

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 958**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/48** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 08828673 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2187217**

54 Título: **Método para detectar cáncer ginecológico**

30 Prioridad:

**24.08.2007 JP 2007219046**

**13.03.2008 JP 2008063641**

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

**18.12.2013**

73 Titular/es:

**LSIP, LLC (100.0%)  
7-12, Marunouchi 1-chome, Chiyoda-ku  
Tokyo 100-0005, JP**

72 Inventor/es:

**YAMASHITA, KATSUKO;  
SEKO, AKIRA;  
AOKI, DAISUKE y  
SAKAMOTO, MASARU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 434 958 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

Método para detectar cáncer ginecológico

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un método para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial, caracterizado porque se analizan  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4, y GlcNAc 6-O-sulfotransferasa. El término "analizando" o "análisis" tal y como se usa en la presente memoria incluye una medida cuantitativa o semicuantitativa de una cantidad de un compuesto que se va a analizar y una detección usada para determinar la presencia o ausencia de un compuesto que se va a analizar.

**Técnica anterior**

10 Un cáncer ginecológico incluye, por ejemplo, cáncer endocervical, cáncer endometrial, cáncer de ovario, cáncer vulvar, cáncer vaginal, sarcoma uterino y cáncer coriónico (enfermedad trofoblástica). En estos numerosos cánceres, es difícil descubrir el cáncer por síntomas de éste en un estadio temprano. Sin embargo, la proporción de supervivencia de cinco años se incrementa significativamente llevando a cabo una terapia quirúrgica tal como operación en un estadio temprano. Así, se desea desarrollar un marcador tumoral capaz de descubrir el cáncer ginecológico en un estadio temprano.

15 El cáncer de ovario se desarrolla en un ovario en el abdomen. Así, incluso si el cáncer se ha desarrollado en los pacientes, los pacientes con cáncer difícilmente tienen síntomas subjetivos en un estadio temprano. Por lo tanto, en muchos casos, los pacientes con cáncer de ovario se descubren en estadios avanzados tales como estadio III o estadio IV después de la formación de metástasis. En dichos pacientes, incluso si se lleva a cabo un tratamiento, la proporción de supervivencia de cinco años resulta baja. Para el tratamiento de los pacientes con cáncer de ovario, se llevan a cabo terapia quirúrgica para eliminar operativamente un ovario y un epiplón, terapia con irradiación y quimioterapia usando fármacos anticancerosos.

20 En un estadio menos avanzado tal como estadio I o estadio II en los pacientes con cáncer de ovario, puede ser posible curar completamente el cáncer de ovario eliminando operativamente un ovario y los tejidos circundantes. Por el contrario, en un estadio avanzado tal como estadio III o estadio IV, se desarrollan metástasis del cáncer de ovario en el ganglio linfático o el hígado. Como el tejido canceroso no puede eliminarse completamente de los pacientes, se lleva a cabo por lo tanto terapia de irradiación o quimioterapia simultáneamente con la terapia quirúrgica. Sin embargo, es difícil prevenir completamente el cáncer metastásico por terapia de irradiación y quimioterapia y, así, la proporción de supervivencia de cinco años de dichos pacientes es extremadamente baja en comparación con aquellos pacientes que se descubren en el estadio I o II. Por lo tanto, se desea el descubrimiento de los pacientes con cáncer de ovario en un estadio temprano.

25 Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes con cáncer de ovario difícilmente tienen síntomas subjetivos en un estadio temprano y, por lo tanto, muchos de los pacientes se descubren mediante técnicas de diagnóstico por imagen usando sonidos ultrasónicos en un estadio avanzado.

30 Como un marcador de diagnóstico para detectar el cáncer de ovario se usa lo más ampliamente una medida de glicoproteína, es decir, CA125. La proporción positiva alta de CA125 en el adenocarcinoma seroso es muy conocida entre los cuatro tipos histológicos de cáncer de ovario, es decir, adenocarcinoma seroso, adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma endometriode y adenocarcinoma de células claras. Además, CA125 es un marcador específico para el cáncer de ovario. Muchos de los pacientes en un estadio avanzado tienen CA125 positivo. Sin embargo, la proporción positiva de CA125 en los pacientes con cáncer de ovario en un estadio temprano es baja. Aunque se ha hecho un intento para el diagnóstico temprano mediante el ensayo de CA125 en un examen médico en Europa y los Estados Unidos, la eficacia de éste no pudo ser demostrada.

35 El cáncer endometrial se desarrolla en un endometrio en el útero y no puede detectarse por el citodiagnóstico que se lleva a cabo en un examen ginecológico convencional. Los pacientes con cáncer endometrial se tratan con terapia quirúrgica eliminando operativamente el tejido canceroso, terapia de irradiación, quimioterapia usando fármacos anticancerosos y terapia hormonal.

40 Los estadios del cáncer endometrial pueden clasificarse en estadio I a estadio IV según la diseminación del cáncer. La terapia quirúrgica se aplica en los estadios I a III y después la proporción de supervivencia de cinco años se ha incrementado llevando a cabo la terapia quirúrgica en un estadio temprano. Por lo tanto, se desea el descubrimiento de los pacientes con cáncer endometrial en un estadio temprano.

45 Como un marcador de diagnóstico del cáncer endometrial, se usa CA125 o CA602 que es una glicoproteína, o CA19-9 que se usa como marcador de diagnóstico del cáncer de páncreas. Sin embargo, las proporciones de detección de los pacientes con cáncer endometrial por los marcadores de diagnóstico son extremadamente bajas y, así, estos marcadores de diagnóstico no tienen un beneficio respecto al diagnóstico.

En varias células cancerosas y tejidos cancerosos, se indica el incremento o disminución de muchas proteínas. Por ejemplo, se indicó que  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 (referida de aquí en adelante en la presente memoria como  $\beta$ 3Gal-T5), que es una glicosiltransferasa implicada en la síntesis de (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) de tipo I se expresa en células de cáncer de colon y células de cáncer de páncreas y tejidos de cáncer de colon (referencia de patente 1 y referencia no de patente 1). Además, se ha indicado que GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2 (referida de aquí en adelante en la presente memoria como GlcNAc6ST-2), que es una sulfotransferasa implicada en la síntesis del ligando L-selectina, se expresa ectópicamente en tejidos de cáncer de colon mucinoso (referencia no de patente 2) y tejidos de adenocarcinoma mucinoso y adenocarcinoma de células claras (referencia no de patente 3).

