabla1: Resumen de resultados de diagnósticos, las abundancias de anexina A3 son bajas en sedimentos (anexina A3-P) de muestras de orina exprimida de pacientes de cáncer y son comparativamente altas en correspondientes sedimentos de muestras de orina exprimida en pacientes de BPH y pacientes sanos. Para las abundancias de anexina A3 en sobrenadantes (anexina A3-S) de muestras de orina exprimida, hay un diferente cuadro: ellas son bajas para pacientes sanos y altas para pacientes con cáncer y con BPH. La lectura combinada clasifica correctamente los tres casos con unos números indicados en la parte inferior de la tabla. En lo que concierne a detalles adicionales se hace referencia a la anterior memoria descriptiva.

10 Tabla 2:

Nombre	Descripción
P_ug_tot	sedimento: cantidad total de proteína (µg)
U_ug_tot	sobrenadante*: cantidad total de proteína (µg)
P_ANX_ug	sedimento: nivel de señales de anexina por µg de proteína
P_ANX_tot	sedimento: nivel de señales de anexina por muestra total de paciente
15 U_ANX_ug	sobrenadante: nivel de señales de anexina por µg de proteína
U_ANX_tot	sobrenadante: nivel de señales de anexina por muestra total de paciente
PU_ANX_ug	sedimento + sobrenadante: nivel de señales de anexina por µg de proteína
PU_ANX_tot	sedimento + sobrenadante: nivel de señales de anexina por muestra total de paciente
PU_ANX_ug_ratio	relación de sedimento / sobrenadante: nivel de anexina por µg de proteína
20 PU_ANX_tot_ratio	relación de sedimento / sobrenadante: nivel de anexina por muestra total de paciente
P_NGAL_ug	sedimento: nivel de señales de NGAL por µg de proteína
P_NGAL_tot	sedimento: nivel de señales de NGAL por muestra total de paciente
U_NGAL_ug	sobrenadante: nivel de señales de NGAL por µg de proteína
25 U_NGAL_tot	sobrenadante: nivel de señales de NGAL por muestra total de paciente
PU_NGAL_ug	sedimento + sobrenadante: nivel de NGAL por µg de proteína
PU_NGAL_tot	sedimento + sobrenadante: nivel de NGAL por muestra total de paciente
PU_NGAL_ug_ratio	relación de sedimento/sobrenadante: nivel de NGAL por muestra total de paciente
PU_NGAL_tot_ratio	relación de sedimento/sobrenadante: nivel de NGAL por muestra total de paciente
30 P_ANX_NGAL_ug_ratio	sedimento: relación de anexina/NGAL por µg de proteína
U_ANX_NGAL_ug_ratio	sobrenadante: relación de anexina/NGAL por µg de proteína
PU_ANX_NGAL_ug_ratio	sedimento + sobrenadante: relación de anexina/NGAL por µg de proteína

35 Tabla 2. Parámetros de proteínas medidos a partir de fracciones de sobrenadantes y sedimentos de orina exprimida

Tabla 3:

Variable	Descripción
P.ug.tot	sedimento: cantidad total de proteína (µg)
U.ug.tot	sobrenadante: cantidad total de proteína (µg)
5 P.ANX.ug	sedimento: nivel de anexina por µg de proteína
P.ANX.tot	sedimento: nivel de anexina por muestra total
U.ANX.ug	sobrenadante: nivel de anexina por µg de proteína
U.ANX.tot	sobrenadante: nivel de anexina por muestra total
PU.ANX.ug	sobrenadante + sedimento: nivel de anexina por µg de proteína
PU.ANX.tot	sobrenadante + sedimento: nivel de anexina por µg de proteína
10 PU.ANX.tot.ratio	relación de sedimento/sobrenadante: nivel de anexina por muestra total
psa.ini	niveles de PSA en sangre
perc.free.psa	porcentaje de PSA libre

Tabla 3: Descripción de abreviaturas y variables usadas en el Ejemplo 4

15

Tabla 4:

Ensayo	AUROC	Pacientes
anx.comb.var	0,78	112
comb.var.anx.psa 1	0,76	112
u.anx.tot	0,76	112
pu.anx.tot	0,75	112
u.anx.ug	0,74	112
perc.free.psa	0,72	103
psa.ini	0,57	109

20 Tabla 4: Resultados de los análisis de curvas ROC para los parámetros variables indicados (véase la Tabla 3 para su descripción), realizados para pacientes agrupados de acuerdo con unos valores de PSA de 4-10 ng/ml. Los parámetros de ensayo, los valores de AUROC resultantes y el número de pacientes incluidos por cada análisis están agrupados en la tabla

Tabla 5:

Ensayo	AUROC	Pacientes
comb.var.anx.psa 2	0,79	109
comb.var.anx.psa 1	0,77	109
pu.anx.tot	0,73	109
anx.comb.var	0,71	109
u.anx.tot	0,71	109
pu.anx.ug	0,71	109
u.anx.	0,71	109
p.anx.tot	0,69	109
psa.ini	0,69	109
perc.free.psa	0,69	109

25 Tabla 5: Resultado de los análisis de curvas ROC para los parámetros variables indicados (véase la Tabla 3 para su descripción), realizados para pacientes agrupados de acuerdo con unos valores de PSA de 2-6 ng/ml. Los parámetros de ensayo, los valores de AUROC resultantes y el número de pacientes incluidos por análisis están agrupados en la tabla.

Tabla 6:

Ensayo	AUROC	Pacientes
comb.var.anx.psa 1	0,75	226
comb.var.anx.psa 2	0,73	244
perc.free.psa	0,70	227
psa.ini	0,68	239
anx.comb.var	0,67	244
pu.anx.tot	0,66	245

30 Tabla 6: Resultado de los análisis de curvas ROC para los parámetros variables indicados (véase la Tabla 3 para su descripción), realizados para todos los pacientes, incluyendo todos los valores de PSA. Los parámetros de ensayo, los valores de AUROC y el número de pacientes incluidos por cada análisis están agrupados en la tabla.

Tabla 7 :

Criterio	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=-3.5155	100.0 ( 93.7-100.0)	0.0 ( 0.0- 6.9)	1.00		52.3	
> -3.5155	98.2 ( 90.6- 99.7)	0.0 ( 0.0- 6.9)	0.98		51.9	0.0
> -2.6907	98.2 ( 90.6- 99.7)	1.9 ( 0.3- 10.3)	1.00	0.91	52.3	50.0
> -2.5444	98.2 ( 90.6- 99.7)	3.8 ( 0.6- 13.2)	1.02	0.46	52.8	66.7
> -2.0663	98.2 ( 90.6- 99.7)	5.8 ( 1.3- 16.0)	1.04	0.30	53.3	75.0
> -1.9579	98.2 ( 90.6- 99.7)	7.7 ( 2.2- 18.6)	1.06	0.23	53.8	80.0
> -1.9096	98.2 ( 90.6- 99.7)	9.6 ( 3.2- 21.0)	1.09	0.18	54.4	83.3
> -1.6827	98.2 ( 90.6- 99.7)	11.5 ( 4.4- 23.5)	1.11	0.15	54.9	85.7
> -1.6673	98.2 ( 90.6- 99.7)	13.5 ( 5.6- 25.8)	1.14	0.13	55.4	87.5
> -1.5429	96.5 ( 87.9- 99.5)	13.5 ( 5.6- 25.8)	1.12	0.26	55.0	77.8
> -1.4419	96.5 ( 87.9- 99.5)	15.4 ( 6.9- 28.1)	1.14	0.23	55.6	80.0
> -1.3903	94.7 ( 85.4- 98.8)	15.4 ( 6.9- 28.1)	1.12	0.34	55.1	72.7
> -1.273	94.7 ( 85.4- 98.8)	17.3 ( 8.3- 30.3)	1.15	0.30	55.7	75.0
> -1.2619	94.7 ( 85.4- 98.8)	19.2 ( 9.6- 32.5)	1.17	0.27	56.2	76.9
> -1.1825	93.0 ( 83.0- 98.0)	19.2 ( 9.6- 32.5)	1.15	0.36	55.8	71.4
> -1.1791	93.0 ( 83.0- 98.0)	21.2 ( 11.1- 34.7)	1.18	0.33	56.4	73.3
> -1.0689	91.2 ( 80.7- 97.1)	21.2 ( 11.1- 34.7)	1.16	0.41	55.9	68.7
> -1.0621	91.2 ( 80.7- 97.1)	23.1 ( 12.5- 36.8)	1.19	0.38	56.5	70.6
> -1.0192	91.2 ( 80.7- 97.1)	25.0 ( 14.0- 38.9)	1.22	0.35	57.1	72.2
> -1.0041	91.2 ( 80.7- 97.1)	26.9 ( 15.6- 41.0)	1.25	0.33	57.8	73.7
> -0.9502	91.2 ( 80.7- 97.1)	28.8 ( 17.1- 43.1)	1.28	0.30	58.4	75.0
> -0.8458	89.5 ( 78.5- 96.0)	28.8 ( 17.1- 43.1)	1.26	0.36	58.0	71.4
> -0.8339	89.5 ( 78.5- 96.0)	30.8 ( 18.7- 45.1)	1.29	0.34	58.6	72.7
> -0.8285	87.7 ( 76.3- 94.9)	30.8 ( 18.7- 45.1)	1.27	0.40	58.1	69.6
> -0.8253	87.7 ( 76.3- 94.9)	32.7 ( 20.3- 47.1)	1.30	0.38	58.8	70.8
> -0.8237	87.7 ( 76.3- 94.9)	34.6 ( 22.0- 49.1)	1.34	0.35	59.5	72.0
> -0.8044	87.7 ( 76.3- 94.9)	36.5 ( 23.6- 51.0)	1.38	0.34	60.2	73.1
> -0.7935	87.7 ( 76.3- 94.9)	38.5 ( 25.3- 53.0)	1.43	0.32	61.0	74.1
> -0.7836	87.7 ( 76.3- 94.9)	40.4 ( 27.0- 54.9)	1.47	0.30	61.7	75.0
> -0.7431	87.7 ( 76.3- 94.9)	42.3 ( 28.7- 56.8)	1.52	0.29	62.5	75.9
> -0.7371	86.0 ( 74.2- 93.7)	42.3 ( 28.7- 56.8)	1.49	0.33	62.0	73.3
> -0.6841	86.0 ( 74.2- 93.7)	44.2 ( 30.5- 58.7)	1.54	0.32	62.8	74.2
> -0.6759	86.0 ( 74.2- 93.7)	46.2 ( 32.2- 60.5)	1.60	0.30	63.6	75.0

Critério	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
> -0.6297	86.0 ( 74.2- 93.7)	48.1 ( 34.0- 62.4)	1.66	0.29	64.5	75.8
> -0.6205	86.0 ( 74.2- 93.7)	50.0 ( 35.8- 64.2)	1.72	0.28	65.3	76.5
> -0.6095	86.0 ( 74.2- 93.7)	51.9 ( 37.6- 66.0)	1.79	0.27	66.2	77.1
> -0.5341	86.0 ( 74.2- 93.7)	53.8 ( 39.5- 67.8)	1.86	0.26	67.1	77.8
> -0.5077	86.0 ( 74.2- 93.7)	55.8 ( 41.3- 69.5)	1.94	0.25	68.1	78.4
> -0.503	86.0 ( 74.2- 93.7)	57.7 ( 43.2- 71.3)	2.03	0.24	69.0	78.9
> -0.4942	86.0 ( 74.2- 93.7)	59.6 ( 45.1- 73.0)	2.13	0.24	70.0	79.5
> -0.4548	84.2 ( 72.1- 92.5)	59.6 ( 45.1- 73.0)	2.09	0.26	69.6	77.5
> -0.4346	82.5 ( 70.1- 91.2)	59.6 ( 45.1- 73.0)	2.04	0.29	69.1	75.6
> -0.4211	80.7 ( 68.1- 89.9)	59.6 ( 45.1- 73.0)	2.00	0.32	68.7	73.8
> -0.3763	78.9 ( 66.1- 88.6)	59.6 ( 45.1- 73.0)	1.95	0.35	68.2	72.1
> -0.201	78.9 ( 66.1- 88.6)	61.5 ( 47.0- 74.7)	2.05	0.34	69.2	72.7
> -0.1764	78.9 ( 66.1- 88.6)	63.5 ( 49.0- 76.4)	2.16	0.33	70.3	73.3
> -0.1476	78.9 ( 66.1- 88.6)	65.4 ( 50.9- 78.0)	2.28	0.32	71.4	73.9
> -0.1049	77.2 ( 64.2- 87.2)	65.4 ( 50.9- 78.0)	2.23	0.35	71.0	72.3
> -0.0809	75.4 ( 62.2- 85.9)	65.4 ( 50.9- 78.0)	2.18	0.38	70.5	70.8
> -0.0773	75.4 ( 62.2- 85.9)	67.3 ( 52.9- 79.7)	2.31	0.36	71.7	71.4
> -0.0323	73.7 ( 60.3- 84.5)	67.3 ( 52.9- 79.7)	2.25	0.39	71.2	70.0
> -0.0007	71.9 ( 58.5- 83.0)	67.3 ( 52.9- 79.7)	2.20	0.42	70.7	68.6
> 0.007	71.9 ( 58.5- 83.0)	69.2 ( 54.9- 81.3)	2.34	0.41	71.9	69.2
> 0.0841	70.2 ( 56.6- 81.6)	69.2 ( 54.9- 81.3)	2.28	0.43	71.4	67.9
> 0.085	68.4 ( 54.8- 80.1)	69.2 ( 54.9- 81.3)	2.22	0.46	70.9	66.7
> 0.1274	68.4 ( 54.8- 80.1)	71.2 ( 56.9- 82.9)	2.37	0.44	72.2	67.3
> 0.1395	68.4 ( 54.8- 80.1)	73.1 ( 59.0- 84.4)	2.54	0.43	73.6	67.9
> 0.1475	68.4 ( 54.8- 80.1)	75.0 ( 61.1- 86.0)	2.74	0.42	75.0	68.4
> 0.1672	68.4 ( 54.8- 80.1)	76.9 ( 63.2- 87.5)	2.96	0.41	76.5	69.0
> 0.1764	68.4 ( 54.8- 80.1)	78.8 ( 65.3- 88.9)	3.23	0.40	78.0	69.5
> 0.1803	68.4 ( 54.8- 80.1)	80.8 ( 67.5- 90.4)	3.56	0.39	79.6	70.0
> 0.1808	66.7 ( 52.9- 78.6)	80.8 ( 67.5- 90.4)	3.47	0.41	79.2	68.9
> 0.2017	64.9 ( 51.1- 77.1)	80.8 ( 67.5- 90.4)	3.38	0.43	78.7	67.7
> 0.2682	63.2 ( 49.3- 75.5)	80.8 ( 67.5- 90.4)	3.28	0.46	78.3	66.7
> 0.2761	63.2 ( 49.3- 75.5)	82.7 ( 69.7- 91.7)	3.65	0.45	80.0	67.2
> 0.3249	61.4 ( 47.6- 74.0)	82.7 ( 69.7- 91.7)	3.55	0.47	79.5	66.2
> 0.3445	59.6 ( 45.8- 72.4)	82.7 ( 69.7- 91.7)	3.45	0.49	79.1	65.2
> 0.4091	57.9 ( 44.1- 70.9)	82.7 ( 69.7- 91.7)	3.35	0.51	78.6	64.2
> 0.476	57.9 ( 44.1- 70.9)	84.6 ( 71.9- 93.1)	3.76	0.50	80.5	64.7
> 0.4824	57.9 ( 44.1- 70.9)	86.5 ( 74.2- 94.4)	4.30	0.49	82.5	65.2
> 0.4969	57.9 ( 44.1- 70.9)	88.5 ( 76.5- 95.6)	5.02	0.48	84.6	65.7
> 0.5666	57.9 ( 44.1- 70.9)	90.4 ( 79.0- 96.8)	6.02	0.47	86.8	66.2
> 0.6639	57.9 ( 44.1- 70.9)	92.3 ( 81.4- 97.8)	7.53	0.46	89.2	66.7
> 0.683	56.1 ( 42.4- 69.3)	92.3 ( 81.4- 97.8)	7.30	0.48	88.9	65.8
> 0.6877	56.1 ( 42.4- 69.3)	94.2 ( 84.0- 98.7)	9.73	0.47	91.4	66.2
> 0.6934	54.4 ( 40.7- 67.6)	94.2 ( 84.0- 98.7)	9.43	0.48	91.2	65.3
> 0.7038 *	54.4 ( 40.7- 67.6)	96.2 ( 86.8- 99.4)	14.14	0.47	93.9	65.8
> 0.7226	52.6 ( 39.0- 66.0)	96.2 ( 86.8- 99.4)	13.68	0.49	93.8	64.9
> 0.8531	50.9 ( 37.3- 64.4)	96.2 ( 86.8- 99.4)	13.23	0.51	93.5	64.1
> 0.8868	49.1 ( 35.6- 62.7)	96.2 ( 86.8- 99.4)	12.77	0.53	93.3	63.3

5

10

Criterio	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
> 0.9511	47.4 ( 34.0- 61.0)	96.2 ( 86.8- 99.4)	12.32	0.55	93.1	62.5
> 0.9527	45.6 ( 32.4- 59.3)	96.2 ( 86.8- 99.4)	11.86	0.57	92.9	61.7
> 1.0734	43.9 ( 30.7- 57.6)	96.2 ( 86.8- 99.4)	11.40	0.58	92.6	61.0
> 1.116	42.1 ( 29.1- 55.9)	96.2 ( 86.8- 99.4)	10.95	0.60	92.3	60.2
> 1.1278	40.4 ( 27.6- 54.2)	96.2 ( 86.8- 99.4)	10.49	0.62	92.0	59.5
> 1.1707	38.6 ( 26.0- 52.4)	96.2 ( 86.8- 99.4)	10.04	0.64	91.7	58.8
> 1.1763	36.8 ( 24.5- 50.7)	96.2 ( 86.8- 99.4)	9.58	0.66	91.3	58.1
> 1.2415	35.1 ( 22.9- 48.9)	96.2 ( 86.8- 99.4)	9.12	0.68	90.9	57.5
> 1.267	33.3 ( 21.4- 47.1)	96.2 ( 86.8- 99.4)	8.67	0.69	90.5	56.8
> 1.3195	31.6 ( 19.9- 45.2)	96.2 ( 86.8- 99.4)	8.21	0.71	90.0	56.2
> 1.3976	29.8 ( 18.4- 43.4)	96.2 ( 86.8- 99.4)	7.75	0.73	89.5	55.6
> 1.4368	28.1 ( 17.0- 41.5)	96.2 ( 86.8- 99.4)	7.30	0.75	88.9	54.9
> 1.4579	26.3 ( 15.5- 39.7)	96.2 ( 86.8- 99.4)	6.84	0.77	88.2	54.3
> 1.4781	24.6 ( 14.1- 37.8)	96.2 ( 86.8- 99.4)	6.39	0.78	87.5	53.8
> 1.6158	22.8 ( 12.8- 35.8)	96.2 ( 86.8- 99.4)	5.93	0.80	86.7	53.2
> 1.6423	21.1 ( 11.4- 33.9)	96.2 ( 86.8- 99.4)	5.47	0.82	85.7	52.6
> 1.6559	19.3 ( 10.1- 31.9)	96.2 ( 86.8- 99.4)	5.02	0.84	84.6	52.1
> 1.7477	17.5 ( 8.8- 29.9)	96.2 ( 86.8- 99.4)	4.56	0.86	83.3	51.5
> 1.7524	17.5 ( 8.8- 29.9)	98.1 ( 89.7- 99.7)	9.12	0.84	90.9	52.0
> 1.7628	17.5 ( 8.8- 29.9)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.82	100.0	52.5
> 1.8054	15.8 ( 7.5- 27.9)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.84	100.0	52.0
> 1.8153	14.0 ( 6.3- 25.8)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.86	100.0	51.5
> 1.8787	12.3 ( 5.1- 23.7)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.88	100.0	51.0
> 2.1994	10.5 ( 4.0- 21.5)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.89	100.0	50.5
> 2.4311	8.8 ( 2.9- 19.3)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.91	100.0	50.0
> 2.472	7.0 ( 2.0- 17.0)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.93	100.0	49.5
> 2.5544	5.3 ( 1.2- 14.6)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.95	100.0	49.1
> 2.5595	3.5 ( 0.5- 12.1)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.96	100.0	48.6
> 2.8088	1.8 ( 0.3- 9.4)	100.0 ( 93.1-100.0)		0.98	100.0	48.1
> 3.6467	0.0 ( 0.0- 6.3)	100.0 ( 93.1-100.0)		1.00		47.7

Sens. = Sensibilidad  
 Spec. = Especificidad  
 +LR = Relación de probabilidades de resultados positivos  
 -LR = Relación de probabilidades de resultados negativos  
 +PV = Valor predictivo positivo  
 -PV = Valor predictivo negativo  
 95% C.I. = Intervalo de confianza del 95 %

5

10 Tabla 7: Datos correspondientes a la curva ROC de la Fig.9. El modelo de estimación de probabilidades máximas se describe en las Tablas 8 y 9

Tabla 8:

Parámetro	DF	Estimado	Error (típico)	Chi-Cuadrado (Wald)	Pr > ChiSq
Ordenada origen	1	-2,3860	1,7461	1,8673	0,1718
Log PU ANX tot	1	-0,4747	0,1394	11,5908	0,0007
Log PSA Ini	1	3,2942	1,0198	10,4343	0,0012

15

Tabla 8: Salida de SAS condensada para el modelo logit que conduce a comb.var.anx.psa 2: Análisis de estimaciones de probabilidad máxima

Tabla 9:

Efecto	Estimación (puntos)	Confianza (95 %)	Límites
log PU ANX tot	0,622	0,473	0,818
log PSA ini	26,956	3,652	198,934

5 Tabla 9: Salida de SAS condensada para el modelo logit que conduce a comb.var.anx.psa 2: Estimaciones de relaciones impares.