Sin embargo, estas indicaciones describen meramente que las glicosil/sulfotransferasas se expresan en células cancerosas o tejidos cancerosos pero no describen la utilidad de las glicosil/sulfotransferasas como un marcador tumoral en la sangre. Las glicosiltransferasas no se secretan generalmente al exterior de las células y, así, se pensó que estas glicosiltransferasas no eran útiles como el marcador tumoral en la sangre. Además, no existe ninguna publicación que muestre una correlación entre  $\beta$ 3Gal-T5 y cáncer de ovario,  $\beta$ 3Gal-T5 y cáncer endometrial o GlcNAc6ST-2 y cáncer endometrial. Además, respecto a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 (referida de aquí en adelante en la presente memoria como  $\beta$ 3Gal-T4) que es de la familia  $\beta$ 1,3-glicosiltransferasa, no se ha publicado ninguna correlación entre  $\beta$ 3Gal-T4 y cáncer de ovario o cáncer endometrial.

#### Lista de citas

[referencia de patente 1] Publicación Internacional WO00/50608

[referencia no de patente 1] Seko A., et al. Cancer Research, 1996, (los Estados Unidos), vol. 56, p. 3468-3473

[referencia no de patente 2] Seko A., et al. Glycobiology, 2002, (los Estados Unidos) vol. 12, p. 379-388

[referencia no de patente 3] Kanoh A., et al. Glycoconjugate Journal, 2006, (Holanda) vol. 23, p. 453-460

#### Descripción de la invención

##### Problemas a resolver por la invención

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos para una posibilidad de varias proteínas intracelulares como un marcador tumoral, para descubrir un marcador para la detección capaz de detectar pacientes con cáncer de ovario y pacientes con cáncer endometrial. Como resultado, los presentes inventores descubrieron, sorprendentemente, que se detectaron  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5, o GlcNAc6ST-2 en la sangre de los pacientes con cáncer de ovario en proporciones altas. Particularmente, la proporción positiva de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 era alta en todos los tipos histológicos de cáncer de ovario, es decir, adenocarcinoma seroso, adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma endometriode y adenocarcinoma de células claras. Además, un rango de células cancerosas que secretan  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 no se superpone completamente con el de las células cancerosas que secretan GlcNAc6ST-2. Por lo tanto, los presentes inventores descubrieron que una proporción para la detección de cáncer de ovario se vuelve significativamente mayor por una combinación de un ensayo de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 y un ensayo de GlcNAc6ST-2.

Además, los presentes inventores descubrieron que se detectaron  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5, o GlcNAc6ST-2 en la sangre de los pacientes con cáncer endometrial en proporciones altas. En particular, la proporción positiva alta de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 en pacientes con cáncer endometrial se muestra en comparación con CA125, CA602 o CA19-9. Además, un rango de células cancerosas que secretan  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 no se superpone completamente con el de las células cancerosas que secretan GlcNAc6ST-2. Por lo tanto, los presentes inventores descubrieron que una proporción para la detección de cáncer endometrial se vuelve significativamente mayor por la combinación del ensayo de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 y el ensayo de GlcNAc6ST-2 y completa la presente invención.

A este respecto, la referencia no de patente 3 describe que GlcNAc6ST-2 se expresa ectópicamente en tejidos de adenocarcinoma seroso y adenocarcinoma de células claras. Sin embargo, la referencia no de patente 3 describe además de la información anterior, que no se detectó expresión de GlcNAc6ST-2 en adenocarcinoma endometriode. Esto es, la referencia no de patente 3 describe meramente que GlcNAc6ST-2 se expresa en tejidos de adenocarcinoma seroso y adenocarcinoma de células claras y, por lo tanto, la alta proporción de detección de GlcNAc6ST-2 en la sangre de pacientes con cáncer de ovario no podía anticiparse. En otras palabras, es inesperado para los expertos en la técnica que GlcNAc6ST-2 pueda detectarse en la sangre de los pacientes con adenocarcinoma seroso y adenocarcinoma de células claras en proporciones altas, a pesar del hecho de que GlcNAc6ST-2 no pudo detectarse en los tejidos de adenocarcinoma seroso y adenocarcinoma de células claras.

De acuerdo con esto, el objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial y un kit para detectar los mismos, y un uso de un kit para detectar los mismos.

**Medios para resolver los problemas**

La presente invención se refiere a métodos para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial, como se define en las reivindicaciones, caracterizados porque se analizan  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4, GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2, respectivamente.

5 Según una realización preferible del método de detección de la presente invención, se usa un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4. Según una realización preferible del método de detección de la presente invención, se usa un anticuerpo que se une específicamente a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.

10 Como una muestra que se va a ensayar en el método de detección de la presente invención, puede usarse una muestra biológica aislada u obtenida del cuerpo humano, por ejemplo, orina, sangre, suero, plasma, fluido espinal, saliva, célula, tejido, órgano o preparación de éstos (por ejemplo, muestra de biopsia, particularmente muestra de biopsia de ovario) o semejantes. Sin embargo, las muestras que se van a usar se especifican como se define en las reivindicaciones. El método de detección de la presente invención puede usarse como un método de diagnóstico de cáncer de ovario o cáncer endometrial, mediante la detección de  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 y GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2, respectivamente, en muestras que se van a ensayar aisladas del cuerpo humano, como se especifica en las reivindicaciones.

15 Además, la presente invención se refiere a un kit para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial, caracterizado porque contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 y un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.

20 Además, la presente invención se refiere a un uso de un kit para detectar cáncer de ovario o endometrial, caracterizado porque contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4.

25 Además, la presente invención se refiere a un uso de un kit para detectar cáncer de ovario o endometrial, caracterizado porque contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.

La presente invención se refiere a un método para detectar cáncer de ovario caracterizado porque se analizan  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 y GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.

30 Además, la presente invención se refiere a un método para detectar cáncer de ovario caracterizado porque se analizan  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4.

Además, la presente invención se refiere a un método para detectar cáncer de ovario caracterizado porque se analiza GlcNAc 6-O-sulfotransferasa en la sangre, suero o plasma.

Según una realización preferible del método de detección de la presente invención, se usa un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4.

35 Según una realización preferible del método de detección de la presente invención, se usa un anticuerpo que se une específicamente a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.

40 Además, la presente invención se refiere a un kit para detectar cáncer de ovario, caracterizado porque contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 y un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.

Además, la presente invención se refiere a un uso de un kit para detectar cáncer de ovario, caracterizado porque contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4.

45 Además, la presente invención se refiere a un uso de un kit para detectar cáncer de ovario mediante el análisis de GlcNAc 6-O-sulfotransferasa en la sangre, suero o plasma, caracterizado porque contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.

La invención también se refiere a métodos para detectar cáncer endometrial, usos de kit para detectar dicho cáncer y un kit para detectar dicho cáncer como se define en las reivindicaciones 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12 y 14.

**Efectos de la invención**

50 Hasta el momento, como un marcador para la detección de cáncer de ovario, se ha usado ampliamente CA125 o CA546 que son glicoproteínas. Según el método de detección de la presente invención, los pacientes con cáncer de

ovario pueden detectarse en proporciones altas en estadios tempranos, es decir, estadio I o II, en comparación con el marcador para la detección de cáncer de ovario convencional anterior. Esto es, según el método de detección de la presente invención,  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 o GlcNAc6ST detectada en sangre, suero o plasma, que se secretan de tejido de cáncer relativamente pequeño, también pueden detectarse y, por lo tanto, los pacientes con cáncer de ovario del estadio I, que no tienen síntomas subjetivos, pueden detectarse en un examen médico. Además, según el método de detección en el que se analiza  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5, de la presente invención, pueden detectarse adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma endometriode y adenocarcinoma de células claras en una proporción alta en comparación con el método convencional, en particular, pueden detectarse en proporciones altas adenocarcinoma mucinoso y adenocarcinoma de células claras, que son intratables y resistentes a la quimioterapia.

Una proporción de detección de cáncer de ovario puede incrementarse significativamente mediante una combinación de un método de detección en el que se analiza  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5, de la presente invención y un método de detección en el que se analiza GlcNAc6ST de la presente invención. En particular, en los pacientes en un estadio temprano, es decir, estadio I o II de cáncer de ovario, la combinación de éstos es significativamente eficaz.

Además, en los pacientes de tipos histológicos de adenocarcinoma endometriode y adenocarcinoma de células claras, la proporción de detección de cáncer de ovario puede incrementarse mediante la combinación de éstos.

Como un marcador para la detección de cáncer endometrial, se usó CA125, CA602 o CA19-9. Según el método de detección de la presente invención, el cáncer endometrial puede detectarse en proporciones altas en un estadio temprano, es decir, estadio I, en comparación con los marcadores para la detección convencionales anteriores. Esto es, según el método de detección de la presente invención  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 o GlcNAc6ST-2, que se secretan de una cantidad relativamente pequeña de tejido canceroso, también pueden detectarse en la sangre, suero o plasma. Por lo tanto, puede detectarse el cáncer endometrial, que no puede detectarse por citodiagnóstico en un examen ginecológico convencional.

Además, la proporción de detección del cáncer endometrial puede incrementarse significativamente mediante la combinación de un método de detección en el que se analiza  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5, de la presente invención y un método de detección en el que se analiza GlcNAc6ST-2 de la presente invención.

Además, el método para la detección de la presente invención también puede usarse en la monitorización de una recurrencia del cáncer y monitorización de los efectos de la terapia de irradiación y quimioterapia.

### Descripción breve de los dibujos

[Figura 1]

La Figura 1 es fotografías que muestran la especificidad del anticuerpo monoclonal y antisuero policlonal frente a  $\beta$ 3Gal-T5. A:  $\beta$ 3GalT-1 (carril 1),  $\beta$ 3GalT-2 (carril 2),  $\beta$ 3GalNac-T1 (carril 3),  $\beta$ 3GalT-4 (carril 4),  $\beta$ 3Gal-T5 (carril 5) y  $\beta$ 3GalT-6 (carril 6) se sometieron a electroforesis y se tiñeron con Spyro Naranja (Invitrogen). B: Cada proteína se sometió a un método de transferencia western usando un anticuerpo monoclonal frente a  $\beta$ 3Gal-T5. C: Cada proteína se sometió a un método de transferencia western usando un antisuero policlonal frente a  $\beta$ 3Gal-T5.

[Figura 2]

La Figura 2 es fotografías que muestran la especificidad del anticuerpo monoclonal y antisuero policlonal frente a GlcNAc6ST-2. A: GlcNAc6ST1 (carril 1), GlcNAc6ST-2 (carril 2), GlcNAc6ST-3 (carril 3), GlcNAc6ST-4 (carril 4), GlcNAc6ST-5 (carril 5), Gal6ST (carril G) y Ch6ST1 (carril C) se sometieron a electroforesis y se tiñeron con Spyro Naranja (Invitrogen). B: Cada proteína se sometió a un método de transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal frente a GlcNAc6ST-2. C: Cada proteína se sometió a un método de transferencia Western usando un antisuero policlonal frente a GlcNAc6ST-2.

[Figura 3]

La Figura 3A es una curva estándar de  $\beta$ 3Gal-T5 por un ELISA en sandwich usando un anticuerpo monoclonal y antisuero policlonal frente a  $\beta$ 3Gal-T5. La Figura 3B es una curva estándar de GlcNAc6ST-2 por un ELISA en sandwich usando un anticuerpo monoclonal y antisuero policlonal frente a GlcNAc6ST-2.

[Figura 4] La Figura 4 es fotografías en las que se muestra la expresión de ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 en cinco líneas celulares de cáncer de ovario, es decir, ES-2 (carril 1), MCAS (carril 2), RMG-I (carril 3), RMG-II (carril 4) y RMUG-L (carril 5) por RT-PCR.

[Figura 5]

La Figura 5A es una curva estándar de  $\beta$ 3Gal-T5 por un ELISA en sandwich usando un anticuerpo monoclonal y antisuero policlonal frente a  $\beta$ 3Gal-T5. Como diluyente para la sustancia estándar,  $\beta$ 3Gal-T5 no desnaturalizado (*E. coli*), se usó PBS con 0,1% Tween-20 (PBS-T) incluyendo 10% suero humano normal. La Figura 5B es una curva estándar de GlcNAc6ST-2 por un ELISA en sandwich usando un anticuerpo monoclonal y antisuero policlonal frente

a GlcNAc6ST-2. Como diluyente para la sustancia estándar, GlcNAc6ST-2 no desnaturalizado (E. coli), se usó PBS con 0,1% Tween-20 (PBS-T) incluyendo 10% suero humano normal.

### **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

[1] Un método para detectar los cánceres de ovario y endometrial

- 5 Según el método de detección de la presente invención, estos cánceres pueden detectarse en pacientes. Particularmente, el cáncer de ovario y cáncer endometrial se detectan con una alta proporción de detección. Por lo tanto, como realizaciones de la presente invención, el cáncer de ovario y cáncer endometrial se describen a continuación en la presente memoria.

[1-1] Cáncer de ovario

- 10 El ovario es un órgano ovalado que tiene aproximadamente el tamaño del pulgar localizado a ambos lados del útero. El cáncer de ovario se desarrolla en él, y es mayoritariamente un cáncer epitelial. El cáncer de ovario puede clasificarse en los estadios I a IV, según la progresión del cáncer, como se describe más adelante.

Estadio I: El cáncer sólo está en el interior del ovario. Esto es, el cáncer está en uno o ambos ovarios y no está en el exterior de un ovario.

- 15 Estadio II: El cáncer está en uno o ambos ovarios y se extiende en los tejidos pélvicos. Esto es, el cáncer se ha diseminado (metastatizado) en las proximidades de un ovario (por ejemplo, peritoneo tal como los trompas de falopio, útero, el recto o la vejiga) en la pelvis.