Figura 1:

10 Caracterización del antisuero policlonal de conejo anti anexina A3 por transferencia Western blot. (A) transferencia Western blot de un gel de SDS 1-D. Pista 1: marcadores del peso molecular Magic Mark (de Invitrogen) 3 µl por pista, proporciona unas masas en kDa de 120, 100, 80, 60, 50, 40, 30 y 20. Las pistas de repeticiones contienen 15 µg de un extracto de proteína tisular entera procedente de una próstata con cáncer (pistas 2-4) y de una próstata benigna (pistas-5-7) procedentes del paciente 29. El filtro fue incubado usando un suero policlonal anti anexina 3 (1:20.000). Las pistas 1-7 muestran una copia en blanco y negro de una imagen en color falso de una señal procedente de todo el filtro. El inserto encasillado (pistas 1' y 2') muestra la copia en blanco y negro de una representación en un único color de las pistas 1 y 2. Se indican las posiciones de las bandas de anexina A3 y de anexina 6 resumida. (B) 2D-PAGE. La transferencia Western blot de 100 µg de un extracto de proteínas procedente de la muestra con cáncer del paciente 29 muestra la distribución de proteínas con reactividad cruzada con respecto al suero policlonal. La identidad de tres manchas de anexina A3 más intensas fue confirmada por PMF MALDI-TOF (no se muestran los datos), las más intensas de las cuales corresponden a la mancha de proteína detectada en nuestros análisis proteómicos.

Figura 2:

25 Inmunohistoquímica de una anexina A3: una inmunorreactividad de una anexina A3 del suero policlonal anti anexina A3 (dilución: 1:100) fue encontrada en las células epiteliales de A) un tejido de próstata benigna. Se tiñeron las células epiteliales y cancerosas en B) una neoplasia intraepitelial prostática cribriforme (PIN acrónimo de prostatic intraepithelial neoplasia) y en C) un tejido con cáncer. Se observó también un nivel elevado de localización extraepitelial difusa.

Figura 3.

30 Cuantificación del borrón de transferencia Western blot de una anexina A3 en sedimentos de orina exprimida, obtenidos después de un masaje prostático de pacientes con cáncer. Las secciones superiores muestran la señal de anexina A3 quimioluminiscente procedente de proteínas en borrón transferido. Las secciones inferiores muestran la proteína cargada teñida con Ponceau S ("proteína"). Cada gel contiene una escalera de pesos moleculares (M) así como duplicados de 7,5 µg del material lisado de proteína celular total procedente de un tumor de próstata que contiene anexina A3 como un testigo positivo (+C).

Figura 4:

35 Cuantificación del borrón de transferencia Western blot de una anexina A3 en sedimentos de orina exprimida, obtenidos después de un masaje prostático de pacientes con BPH. Otros detalles siguen a la fig. 3.

Figura 5:

Cuantificación por borrón de transferencia Western blot de una anexina A3 en un sedimento de orina exprimida, obtenida después de un masaje prostático de pacientes testigos no cancerosos. Otros detalles siguen a la fig. 3.

Figura 6:

40 Unas señales normalizadas de una anexina A3, procedentes de sedimentos celulares de una orina de pacientes a continuación de un masaje de la próstata, como se muestra en las fig. 3 hasta 5. Los valores para una anexina A3, procedentes de diferentes geles, están normalizados en unidades arbitrarias de 7,5 µg del material lisado de proteína celular total procedente de un tumor de próstata (PR-26CA) que contiene una anexina A3 como un testigo positivo en cada una de las Figuras 3 hasta 5.

Figura 7:

Relación de los contenidos de anexina A3 entre sobrenadantes tratados con EDTA y sedimentos celulares de muestras de orina exprimida de pacientes a continuación de un masaje prostático (material de paciente adicional, no contenido en la fig. 6), a.u. significa unidades arbitrarias.

Figura 8:

Curva ROC - Proceso 1 de Dos Etapas

"Use U\_ANX\_tot si  $2,5 \leq \text{PSA\_ini} \leq 12$ , en otro caso la decisión que parezca más evidente"

Leyendas:

VARIABLE = IF(PSA\_ini<2,5; 100000;IF(PSA\_ini<=12;u\_anx\_tot;0)) twostepvar1

VARIABLE PARA CLASIFICACIÓN: PCa

GRUPO POSITIVO: PCa = 1

5 Tamaño de la muestra = 137

GRUPO NEGATIVO: PCa = 0

Tamaño de la muestra = 101

Prevalencia de la enfermedad (%) = 57,6

Área bajo la curva ROC = 0,740

10 Error típico = 0,33

Intervalo de confianza de 95 % (= 0,679 hasta 0,794

P (Área = 0,5) < 0,0001

Fig. 9

15 Curva ROC - T Comb.var.anx.psa 2

$\equiv -2,386 + 3,294 \log(1+PSA\_ini) - 0,475 \log(1+PU\_ANX \text{ tot})$

Leyendas:

Seleccionar: AND(PSA\_ini>=2;PSA\_ini<=6)

20 Variable de clasificación: PCa

Grupo positivo: PCa = 1, tamaño de la muestra = 57

Grupo negativo: PCa = 0, tamaño de la muestra = 52

Prevalencia de la enfermedad (%) = 52,3

Área bajo la curva ROC = 0,791

25 Error típico = 0,043

Intervalo de confianza de 95 % = de 0,703 hasta 0,863

P (área = 0,5) < 0,0001

### 30 Ejemplos

Aunque el presente invento se describe con mayor detalle con referencia a los Ejemplos, el presente invento no está limitado de ninguna de las maneras a Estos ejemplos.

Ejemplo 1:

Tratamiento de una orina después de un masaje prostático:

35 Una orina exprimida procedente de masaje prostático se obtuvo a partir de pacientes que están siendo sometidos a examen clínico, después de que el escrutinio en cuanto a las abundancias del antígeno específico de la próstata (PSA) en sangre hubo indicado un riesgo elevado de cáncer. 47 ml de la orina obtenida a continuación de un vigoroso masaje de la próstata mediante introducción de un dedo en el recto, se añadieron a 3 ml de EDTA 0,5 M, de pH 8, previamente enfriados a 0°C, y se enfriaron inmediatamente a 0°C. Si el volumen de orina era < 47 ml, el  
40 volumen se completó con una solución salina tamponada con fosfato (PBS acrónimo de Phosphate Buffered Saline)) enfriada por hielo. Las muestras enfriadas fueron centrifugadas a 3.000 rpm (revoluciones por minuto) a 0°C durante 30 minutos para crear un sedimento celular. Se retiraron unas partes alícuotas de 1 ml del sobrenadante, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el uso. Los sedimentos celulares fueron suavemente resuspendidos en 2 ml de una PBS enfriada por hielo y transferidos a unos tubos de Eppendorf sobre  
45 hielo, lo que fue seguido por una centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, y el sedimento se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta el uso.

Ejemplo 2:

Transferencia Western

50 Unos geles de SDS-PAGE para transferencia Western se prepararon usando un aparato de BioRad-Mini gel y 12 % de geles de poli(acrilamida Tcon espaciadores de 1 mm y 15 pocillos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anti-anexina A3 (anexina A3) era el mismo anticuerpo que se describe más adelante. Se diluyó a 1:20.000. La proteína GST - anexina A3 recombinante fue adquirida de Abnova Corporation (#ABV 0040710002; Lote: TO4G01-ANNEXINA3, 0,05 µg/µl, 61 kDa). La fijación del anticuerpo fue visualizada con una IgG anti-conejo de cabra (Sigma A 3937, lote nº 121K9151) diluido a 1:1.000, usando el método de detección por ECL (de  
55 Pierce) y un detector de quimioluminiscencia basado en una cámara CCD DIANA III (de Raytest, Straubenhardt, Alemania). Un suero policlonal de conejo contra una anexina A3 recombinante expresada en bacterias, exhibe una especificidad primaria para una anexina A3 y alguna reactividad cruzada para una anexina A6.

## Ejemplo 3:

## Inmunohistoquímica:

La inmunohistoquímica se realizó con secciones de tejido con parafina 5 µm que empleaban un suero policlonal anti anexina A3 de acuerdo con un protocolo clásico de inmunohistoquímica con peroxidasa de rábano picante, usando el estuche Zymed PicTure PLUS kit (Broad Spectrum, DAB, Zymed, Sur de San Francisco, CA). Después de teñir inmunitariamente se contratiñeron unas secciones con una solución de hematoxilina de Gill (de Sigma).

Ejemplo: Estudio químico usando la orina exprimida de 250 pacientes

Los niveles de anexina A3 se determinaron en la orina exprimida de pacientes clínicos, que se habían diagnosticado o bien como positivos o como negativos en cuanto a la presencia de un cáncer de próstata (PCa). Se examinaron una diversidad de parámetros adicionales, tales como los niveles del antígeno específico de la próstata (PSA) en la sangre, y otras variables que se enumeran seguidamente.

La recogida de las muestras fue como se realizó para el Ejemplo 1, pero sin la adición de EDTA a la orina. A continuación de un masaje de próstata, todo el volumen de orina exprimida se recogió y registró. Se realizó inmediatamente un ensayo Combur-10-Test® (de Roche Diagnostics, nº de catálogo 11 203 479) en una parte alícuota de la orina para registrar el peso específico, el pH, el recuento de leucocitos y los niveles de nitrito, proteínas, glucosa, cetonas, urobilinógeno, bilirrubina y eritrocitos. Luego, la orina fue centrifugada a la temperatura ambiente durante 15 min a 1.000 x g. El sedimento celular y el sobrenadante de este sobrenadante fueron manipulados por separado. Después de haber retirado las últimas trazas del sobrenadante, el sedimento se volvió a suspender en 1 ml de una solución salina tamponada con fosfato, enfriada por hielo, y se congeló en nitrógeno líquido o sobre CO<sub>2</sub> congelado. Se congelaron similarmente unas partes alícuotas separadas de 2 x 1,8 ml y hasta 2 x 50 ml del sobrenadante.

Las muestras proteínicas congeladas se descongelaron, y se añadieron 1/100 volúmenes de desoxi-colato al 2 %, seguido por un tratamiento con vórtice y luego por una adición de 1/10 volúmenes de ácido tricloroacético, un tratamiento con vórtice y una incubación durante 10 minutos a 0°C. Esto fue seguido por una centrifugación a 10.000 x g durante 15 min a 4°C para precipitar las proteínas. El sobrenadante se retiró y el sedimento se lavó tres veces con acetona al 80 % enfriada por hielo tratando enérgicamente con vórtice al sedimento, con el fin de eliminar por completo el TCA remanente, seguido por una centrifugación renovada a 10.000 x g igual que antes, después de cada lavado. Después de la centrifugación final, el sobrenadante se retiró y el sedimento se dejó secar al aire durante 2 minutos, prestando atención a no deshidratar por completo el sedimento. Los sedimentos se volvieron a suspender en un tampón de muestra XT hirviendo (tampón 1x XT: 141 mM de la base de Tris; 106 mM de Tris-HCl; 2 % de SDS; BPB; pH aproximadamente 8,5; 50 mM de DTT; 35 % de glicerol).

La concentración de proteínas de cada muestra se estimó cargando unos volúmenes definidos de cada muestra en un gel de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (dodecil sulfato de sodio) (= SDS-PAGE) unidimensional, (Criterion XT-precast gel: de Biorad, número de catálogo 345-0119, número de lote CX 070706 B") que contenía una dilución en serie de cantidades calibradas de proteínas de rata procedentes de materiales lisados de células hepáticas enteras y se sometió a electroforesis en un dispositivo para electroforesis BioRad Criterion de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dicho brevemente, los geles fueron fijados 2 x (veces) durante 30 min en una solución acuosa que contenía 50 % de metanol, 7% de ácido acético, seguido por una tinción durante la noche en una solución de Sypro Ruby (de Molecular Probes, nº S2001). Los geles fueron lavados durante 30 min en 10 % de metanol, 7 % de ácido acético y luego 2 x durante 5 min en agua. La tinción de proteínas con Sypro Ruby fue cuantificada con un reproductor de imágenes digitales, basado en CCD Diana III (de Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhard Alemania: filtro Sypro, 605 nm).

La intensidad de tinción de proteínas de unas pistas de gel teñidas con Sypro Ruby se comparó entre proteínas patrones y muestras de orina de pacientes. Para los sobrenadantes se usó la pista entera para la determinación. Para muestras de sedimentos de orina sólo se consideró el área de la pista que estaba por debajo de la banda de uromodulina dominante, dando como resultado una "concentración de proteínas corregida por uromodulina".

Los niveles de anexina A3 y de lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL, acrónimo de neutrophil gelatinase associated lipocalin, SWISSPROT número de acceso P80188, un marcador para neutrófilos) en cada muestra fueron cuantificados cargando unas cantidades normalizadas de proteínas en geles de SDS-PAGE, en que cada gel contenía tres pistas repetidas de 2 µg de un extracto normalizado de proteínas procedente de un linaje de células de cáncer de próstata humano PC3, que contenía una cantidad de referencia conveniente tanto de anexina A3 como de NGAL. Las proteínas procedentes de estos geles fueron sometidas a una transferencia Western sobre unas membranas de PVDF poli(fluoruro de vinilideno) de acuerdo con métodos clásicos durante 1,5 h a un voltaje constante de 15 V y con un límite de 3 mA/cm<sup>2</sup>.

Los sitios no específicos de fijación de proteínas sobre membranas sometidas a la transferencia se bloquearon por incubación durante 2 h con suave sacudimiento en un TBS (175 mM de NaCl, 3,5 mM de KCl, 20 mM de Tris, pH 7,4) que contenía 5 % de polvo de leche seca, vuelto a disolver. Los anticuerpos primarios fueron añadidos de manera específica para una anexina A3 (dilución a 1:20.000, anti anexina A3 humana de conejo policlonal) o NGAL (dilución a 1:500, anti-lipocalina humana, policlonal, procedente de una cabra, R&D Systems, nº AF1757, lote JBH025051). Después de una incubación a la temperatura ambiente durante 2 h, el tampón se retiró, se lavó tres veces durante 10 min con TBS y luego se incubó con los apropiados respectivos segundos anticuerpos contra IgG de conejo (IgG anti-conejo de cabra, previamente absorbida con IgG humana y con IgG de ratón, se acopla a una peroxidasa de rábano picante. Santa Cruz, nº sc-2054 nº de lote G2005. dilución a 1:5.000) o con IgG de cabra (anti IgG de cabra, procedente de un conejo, previamente absorbida con IgG humana y con IgG de ratón, acoplada a peroxidasa de rábano picante. Santa Cruz Biotechnology #lote sc-2922 #C1405, dilución a 1:5000). Se midió una quimioluminiscencia intensificada (ECL, acrónimo de Enhanced chemiluminescence) después de la adición de Super Signal West Dura, de Pierce (0,1 ml/cm<sup>2</sup>).

Los valores de las señales de NGAL o de anexina A3 fueron normalizados con respecto a la señal media procedente de cada una de las tres pistas de PC3 de referencia en cada gel, y los valores normalizados de anexina A3 o de NGAL fueron usados para el análisis estadístico. A partir de estos valores, se calcularon los niveles de ambas proteínas en relación con el volumen absoluto de las muestras, y también se normalizaron para la concentración de proteínas. Estos valores fueron calculados por separado para el sedimento y el sobrenadante, así como para la relación de sedimento : sobrenadante. Los parámetros que se habían correlacionado con un cáncer y comparado con valores de PSA están recopilados en la Tabla 2.

Los parámetros clínicos registrados incluían los niveles de PSA en sangre, los niveles de PSA libre total y los niveles de PSA convertido en complejo, así como una evaluación histológica de unas biopsias de tejido de próstata, que se obtuvieron a continuación de una donación de orina exprimida, durante el curso de un examen rectal digital (DRE, acrónimo de digital rectal examination) clásico. En los casos en los que unos altos niveles de PSA y DRE en suero indicaron la necesidad de una prostatectomía, la evaluación histológica se realizó en ese material sin ninguna previa biopsia.

Los anteriores parámetros de datos se incluyeron en el análisis estadístico, que incluía también datos clínicos registrados en el hospital. Las biopsias de próstata o la prostatectomía se obtuvieron de todos los pacientes, y el profesional clínico hizo un diagnóstico de positivo o negativo para un PCa basándose en el examen histológico de dicho tejido. Los niveles de PSA en sangre se obtuvieron también de acuerdo con prácticas clínicas normalizadas. La U.S. Food and Drug Administration (FDA) [Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU.] ha aprobado el ensayo de PSA para un escrutinio anual del cáncer de próstata en seres humanos con una edad de 50 años y más. Unos niveles de PSA entre 4 y 10 ng/ml (nanogramos por mililitro) son considerados sospechosos y deberían ser vigilados por una reproducción en imágenes de ultrasonidos del recto y, si fuese indicada, una biopsia. El PSA es propenso a falsos positivos y a falsos negativos. Un cáncer de próstata detectado por biopsia, incluyendo cánceres de alto grado, no es raro entre varones con unos niveles de PSA de 4,0 ng/ml o menos - que se cree generalmente que están dentro del intervalo normal.

El conjunto de datos se compone de archivos de datos procedentes de 250 pacientes. Unos valores iniciales de PSA estaban disponibles en 243 de los 250 pacientes y faltaban para 7 pacientes. Además, dos de los últimos siete pacientes y otros cinco pacientes carecían de los resultados histológicos de la biopsia (cáncer de próstata sí/no). Por lo tanto, todos los resultados aquí presentados usan solamente los datos en aquellos 243 pacientes cuyo estado de PCa es conocido: 140 pacientes con diagnóstico positivo y 103 con diagnóstico negativo de PCa. En las Figuras 8 y 9, se presentan las curvas de Receiver Operating Characteristic (ROC = característica de rendimiento diagnóstico) generadas usando los resultados clínicos, se presentan usando los valores inversos para todas las curvas ROC distintas que para el PSA; es decir, se observó que las áreas bajo las curvas ROC se correlacionaban con unos valores de PSA más altos en pacientes de cáncer, y con una más baja señal media de anexina A3 medida para pacientes con cáncer.

El área bajo la curva ROC (AUROC, acrónimo de area under the ROC curve) para PSA era de 0,684, que es significativamente diferente de una AUROC de 0,5, pero algo artificialmente alta debido al reclutamiento de pacientes en clínicas participantes, (tal como conoce cualquier experto en el sector). Sin embargo, nosotros observamos que nuestro colectivo de pacientes tenía una proporción desusadamente alta de pacientes de cáncer (57 %) puesto que algunos de los pacientes habían sido examinados por nuestros profesionales clínicos de ensayo después de haber proporcionado unas altas lecturas de PSA en otros centros. Los valores de AUROC para las variables individuales basadas en anexina A3, que se midieron, están en el mismo intervalo (el máximo es alcanzado por PU\_ANX\_tot, AUROC 0,666; datos que no se muestran) y también son significativamente diferentes de 0,5. Por lo tanto, una anexina A3 se podría usar también para reemplazar por completo al PSA, a causa de que en la crucial zona de color gris del PSA (2-6 ng/ml y 4-20 ng/ml) una anexina A3 ofrece considerables ventajas (véanse las curvas ROC 0,78 y 0,791 en las Tablas 4-6) con altas especificidades y sensibilidades aceptables, y muestra un rendimiento global similar, considerando todo el intervalo entero de valores de PSA.

5 No había selección previa para una anexina A3 en nuestra selección de pacientes, y no había ninguna correlación entre los valores de anexina A3 y los valores de PSA, indicando que la expresión/secreción de anexina A3 y la entrada de PSA en el torrente sanguíneo son reguladas por mecanismos separados. Nosotros no hemos observado ninguna correlación entre los niveles o bien de PSA o de anexina A3 con la edad de un paciente. Presumiblemente, la alta proporción de pacientes positivos en cuanto a un cáncer, algunos de los cuales habían sido seleccionados previamente sobre la base de unos valores de PSA sospechosamente altos medidos en otros centros, trastorna la esperada abundancia más alta de los niveles de PSA que podría esperarse con una edad creciente. Sin embargo, puesto que no había sido seleccionada previamente una anexina A3, hemos sacado la conclusión de que sus niveles no están probablemente relacionados con la edad.