- 20 Estadio III: El cáncer se ha diseminado (metastatizado) (1) más allá de la pelvis con diseminación peritoneal; (2) los ganglios linfáticos del retroperitoneo o ganglios linfáticos inguinales; (3) la superficie del hígado; (4) el intestino delgado o colon histológicamente. Esto es, el cáncer no se ha limitado a las proximidades de un ovario (peritoneo en la pelvis) sino que se ha diseminado (metastatizado) en el abdomen superior o en los ganglios linfáticos del retroperitoneo.

- 25 Estadio IV: (1) el cáncer se ha diseminado (metastatizado) a un sitio distante; (2) las células cancerosas se encuentran en fluido pleural; (3) el cáncer se ha diseminado (metastatizado) al interior del hígado. Esto es, el cáncer se ha diseminado al exterior de la cavidad peritoneal o en el interior del hígado.

- 30 Debido a la ausencia de síntomas subjetivos en un estadio temprano, sólo aproximadamente un tercio de los casos de cáncer de ovario se descubren en los estadios I y II y así dos tercios de éste se descubren en los estadios III y IV. Cuando un cáncer de ovario se descubre en los estadios III y IV, se ha producido la metástasis del cáncer de ovario fuera de la cavidad pélvica. Por lo tanto, la cura completa es difícil porque el cáncer de ovario descubierto no puede eliminarse completamente.

- 35 Aunque los tipos histológicos de cáncer de ovario son variados, el cáncer de ovario puede clasificarse principalmente en adenocarcinoma seroso, adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma endometrioide y adenocarcinoma de células claras. Entre los cuatro tipos histológicos, se considera que el adenocarcinoma seroso ocurre lo más frecuentemente. En la mayor parte de los marcadores convencionales de cáncer de ovario, se detecta dicho adenocarcinoma seroso. Además, a la vista de la sensibilidad a quimioterapia, se considera que el adenocarcinoma seroso y el adenocarcinoma de células claras presentan una alta resistencia a fármacos anti tumorales.

[1-2] Cáncer endometrial

- 40 El cáncer endometrial se desarrolla en el epitelio del útero, es decir, endometrio, y así es un cáncer epitelial. El cáncer endometrial puede clasificarse en los estadios I a IV, según el estadio de la progresión del cáncer, como se describe a continuación.

Estadio I: El cáncer se encuentra sólo en el cuerpo uterino. Esto es, el cáncer no se encuentra en el cuello del útero u otras partes.

- 45 Estadio II: El cáncer se ha diseminado desde el útero al cuello uterino. Esto es, el cáncer no se ha diseminado fuera del útero.

Estadio III: el cáncer se ha diseminado más allá del útero y cuello uterino, pero no se ha diseminado más allá de la pelvis. El cáncer se ha diseminado (metastatizado) a los ganglios linfáticos pélvicos o ganglios linfáticos periaórticos.

Estadio IV: El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo más allá de la pelvis; o vejiga; o pared del intestino.

- 50 El cáncer endometrial no puede descubrirse por el citodiagnóstico para cáncer endocervical en el examen ginecológico convencional. Sin embargo, si los casos de cáncer endometrial pueden descubrirse en los estadios I a

III, es aplicable la terapia quirúrgica por operación. Además, si la operación se lleva a cabo en un estadio temprano, el efecto de la terapia se vuelve mayor.

[1-3] Análisis de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5

5 En la presente invención, el cáncer de ovario o cáncer endometrial se detecta analizando  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5. También, el cáncer ginecológico, en particular, cáncer de ovario o cáncer endometrial puede detectarse analizando  $\beta$ 3Gal-T4. Además, el cáncer de ovario o cáncer endometrial también puede detectarse analizando  $\beta$ 3Gal-T5. Además, el cáncer de ovario o cáncer endometrial también puede detectarse analizando  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5, todo según se especifica en las reivindicaciones.

10  $\beta$ 3Gal-T4 pertenece a la familia  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa, y sintetiza el gangliósido GD1a, gangliósido GM1 o gangliósido GD1b. Mientras,  $\beta$ 3Gal-T5 presenta una especificidad de sustrato diferente de la de  $\beta$ 3Gal-T4 y puede sintetizar la estructura Gal $\beta$ 1-3 GlcNAc.

15 Como se muestra en el Ejemplo 2, los ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 se expresan en la mayor parte de las líneas celulares derivadas de cáncer de ovario. El rango de las líneas celulares que expresan el ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 no se superpone completamente con el de  $\beta$ 3Gal-T5. Sin embargo, en todas las líneas celulares examinadas, se expresan los ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5. Además, los presentes inventores midieron las actividades enzimáticas de  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 en tejidos de cáncer de ovario de cinco pacientes y pudieron detectar las actividades enzimáticas de  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 en los tejidos de todos los pacientes.

20 Como se muestra en el Ejemplo 1, las especificidades del anticuerpo monoclonal y el antisuero policlonal obtenido mediante la inmunización con  $\beta$ 3Gal-T5 se examinaron usando otra  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa. Como resultado, se demostró que tanto  $\beta$ 3Gal-T4 como  $\beta$ 3Gal-T5 pueden detectarse por un sistema de ELISA mediante el uso del anticuerpo monoclonal y el antisuero policlonal.

25 Se considera que el cáncer de ovario incluye células de cáncer de ovario que secretan  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 a la sangre, células de cáncer de ovario que sólo secretan  $\beta$ 3Gal-T4 a la sangre y células de cáncer de ovario que sólo secretan  $\beta$ 3Gal-T5 a la sangre. Por lo tanto, se considera que la  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa que está presente en los sueros de los pacientes con cáncer de ovario y se mide por el sistema de ELISA anterior, puede ser  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5.

30 Además, se considera que el cáncer endometrial incluye células de cáncer endometrial que secretan  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 a la sangre, células de cáncer endometrial que sólo secretan  $\beta$ 3Gal-T4 a la sangre y células de cáncer endometrial que sólo secretan  $\beta$ 3Gal-T5 a la sangre. Por lo tanto, se considera que la  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa que está presente en los sueros de los pacientes con cáncer de ovario y se mide por el sistema de ELISA anterior, puede ser  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5.

35 En la presente invención, el método para analizar  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 no está limitado particularmente, siempre que pueda determinar una cantidad de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 cuantitativamente o semicuantitativamente o determinar la presencia o ausencia de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5. Puede mencionarse, por ejemplo, un inmunoensayo que usa anticuerpo o fragmento de éste frente a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5, tal como inmunoensayo enzimático, ensayo de aglutinación en látex, inmunoensayo quimioluminiscente, técnica de anticuerpo con fluorescencia, radioinmunoensayo, técnica de inmunoprecipitación, ensayo inmunohistoquímico o análisis por transferencia Western; un ensayo bioquímico tal como análisis enzimático; y un ensayo de biología molecular en el que se mide el ARNm.