10 Se pone un énfasis particular sobre el análisis estadístico de la subpoblación de pacientes con unos valores iniciales de PSA situados en el intervalo de 2 ng/ml a 6 ng/ml. De nuevo, los siete valores de AUROC para los parámetros individuales medidos son significativamente diferentes de 0,5, aunque solamente 57 pacientes con PCa y 52 pacientes que no tienen PCa cumplen el criterio de PSA que define a la subpoblación. En contraste con los resultados globales, el AUROC de PSA\_ini no es más larga que la mayor, pero está superado por cinco de los seis valores de AUROC de las variables basadas en anexina A3 (siendo P\_ANX\_ug la única excepción). El más alto valor de AUROC, 0,735, es alcanzado por PU\_ANX\_tot.

20 Junto al intervalo de PSA de 2 ng/ml - 6 ng/ml, el intervalo de PSA de 2,5 ng/ml - 12 ng/ml tiene un interés especial: En esta subpoblación el PSA\_ini propiamente dicho se comporta mal (AUROC 0,580), mientras que el U\_ANX\_tot se comporta como el mejor (AUROC 0,693). Por lo tanto, este intervalo de PSA parece ser apropiado para averiguar las características del siguiente proceso de dos etapas, que es presentado por la vía de una demostración metodológica.

En la primera etapa, los pacientes son asignados a una de tres clases dependiendo de su valor inicial de PSA:

25 PSA\_ini < 2,5 → un bajo riesgo de PCa,  
 PSA\_ini > 12 → un alto riesgo de PCa,  
 PSA\_ini in [2,5, 12] → la aplicación de un ensayo basado en U\_ANX\_tot como una segunda etapa, que decide si son indicados unos procesos invasivos de diagnóstico.

(Los primeros dos casos son citados como la “la decisión más evidente” en el encabezamiento de la Fig 8).

30 Este proceso de dos etapas es incorporado luego dentro de una única variable, aquí denominada twostepvar1, definiendo

35 
$$\text{twostepvar1} := \begin{cases} 100.000, & \text{si PSA\_ini} < 2,5 \\ \text{U\_ANX\_tot}, & \text{si PSA\_ini} \in [2,5, 12] \\ 0, & \text{si PSA\_ini} > 12. \end{cases}$$

40 Unos bajos valores de U\_ANX\_tot indican un riesgo aumentado de cáncer de próstata y unos altos valores indican un riesgo más bajo. El valor 100.000 es escogido con el fin de asegurar que siempre sea mayor que el más alto de los U\_ANX\_tot, realmente medidos. Las características de twostepvar1 pueden observarse en la Figura 8. (La constancia de twostepvar1 para unos valores de PSA\_ini situados por debajo de 2,5 y más allá de 12 da lugar a que la curva ROC comience y termine con un segmento de línea observablemente recta). El AUROC de 0,740 es desde luego diferente, de manera altamente significativa, de 0,5. Además, una comparación con el convencional ensayo de PSA es esclarecedora: Por ejemplo, el criterio “PSA\_ini > 4” conduce - en este conjunto de datos de análisis - a una sensibilidad de 80,3 % y a una especificidad de 49,5 %. La misma sensibilidad, 80,3 %, es obtenida usando el criterio “twostepvar1 < 450”, pero ahora se consigue una especificidad de 57,4 %.

45 El ejemplo de la Fig. 8 demuestra los principios de unos valores de AUROC escalonados que confían en diferentes mediciones (valores de PSA o de anexina A3) dependiendo del nivel de PSA. Estos principios, tal como resultará evidente para los expertos, son los mismos que se usan en varios ensayos presentados en las Tablas 4-6, y que proporcionan más altos valores de AUROC. Las excelentes características de predicción de un cáncer de las variables de anexina A3 en pacientes con niveles intermedios de PSA en suero, son evidenciadas además considerando las múltiples variantes basadas en una anexina A3 para pacientes con unos valores intermedios de PSA.

50 De acuerdo con los métodos y las estrategias que se han demostrado anteriormente, el análisis de una curva ROC fue realizado para los parámetros mostrados en las Tablas 3-6.

55 Adicionalmente a estas variables, el análisis de la curva ROC se realizó usando los siguientes parámetros generados por un análisis de regresión lógica.

**anx.comb.var** está basado en un análisis de regresión lógica usando los U\_ANX\_ug y U\_ANX\_tot combinados como variables de acuerdo con la siguiente relación.

$$\equiv 4,463 + 2,906 \log(1+U\_ANX\_ug) - 0,790 \log(1+U\_ANX\_tot)$$

5 **comb.var.anx.psa1** está basado en un análisis de regresión lógica usando los PSA\_ini y U\_ANX\_tot combinados como variables de acuerdo con la siguiente relación.

$$\equiv 0,254 + 1,046 \log(1+PSA\_ini) - 0,342 \log(1+PU\_ANX\_tot)$$

**comb.var.anx.psa2** está basado en un análisis de regresión lógica usando los PSA\_ini y PU\_ANX\_tot combinados como variables de acuerdo con la siguiente relación.

$$\equiv 2,386 + 3,294 \log(1+PSA\_ini) - 0,475 \log(1+PU\_ANX\_tot)$$

10 Mientras que unos valores de PSA extremadamente bajos o extremadamente altos proporcionan una asignación relativamente confiable en cuanto al estado con cáncer o no canceroso, los resultados de las Tablas 4-6 demuestran con claridad que diversas combinaciones de parámetros basados en anexina A3 sobrepasan al PSA para valores intermedios de PSA. Por lo tanto, la medición de niveles de anexina A3 en sobrenadantes o sedimentos de orina exprimida, incluyendo preferiblemente las relaciones de sobrenadante a sedimento, proporcionan una confiabilidad  
15 mejorada del diagnóstico.

Para demostrar la utilidad de estos resultados, la curva ROC para comb.var.anx.psa2 es presentada con detalle en la Fig. 9 y en la Tabla 7. Esta curva ROC está basada solamente en pacientes con unos valores de PSA comprendidos entre 2 ng/ml y 6 ng/ml, y proporciona un valor de AUROC altamente significativo de 0,791 a pesar del uso de solamente 109 pacientes en este intervalo para el análisis. Además, esta curva ROC exhibe un salto  
20 extremadamente pronunciado en cuando a la sensibilidad (fracción positiva verdadera), en relación con la especificidad (fracción negativa verdadera), que es bastante ventajosa en lo que se refiere al valor predictivo. Por ejemplo, con un nivel de sensibilidad de 54 %, la especificidad es de 96 % (Fig. 9, Tabla 7). La curva ROC axn.comb.var. tenía unas características similares, teniendo, con una sensibilidad de 38 %, una especificidad de 91 % (AUROC 0,78) para el intervalo de PSA de 4 ng/ml a 10 ng/ml. Los datos que aquí se describen demuestran  
25 de una manera convincente que una anexina A3 es un marcador nuevo y potente para un cáncer de próstata, que es especialmente potente en aquellos pacientes en los que los valores de PSA son los menos confiables.

Tomado conjuntamente, el tercer estudio amplio, que era doble ciego y de múltiples centros, mostró que la lectura de diagnóstico más robusta y significativa estadísticamente era la cantidad de anexina A3 en sobrenadantes de orinas exprimidas después de un masaje prostático, que se han obtenido mediante un proceso clínico clásico (DRE)  
30 debido para potenciales pacientes de cáncer de próstata con una clásica centrifugación a baja velocidad. Esto es muy favorable puesto que permite un acceso directo a un ELISA basado en otros ensayos basados en otros anticuerpos sin ninguna previa solubilización de las muestras sedimentadas (peligro de interferencia por detergentes, sales, agentes químicos etc.). Esta cantidad de anexina A3 en los sobrenadantes está correlacionada inversamente con un cáncer, en casos no cancerosos, las cantidades de anexina A3 son más altas, con ciertas  
35 indicaciones de que un perfilamiento adicional y secuencial de casos no cancerosos puede incluso mejorar el valor de diagnóstico global.

Los resultados están completamente en línea con los primeros dos estudios, que eran más pequeños y en algunos aspectos incompletos en lo que concierne a la recogida de las muestras y al control de las muestras. El primer estudio incluía solamente sedimentos (Figura 6), aunque no obstante aquí se encontró la correlación inversa para  
40 pacientes de cáncer. En este estudio se incluyó un grupo de voluntarios sanos, lo cual no ocurría para los subsiguientes estudios. Durante el segundo estudio, que tiene en cuenta una anexina A3 de sobrenadante y una anexina A3 de sedimento (aunque con unos números de muestras que eran demasiado pequeños para llegar a unas soluciones estadísticamente significativas), había una tendencia a unas más altas relaciones de sobrenadante a sedimento en pacientes de cáncer en comparación con una BPH y otros casos no cancerosos. Esto está  
45 perfectamente en línea con los estudios primero y tercero, puesto que evidentemente las bajas cantidades de anexina A3 en los sedimentos se combinan en pacientes de cáncer por una cantidad ligeramente mayor de anexina A3, para relaciones mayores (Figura 7). En casos no cancerosos (tales como p.ej. BPH, fibrosis y otros), evidentemente en total las cantidades de anexina A3 considerablemente más altas en los sedimentos y los sobrenadantes se combinan en relaciones globales más bajas. La robustez de la señal de anexina A3 en los  
50 sobrenadantes proporciona una lectura ventajosa experimental y clínicamente y una lectura de diagnóstico fácil.

## REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar un cáncer de próstata con el fin de discriminar entre un tejido de próstata canceroso y otro no canceroso, que comprende las etapas separadas de
- 5 - determinar la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 intracelular y/o  
 - determinar la abundancia de por lo menos una proteína anexina A3 extracelular,  
 usando unas muestras de orina o unas fracciones de las mismas en las que se observan unos más bajos niveles de una anexina A3 en el estado canceroso, en el que las muestras de orina o las fracciones de las mismas se obtienen a partir de una orina exprimida.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la abundancia de una proteína anexina A3 es determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos una anexina.
- 15 3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la abundancia de una proteína anexina A3 es determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos una proteína adicional tomada del grupo que consiste en el amiloide P de suero, la isopeptidasa T, la proteína de fijación de ácidos grasos de tipo muscular, la galectina 1, la proteína de choque térmico 90, una BiP, la proteína disulfuro isomerasa, la proteína de fijación de ácidos grasos de tipo epidérmico, la enoíl coenzima A hidratasa y la nucleofosmina.
- 20 4. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 3, caracterizado porque la abundancia de una proteína anexina A3 es determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos una proteína adicional tomada del grupo que consiste en la familia 14-3-3, un proteasoma, la subunidad 2 de activador, la familia de las citoqueratinas, la proteína KNP-I alfa y la proteína KNP-I beta.
- 25 5. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 4, caracterizado porque la abundancia de una proteína anexina A3 es determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos un marcador en sangre o suero.
6. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizado porque la abundancia de una proteína anexina A3 es determinada conjuntamente con la abundancia de por lo menos un marcador de células epiteliales.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque una anexina A8 se usa como otra proteína anexina.
8. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 7, caracterizado porque las muestras de orina o fracciones de las mismas son sometidas a un proceso de separación antes de determinar la abundancia de una anexina A3 o de por lo menos una proteína anexina para proporcionar sedimentos celulares y sobrenadantes.
- 30 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque los sedimentos se usan para determinar la abundancia intracelular de una anexina A3 o de por lo menos una proteína anexina.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque los sobrenadantes se usan para determinar la abundancia extracelular de una anexina A3 o de por lo menos una proteína anexina.
- 35 11. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 10, caracterizado porque se añade por lo menos un agente quelador de cationes, particularmente EDTA y/o EGTA, antes de determinar la abundancia de una anexina A3 o de por lo menos una proteína anexina.
12. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 11, caracterizado porque la abundancia de la proteína es determinada mediante métodos inmunohistoquímicos.
- 40 13. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 12, caracterizado porque las muestras de orina exprimida o las fracciones de las mismas son recuperadas subsiguientemente a un masaje de próstata.
14. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 13, caracterizado porque las muestras de orina o las fracciones de la misma son purificadas.
- 45 15. Método de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 14, caracterizado porque se usan muestras o fracciones de las mismas de una orina obtenida por la mañana.
16. Métodos de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 a 12, en los que los niveles de anexinas se miden adicionalmente en las heces o en las células epiteliales del tracto intestinal.

17. Métodos de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 12 y 16, en los que los niveles de anexinas se usan para diagnosticar adicionalmente cánceres epiteliales del tracto gastrointestinal en cualquier fracción o preparación de heces o en cualquier superficie epitelial potencialmente productora de exosomas.

5 18. Métodos de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 hasta 12 y 16 hasta 17, en los que los niveles de anexinas se usan para diagnosticar adicionalmente un cáncer colorrectal.

19. Métodos de acuerdo con una de las precedentes reivindicaciones 1 a 18, en los que los métodos se combinan con la determinación de neutrófilos para discriminar unas condiciones inflamatorias con respecto de unos cánceres.

20. Método de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la condición inflamatoria es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.