40 Cuando se usa el inmunoensayo como el método para analizar  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5, puede usarse el anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5. Alternativamente, puede usarse una combinación de un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a  $\beta$ 3Gal-T4 y un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a  $\beta$ 3Gal-T5.

45 Cuando se usa el inmunoensayo como el método para analizar  $\beta$ 3Gal-T4, puede usarse el anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a  $\beta$ 3Gal-T4. Además, puede usarse el anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5.

50 Cuando se usa el inmunoensayo como el método para analizar  $\beta$ 3Gal-T5, puede usarse el anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a  $\beta$ 3Gal-T5. Además, puede usarse el anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5.

El anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal puede producirse según métodos conocidos, excepto en que se usa  $\beta$ 3Gal-T4 o  $\beta$ 3Gal-T5 como un antígeno para la inmunización. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal se prepara según un método de fusión celular de Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975). En una preparación de anticuerpo policlonal, por ejemplo, se conjuga  $\beta$ 3Gal-T4 o  $\beta$ 3Gal-T5 con BSA o KLH. El  $\beta$ 3Gal-

T4 o  $\beta$ 3Gal-T5 conjugado, o  $\beta$ 3Gal-T4 o  $\beta$ 3Gal-T5 no conjugado, se emulsiona en un adyuvante apropiado (por ejemplo adyuvante completo de Freund) y usándolos se inmunizan conejos rutinariamente intradérmicamente. Si la titulación de un anticuerpo en sangre se incrementa, se recoge la sangre y puede usarse como un antisuero o un anticuerpo purificado por los métodos conocidos, Además, puede inmunizarse un ratón o conejo tanto con  $\beta$ 3Gal-T4 como con  $\beta$ 3Gal-T5 para obtener un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal que puede unirse tanto a  $\beta$ 3Gal-T4 como a  $\beta$ 3Gal-T5.

Cuando se usa el ensayo bioquímico como el método para analizar  $\beta$ 3Gal-T4 o  $\beta$ 3Gal-T5, por ejemplo, pueden medirse las actividades enzimáticas de  $\beta$ 3Gal-T4 o  $\beta$ 3Gal-T5 según métodos de Miyazaki et al. [Miyazaki et al., J. Biol. Chem., (1997) 272, 24794-24799] o Seko et al. [Seko et al., Cancer Res., (1996) 56, 3468-3473], mediante los cuales puede analizarse una cantidad de  $\beta$ 3Gal-T4 o  $\beta$ 3Gal-T5 o la presencia o ausencia de  $\beta$ 3Gal-T4 o  $\beta$ 3Gal-T5.

Como un antígeno inmunizante para obtener un anticuerpo monoclonal o policlonal frente a  $\beta$ 3Gal-T5, puede usarse una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 o un péptido que consiste en una parte de ésta. Específicamente, puede usarse un antígeno purificado a partir de muestras biológicas, un antígeno recombinante preparado por ingeniería genética o un péptido parcial sintetizado químicamente. En el caso del antígeno recombinante expresado usando E. coli, levaduras o semejantes, puede prepararse una proteína de fusión fusionada con otra proteína tal como SOD o TrpE, con el fin de expresarla fácilmente. Además, puede prepararse una proteína de fusión fusionada con etiqueta His con el fin de purificarla fácilmente. En particular, se expresa preferiblemente  $\beta$ 3Gal-T5 en el que se han eliminado el dominio citoplásmico y dominio transmembrana. Por ejemplo, se expresa preferiblemente como la proteína recombinante un polipéptido que consiste en los aminoácidos 27° a 310° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. El anticuerpo monoclonal y anticuerpo policlonal pueden obtenerse inmunizando con el polipéptido que consiste en los aminoácidos 27° a 310° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 como un antígeno inmunizante.

Un anticuerpo que se une a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5, que puede usarse en el método para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial de la presente invención, no está limitado, siempre que pueda unirse al menos a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5. Como el anticuerpo anterior, pueden mencionarse un anticuerpo que también se une a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa distinta de  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5, pero preferiblemente, un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5.

Un anticuerpo que se une a  $\beta$ 3Gal-T4 que puede usarse en el método para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial de la presente invención, no está limitado, siempre que pueda unirse al menos a  $\beta$ 3Gal-T4. Como el anticuerpo anterior, pueden mencionarse un anticuerpo que también se une a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa distinta de  $\beta$ 3Gal-T4, pero preferiblemente, un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta$ 3Gal-T4.

Un anticuerpo que se une a  $\beta$ 3Gal-T5, que puede usarse en el método para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial de la presente invención, no está limitado, siempre que pueda unirse al menos a  $\beta$ 3Gal-T5. Como el anticuerpo anterior, pueden mencionarse un anticuerpo que también se une a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa distinta de  $\beta$ 3Gal-T5, pero preferiblemente, un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta$ 3Gal-T5.

Como un antígeno inmunizante para obtener un anticuerpo monoclonal o policlonal frente a  $\beta$ 3Gal-T4, puede usarse una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 o un péptido que consiste en una parte de ésta.

#### [1-4] Análisis de GlcNAc6ST-2

En la presente invención, el cáncer de ovario o cáncer endometrial son de la familia N-acetilglucosaminil 6-O-sulfotransferasa y transfiere un grupo sulfato de un adenosina-3'-fosfato-5' fosfosulfato a un residuo de GlcNAc de varias glicoproteínas. En los seres humanos normales, GlcNAc6ST-2 se expresa específicamente en las células endoteliales alto y está implicado en la síntesis del ligando L-selectina.

Los presentes inventores midieron la actividad enzimática de GlcNAc6ST-2 en tejidos de cinco pacientes con cáncer de ovario y pudieron detectar la actividad enzimática de GlcNAc6ST-2 en los tejidos de todos los pacientes.

En la presente invención, el método para analizar GlcNAc6ST-2 no está limitado particularmente, siempre que pueda determinar una cantidad de GlcNAc6ST-2 cuantitativamente o semicuantitativamente o determinar la presencia o ausencia de GlcNAc6ST-2. Puede mencionarse, por ejemplo, un inmunoensayo usando anticuerpo o fragmentos de éste frente a GlcNAc6ST-2, tal como inmunoensayo enzimático, ensayo de aglutinación en látex, inmunoensayo quimioluminiscente, técnica de anticuerpo con fluorescencia, radioinmunoensayo, técnica de inmunoprecipitación, ensayo inmunohistoquímico o análisis por transferencia Western; un ensayo bioquímico tal como análisis enzimático; y un ensayo de biología molecular en el que se mide el ARNm.

Cuando se usa el inmunoensayo como el método para analizar GlcNAc6ST-2, puede usarse el anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a  $\beta$ GlcNAc6ST-2. El anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal puede producirse según métodos conocidos, excepto en que GlcNAc6ST-2 se usa como un antígeno para la inmunización.



Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal se prepara según el método de fusión celular de Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C., *Nature*, 256, 495-497, 1975). En una preparación de anticuerpo policlonal, por ejemplo, se conjuga GlcNAc6ST-2 con BSA o KLH. El GlcNAc6ST-2 conjugado, o GlcNAc6ST-2 no conjugado, se emulsiona en un adyuvante apropiado (por ejemplo adyuvante completo de Freund) y usándolo se inmunizan conejos rutinariamente intradérmicamente. Si la titulación de un anticuerpo en sangre se incrementa, se recoge la sangre y puede usarse como un antisuero o un anticuerpo purificado por los métodos conocidos.

Cuando se usa el ensayo bioquímico como el método para analizar GlcNAc6ST-2, por ejemplo, la actividad enzimática de GlcNAc6ST-2 puede medirse según el método de Seko et al. [Seko et al., *Glycobiology* (2002) 12, 379-388], mediante el cual puede analizarse una cantidad de GlcNAc6ST-2 o la presencia o ausencia de GlcNAc6ST-2.

Como un antígeno inmunizante para obtener un anticuerpo monoclonal o policlonal frente a GlcNAc6ST-2, puede usarse una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o un polipéptido que consiste en una parte de ésta. Específicamente, puede usarse un antígeno purificado a partir de una muestra biológica, un antígeno recombinante preparado por ingeniería genética o un péptido parcial sintetizado químicamente. En el caso del antígeno recombinante expresado usando *E. coli*, levaduras o semejantes, puede prepararse una proteína de fusión fusionada con otra proteína tal como SOD o TrpE, con el fin de expresarla fácilmente. Además, puede prepararse una proteína de fusión fusionada con etiqueta His con el fin de purificarla fácilmente. En particular, se expresa preferiblemente GlcNAc6ST-2 en el que se han eliminado el dominio citoplásmico y dominio transmembrana. Por ejemplo, se expresa preferiblemente como la proteína recombinante un polipéptido que consiste en los aminoácidos 28° a 386° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

Un anticuerpo que se une a GlcNAc6ST-2 que puede usarse en el método para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial de la presente invención, no está limitado, siempre que pueda unirse al menos a GlcNAc6ST-2. Como el anticuerpo anterior, pueden mencionarse un anticuerpo que también se une a GlcNAc6ST distinta de GlcNAc6ST-2, pero preferiblemente, un anticuerpo que se une específicamente a GlcNAc6ST-2.

#### [1-5] Análisis inmunológico

Cuando se usa el inmunoensayo enzimático, por ejemplo un inmunoensayo en sandwich, como el inmunoensayo, el inmunoensayo en sandwich puede llevarse a cabo según el procedimiento siguiente. El procedimiento del inmunoensayo en sandwich para GlcNAc6ST-2 se describe en una ilustración.

Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (un anticuerpo de captura o primer anticuerpo) que se une a GlcNAc6ST-2 se inmoviliza en un vehículo insoluble apropiado, tal como una placa de microtitulación o un microlecho. Después, el vehículo insoluble se recubre con un agente bloqueante apropiado, tal como albúmina de suero bovino (BSA) o gelatina, para evitar una unión no específica de una muestra al vehículo insoluble. Posteriormente, la muestra que puede contener GlcNAc6ST-2 y el primer tampón de reacción se añaden a la placa de microtitulación o el microlecho. Después, se pone en contacto el GlcNAc6ST-2 de la muestra con el anticuerpo de captura, para realizar una reacción (Primer proceso de reacción). Después, el antígeno no unido (GlcNAc6ST-2) u otra sustancia en la muestra se lava con un tampón de lavado apropiado, por ejemplo, tampón fosfato que incluye detergente. Después, se añade al conjunto anticuerpo marcado en el que un anticuerpo que se une a GlcNAc6ST-2 capturado se conjuga con una enzima tal como peroxidasa de rábano (HRP), de manera que el anticuerpo marcado se une al antígeno capturado (segundo proceso de reacción) y mediante lo cual el complejo inmune (es decir, el complejo anticuerpo de captura-GlcNAc6ST-2-anticuerpo marcado) se forma en el vehículo insoluble tal como la placa de microtitulación. Un anticuerpo marcado no unido se lava con un tampón de lavado apropiado y después se añade un sustrato colorimétrico o un sustrato luminiscente para la enzima del anticuerpo marcado. Puede desarrollarse una señal detectable por una reacción en la enzima y el sustrato. Alternativamente, puede usarse un anticuerpo marcado, que puede unirse al segundo anticuerpo, en lugar del segundo anticuerpo marcado, con el fin de detectar la señal.

Como la enzima para marcar el anticuerpo, pueden mencionarse una peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa y semejantes. Además, puede usarse un material luminiscente tal como derivados de acridinio, un material fluorescente tal como europio o material radiactivo tal como  $I^{125}$  como un material marcador distinto de la enzima. Además, una sustancia y un material para inducir la luminiscencia se seleccionan apropiadamente según el material marcador. El anticuerpo marcado usado en la presente invención contiene un anticuerpo conjugado con un hapteno, péptido de bajo peso molecular y una lectina que puede usarse para detectar la señal de la reacción del complejo antígeno-anticuerpo.

En un inmunoensayo en sandwich de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5, el sistema de inmunoensayo en sandwich puede construirse reemplazando el anticuerpo que se une a GlcNAc6ST-2 por un anticuerpo que se une a  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 en el sistema de inmunoensayo en sandwich anterior de GlcNAc6ST-2.

Si el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo puede unirse específicamente a la proteína que se va a analizar, puede usarse el otro anticuerpo, que puede unirse a una proteína distinta de la proteína que se va a analizar o puede presentar reactividad cruzada con la otra proteína, en el ELISA en sandwich. En el análisis de  $\beta$ 3Gal-T4 y

$\beta$ 3Gal-T5, por ejemplo, si el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo puede unirse específicamente a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5,  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 pueden analizarse específicamente.

Además, en el análisis de GlcNAc6ST-2, si el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo puede unirse específicamente a GlcNAc6ST-2, GlcNAc6ST-2 puede analizarse específicamente. Además, en el análisis de  $\beta$ 3Gal-T4, si el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo puede unirse específicamente a  $\beta$ 3Gal-T4,  $\beta$ 3Gal-T4 puede analizarse específicamente. Además, en el análisis de  $\beta$ 3Gal-T5, si el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo puede unirse específicamente a  $\beta$ 3Gal-T5,  $\beta$ 3Gal-T5 puede analizarse específicamente.

El primer anticuerpo y el segundo anticuerpo usados en el inmunoensayo en sandwich contienen, pero no están limitados particularmente a, un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo recombinante, fragmento de éstos o semejantes. Como el fragmento del anticuerpo, pueden mencionarse F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv o semejantes. El fragmento del anticuerpo puede obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, digiriendo el anticuerpo usando una proteasa (tal como pepsina, papaína o semejantes) y purificando los fragmentos resultantes por métodos estándar de aislamiento y purificación de polipéptidos.