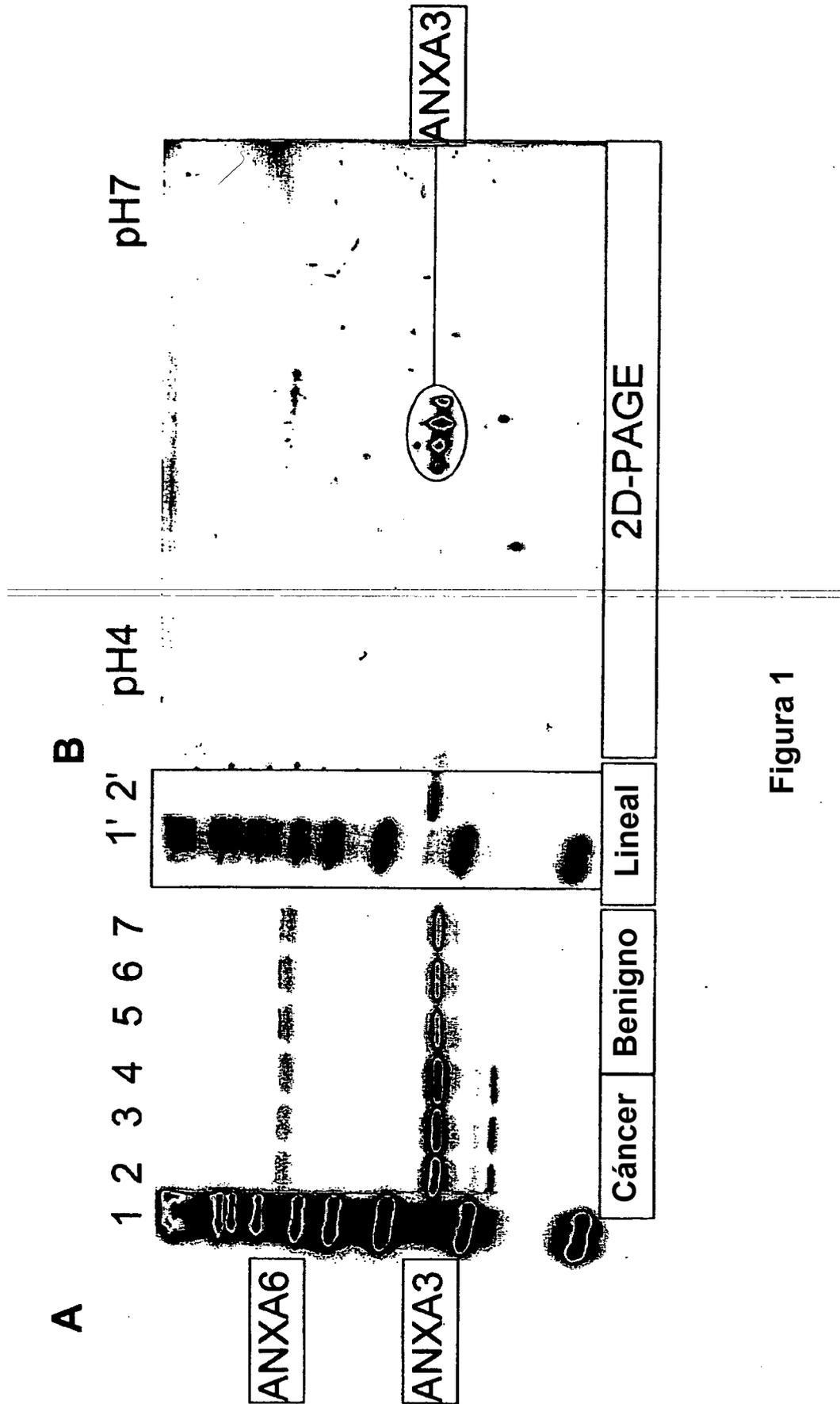


Figura 1



**Figura 2**

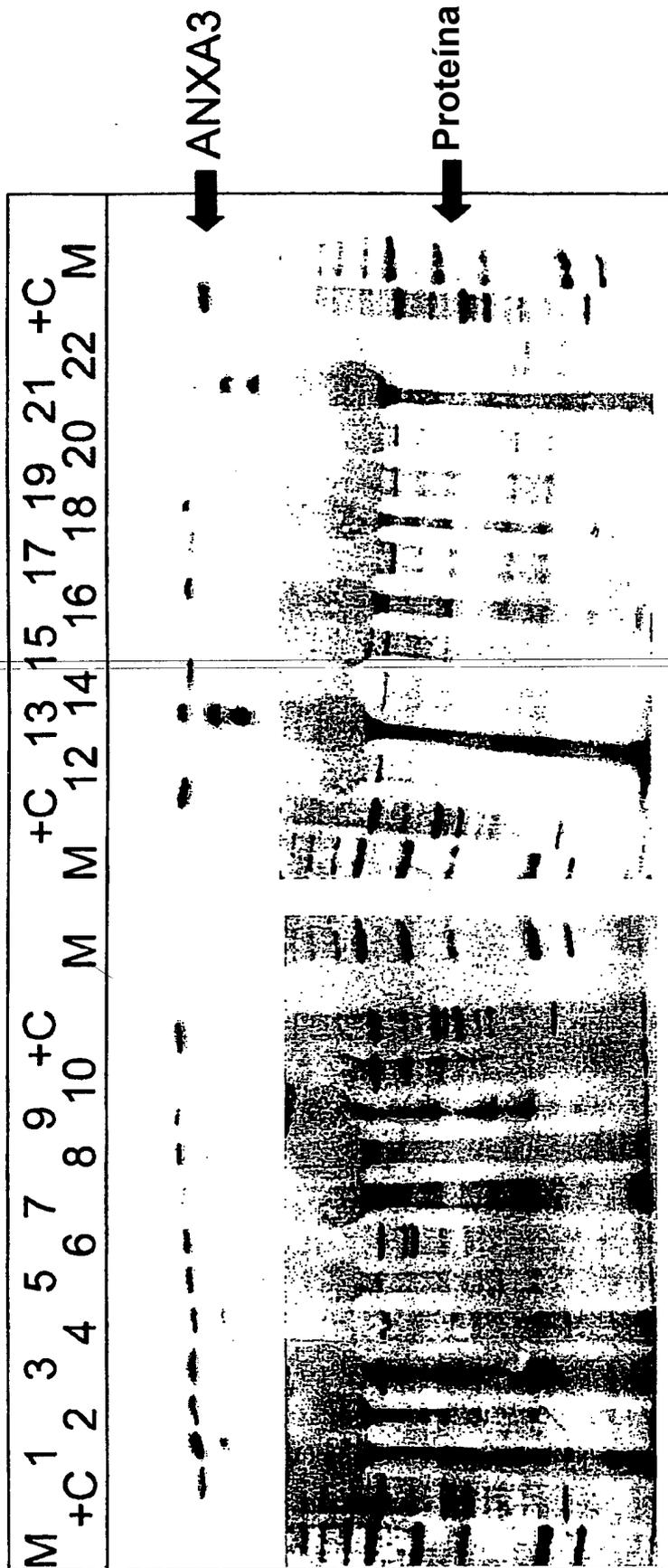


Figura 3

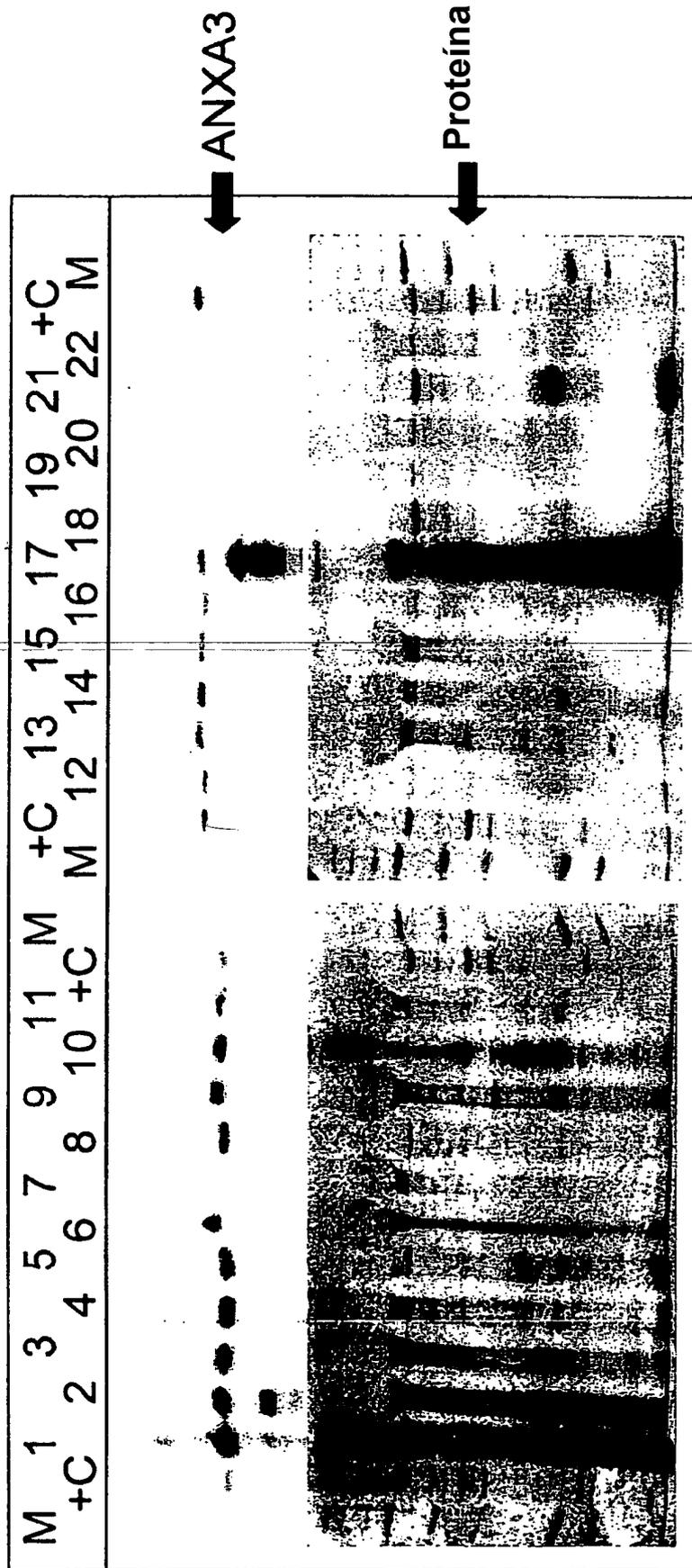


Figura 4

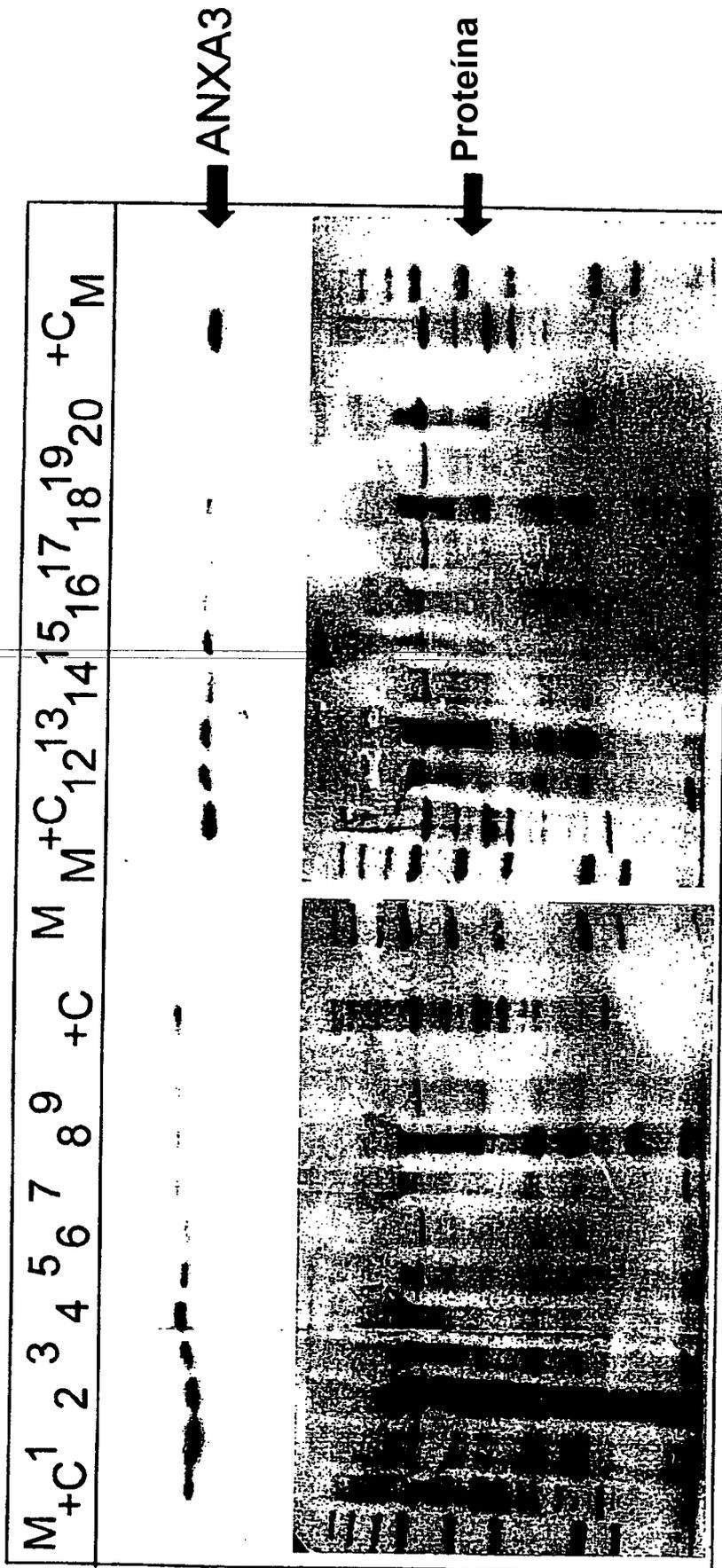