En el método para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial de la presente invención, como una muestra para ensayarse, que se usa para analizar  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 o GlcNAc6ST-2 como se define en las reivindicaciones 2, 3, 10 y 11 es sangre, suero o plasma. En otras realizaciones de la invención, puede ser orina, sangre, suero, plasma, fluido espinal, saliva, célula, tejido, órgano o preparación de éstos (por ejemplo, muestra de biopsia, particularmente muestra de biopsia de ovario) o semejantes. La muestra que se va a ensayar es preferiblemente sangre, suero, plasma o muestra de biopsia de ovario, más preferiblemente sangre, suero o plasma (referida de aquí en adelante en la presente memoria como sangre o semejantes), pero siguiendo las definiciones de las reivindicaciones.  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5, GlcNAc6ST-2 no están contenidos en la sangre, suero y plasma de los seres humanos normales. Por otra parte,  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 o GlcNAc6ST-2 se liberan a la sangre de los pacientes con cáncer de ovario o pacientes con cáncer endometrial en un estadio temprano del cáncer. Por lo tanto, la sangre o semejantes es apropiada como una muestra para ensayarse para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial.

En la presente invención, el cáncer de ovario o cáncer endometrial puede detectarse determinando la presencia o ausencia de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 o GlcNAc6ST-2 o determinando una cantidad de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 o GlcNAc6ST-2 cuantitativamente o semicuantitativamente. Por ejemplo, cuando la muestra de biopsia del ovario o del útero se usa como la muestra que se va a ensayar, la expresión de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 o GlcNAc6ST-2 puede determinarse por el ensayo inmunohistoquímico usando el anticuerpo monoclonal o policlonal, mediante lo cual puede determinarse si la muestra es o no una de cáncer de ovario, o si la muestra es una de cáncer endometrial.

Además, cuando la sangre o semejantes se usa como la muestra que se va a ensayar, la sangre se recoge de un paciente que posiblemente padece cáncer de ovario o cáncer endometrial, después una cantidad de GlcNAc6ST-2 se mide usando la sangre recogida o suero o plasma de ésta. Entonces puede determinarse si el paciente tiene o no cáncer de ovario o el paciente tiene cáncer endometrial comparando la cantidad de GlcNAc6ST-2 del paciente con la de un ser humano normal. Más particularmente, si la cantidad de GlcNAc6ST-2 en el paciente es significativamente alta en comparación con la de un ser humano normal, el paciente puede ser diagnosticado con cáncer de ovario. Además, respecto a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5,  $\beta$ 3Gal-T4, o  $\beta$ 3Gal-T5, es posible diagnosticar con cáncer de ovario comparando  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5,  $\beta$ 3Gal-T4, o  $\beta$ 3Gal-T5 en los pacientes con el de un ser humano normal.

Por ejemplo, en el caso del ELISA en sandwich mencionado posteriormente, se calcula la media de una cantidad de  $\beta$ 3Gal-T4 y/o  $\beta$ 3Gal-T5 o GlcNAc6ST-2 en un ser humano normal, después se calcula la desviación estándar (SD) de ésta. En la presente invención, el punto de corte para detectar al paciente con cáncer no está limitado, siempre que cada cáncer pueda detectarse usando el punto de corte. Es posible definir una media + SD, media + 2SD o media + 3SD como punto de corte, y además, también es posible que una muestra que tiene un valor más alto que la media se diagnostique como positiva.

En la detección del cáncer de ovario o cáncer endometrial de la presente invención, lo más preferiblemente, el cáncer de ovario o cáncer endometrial se detecta específicamente. Sin embargo, si se necesita un diagnóstico temprano de cáncer de ovario por un ensayo en sangre en un examen médico, preferiblemente los pacientes con cáncer de ovario o pacientes con cáncer endometrial pueden detectarse de forma preliminar. Es decir, es preferible que el marcador tumoral pueda detectar a los pacientes con cáncer lo más posible, entre los pacientes con cáncer de ovario o pacientes con cáncer endometrial. Según el método de detección de la presente invención, como se muestra en los Ejemplos más adelante, los pacientes con cáncer de ovario (sin incluir a un paciente que presenta otro cáncer) confirmado por la operación, o los pacientes con cáncer endometrial confirmado, pueden detectarse en proporciones altas. Por lo tanto, el método de detección de la presente invención es útil como un marcador de cáncer.

[2] Kit para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial

El kit para detectar cáncer de ovario o cáncer endometrial de la presente invención puede contener el anticuerpo o fragmento de éste que se une específicamente a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 y el anticuerpo o fragmento de éste que se une específicamente a GlcNAc6ST-2.

5 Como el anticuerpo, puede estar contenido en él un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El fragmento de anticuerpo no está limitado particularmente, siempre que pueda tener capacidad de unión específica a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 o capacidad de unión específica a GlcNAc6ST-2. Por ejemplo, puede estar contenido en él el fragmento de anticuerpo Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fv.

10 El kit de detección de la presente invención puede contener el anticuerpo o fragmento de éste que se une específicamente a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 y el anticuerpo que se une específicamente a GlcNAc6ST-2 o un fragmento de éste.

El kit de detección de la presente invención contiene una forma deseada de anticuerpo que se une específicamente a  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 o un fragmento de éste, o forma deseada de anticuerpo que se une específicamente a GlcNAc6ST-2, o un fragmento de éste según el inmunoensayo usado en el kit de detección.

15 Por ejemplo, en un caso de un inmunoensayo que usa el anticuerpo marcado, tal como un inmunoensayo enzimático, inmunoensayo quimioluminiscente, técnica de anticuerpo con fluorescencia o radioinmunoensayo, el anticuerpo marcado o fragmento de anticuerpo conjugado con un material de marcaje puede estar contenido en él. Específicamente, el material de marcaje puede incluir peroxidasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -D-galactosidasa o glucosa oxidasa como una enzima; isotiocianato de fluoresceína, quelato de metal de tierras raras como un material  
20 fluorescente; <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, o <sup>125</sup>I como un isótopo radiactivo; o biotina, avidina o una sustancia quimioluminiscente. Además, en el caso de una enzima o una sustancia quimioluminiscente, como no pueden desarrollar una señal mensurable por sí mismas, está contenida preferiblemente en él una sustancia correspondiente a cada enzima o sustancia quimioluminiscente.

### Ejemplos

25 La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente por, pero de ninguna forma está limitada a, los Ejemplos y Ejemplos Comparativos siguientes.