Figura 5

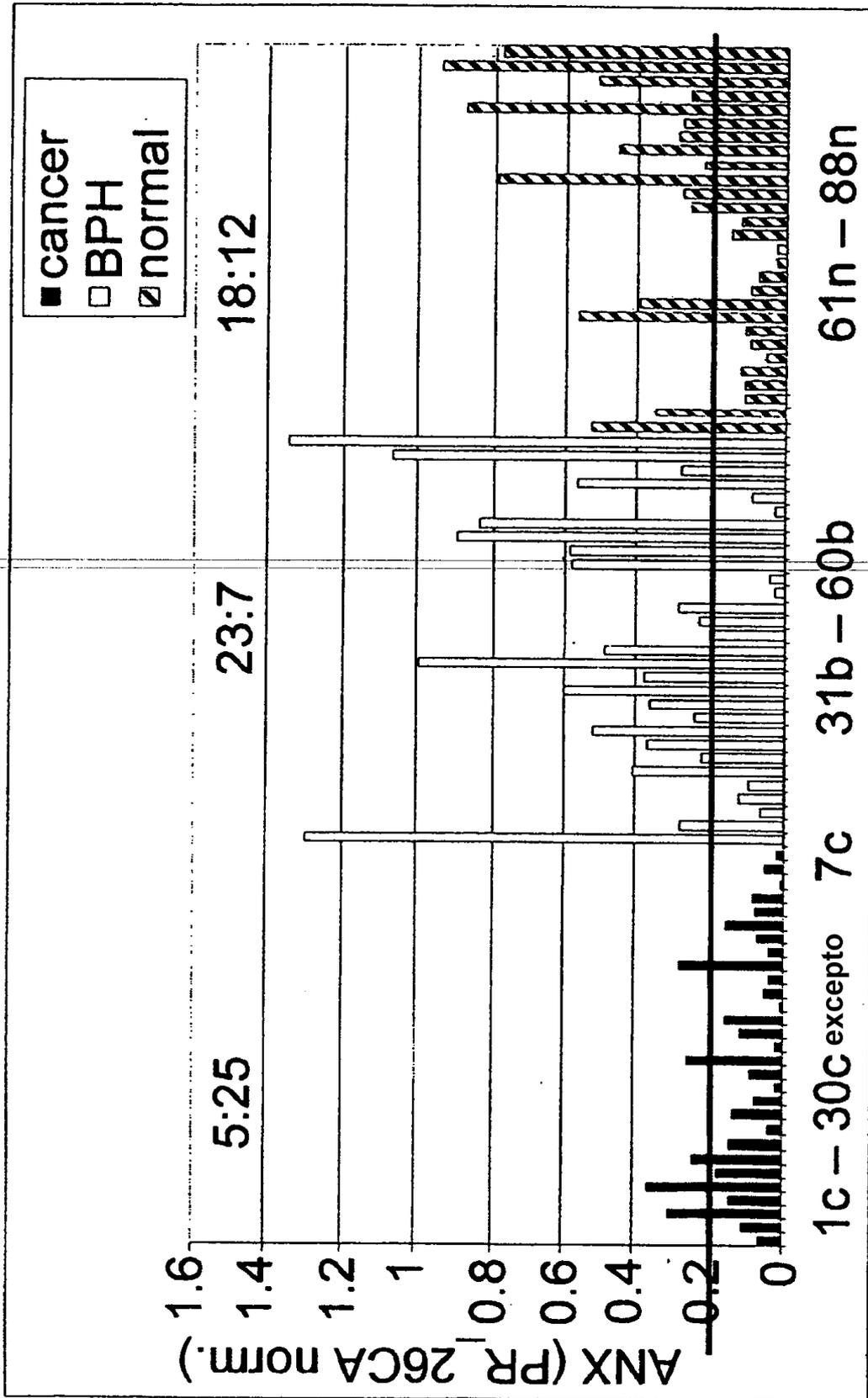


Figura 6

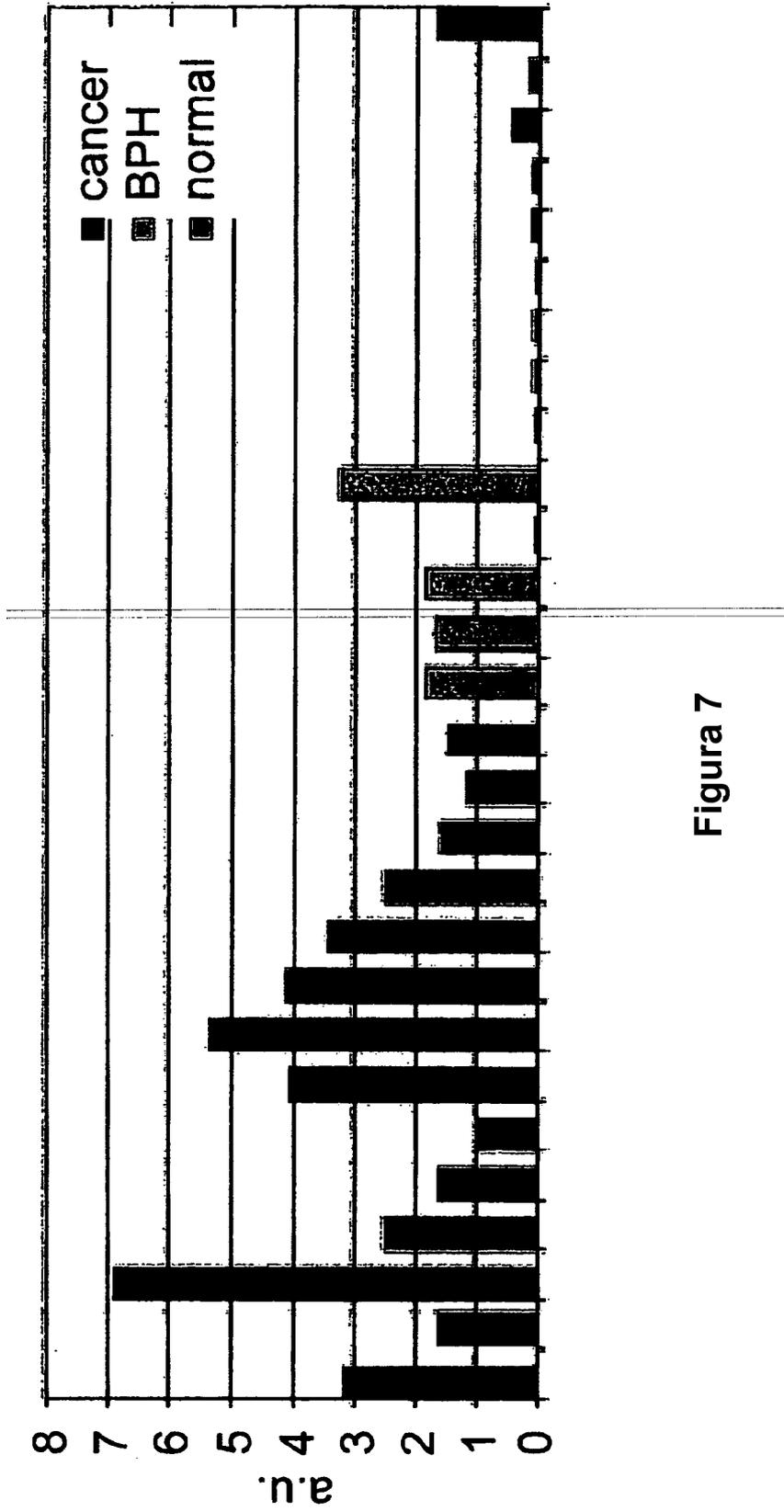


Figura 7

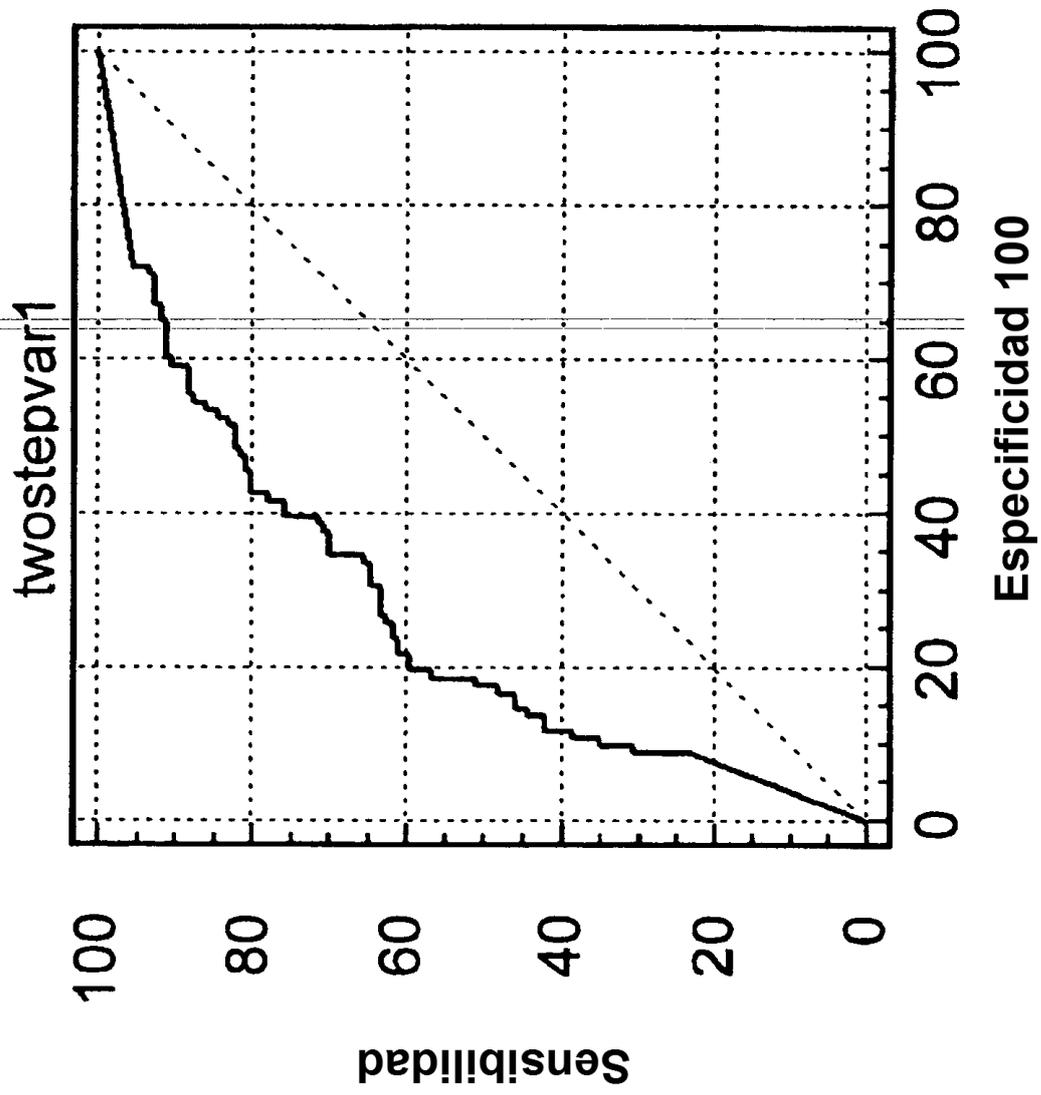


Figura 8

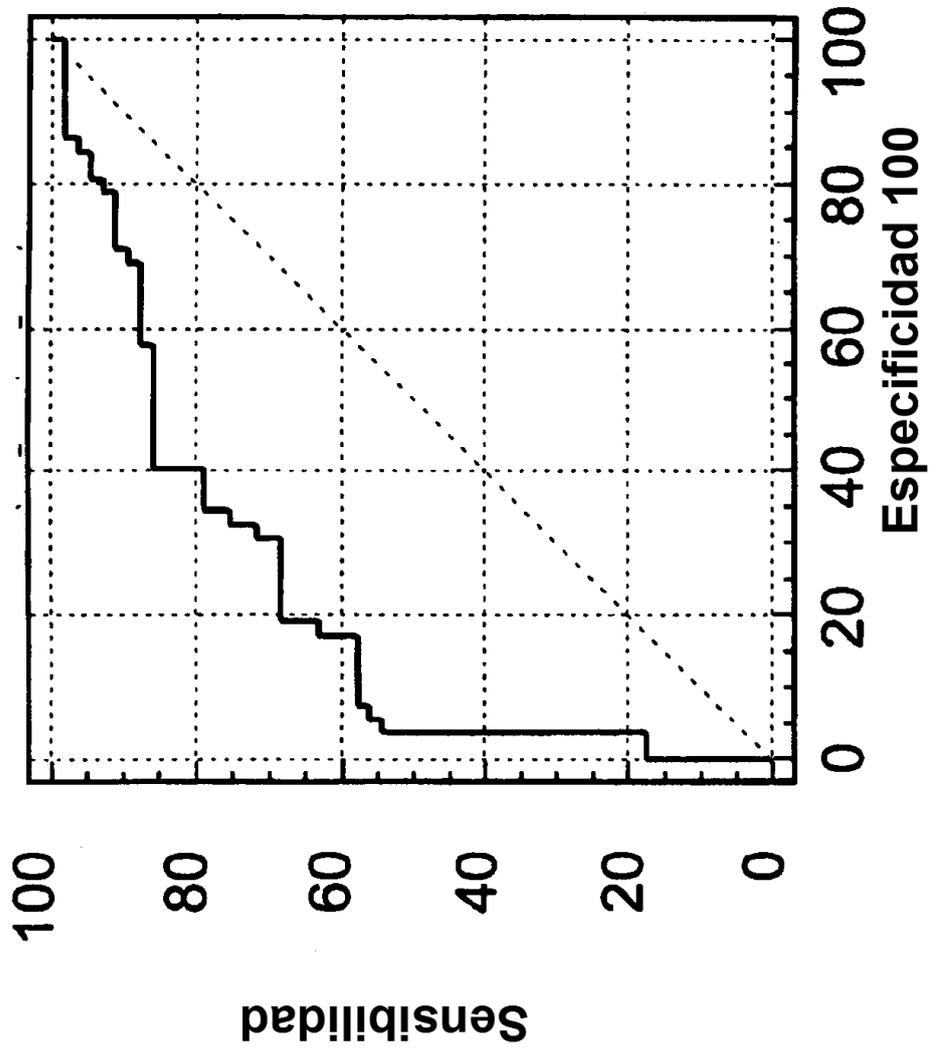


Figura 9