Ejemplo 1: preparación de anticuerpo anti  $\beta$ 3Gal-T5

(A) Preparación de la forma soluble de  $\beta$ 3Gal-T5 (Preparación de antígeno para inmunización)

(A-1) Construcción de un vector de expresión de  $\beta$ 3Gal-T5

30 Se amplificó por PCR un fragmento de ADNc que codifica un péptido que carece del dominio citoplásmico y dominio transmembrana. La PCR se llevó a cabo usando una biblioteca de ADNc de colon humano y el cebador directo para  $\beta$ 3Gal-T5 y el cebador inverso para  $\beta$ 3Gal-T5 siguientes. El fragmento de ADNc obtenido codifica un péptido que consiste en los aminoácidos 27<sup>o</sup> a 310<sup>o</sup> en la secuencia de aminoácidos de  $\beta$ 3Gal-T5.

Cebador directo para  $\beta$ 3Gal-T5: 5'-ttgtcgcacAGTCTAAATCCTTTCAAAG-3' (SEQ ID NO: 1)

35 Cebador inverso para  $\beta$ 3Gal-T5: 5'-ttaaagcttCAGACAGGCGGACAATC-3' (SEQ ID NO: 2)

40 En las secuencias anteriores, las secuencias en letras minúsculas contienen sitios de restricción apropiados para fusionarse con un vector de expresión. Los ADNc obtenidos se insertaron en un sitio de clonación del vector pQE9 (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) y se transformaron células de *E. coli* M15 con el vector resultante. Las secuencias de nucleótidos de los plásmidos obtenidos se determinaron con un Analizador Genético Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

(A-2) Expresión y purificación de  $\beta$ 3Gal-T5

45 La preparación de  $\beta$ 3Gal-T5 recombinante fue como sigue. Los cultivos de toda la noche de células *E. coli* M15 transformadas se diluyeron 1/100, se añadieron a 15L de caldo LB que contenía 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y 25  $\mu$ g/mL de kanamicina y se crecieron a 30<sup>o</sup>C durante 3 hr con agitación vigorosa. Se añadió al cultivo isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (de aquí en adelante en la presente memoria referido como IPTG) que tenía una concentración final de 0,1 mM y la expresión de  $\beta$ 3Gal-T5 se indujo a 18<sup>o</sup>C durante 16 hr. Las células de *E. coli* se recogieron con centrifugación y se sonicaron en Tampón A [200 mL de 6M guanidina-HCl, 20 mM tampón fosfato de potasio (pH 8,0), 10 mM 2-mercaptoetanol y 20 mM imidazol]. El homogenado obtenido se dejó estar a 25<sup>o</sup>C durante 16 hr. Después de centrifugar a 5.000 g durante 20 min, el sobrenadante se aplicó a 3 mL de agarosa Ni-NTA (QIAGEN GmbH) y se dejó estar durante 30 min con mezclado ocasional. La resina se empaquetó en una columna de plástico y se lavó con 60 mL de Tampón A. Posteriormente, la proteína recombinante se eluyó con el Tampón A que  
50 contenía 0,25 M imidazol. El eluato se dializó frente a 8 M urea-PBS y se concentró con un Microcon YM-10

(Millipore Corp., Bedford, MA). Finalmente, se obtuvieron 2,5 mg de la proteína recombinante. La proteína obtenida se refirió como  $\beta$ 3Gal-T5 desnaturalizado (*E. coli*).

(B) Preparación de la forma soluble de  $\beta$ 3Gal-T5 no desnaturalizado (Preparación de antígeno para cribado)

5 Usando la mismas *E. coli* M15 transformadas preparadas como en el Ejemplo 1, se preparó  $\beta$ 3Gal-T5 no desnaturalizado. Después de inducir con 0,1 mM IPTG en 300 mL de cultivo de células de *E. coli*, las células se recogieron y se sonicaron en 25 mL de 20 mM tampón fosfato de potasio (pH 8,0) (que contenía 0,3 M NaCl y 10 mM imidazol). Al homogenado obtenido, se añadieron 2,5 mL de 5% Tritón X-100 (v/v) y la mezcla se dejó estar en hielo durante 30 min. Después de centrifugar, se añadieron 0,3 mL de agarosa Ni-NTA al sobrenadante y la mezcla se dejó estar durante 30 min con mezclado ocasional. La resina se empaquetó en una columna de plástico y se lavó con 5 mL de Tampón B (20 mM tampón fosfato de potasio (pH 8,0), 0,3 M NaCl y 20 mM imidazol) que contenía 0,5% Tritón X-100 y se lavó adicionalmente con otros 5 mL de Tampón B. La proteína recombinante se eluyó con Tampón B que contenía 0,25 M imidazol. El eluato se lavó con PBS usando un Microcon YM-10 (Millipore Corp., Bedford, MA) y se concentró. De los 0,36 mg de proteínas obtenidos finalmente, se obtuvo un rendimiento de  $\beta$ 3Gal-T5 de aproximadamente 10%, a partir de la estimación del análisis por SDS-PAGE. Debe indicarse que esta fracción contenía actividad  $\beta$ 3Gal-T5 sustancial. La proteína obtenida se refirió como  $\beta$ 3Gal-T5 desnaturalizado (*E. coli*).

(C) Preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales

Los anticuerpos monoclonales y policlonales frente a  $\beta$ 3Gal-T5 se prepararon comercialmente por Medical and Biological Laboratories Co., Ltd. (Nagoya, Japón). Los anticuerpos monoclonales se prepararon como sigue. El  $\beta$ 3Gal-T5 desnaturalizado (*E. coli*) anterior se inyectó tres veces en las almohadillas de las patas de cuatro ratones en intervalos de tres días. Según el método convencional, las células del bazo de los ratones se fusionaron con células de mieloma de ratón y el cribado de los hibridomas para la producción de anticuerpos se llevó a cabo usando  $\beta$ 3Gal-T5 no desnaturalizado (*E. coli*) como el antígeno. Se clonó un hibridoma para producir anticuerpo monoclonal que se une al  $\beta$ 3Gal-T5 no desnaturalizado. Según el método convencional, el hibridoma se inoculó intraperitonealmente a cinco ratones, para obtener 25 mL de ascites. El fluido ascítico se purificó con filtración en gel en Sefacril S-300 (1,4 x 68 cm; equilibrada y eluida con TBS: GE Healthcare) para obtener 21 mg de anticuerpo monoclonal frente a  $\beta$ 3Gal-T5.

En el caso del anticuerpo policlonal, el  $\beta$ 3Gal-T5 (*E. coli*) no desnaturalizado se inyectó seis veces en un conejo en intervalos de una semana para obtener antisuero policlonal frente a  $\beta$ 3Gal-T5.

(D) Identificación de especificidades en los anticuerpos monoclonales y policlonales

30 Para identificar las especificidades en los anticuerpos monoclonales y policlonales resultantes respecto a  $\beta$ 3Gal-T5, se examinó la reactividad respecto a cada uno de  $\beta$ 3GalT-1,  $\beta$ 3GalT-2,  $\beta$ 3Gal-T4,  $\beta$ 3GalT-6 y  $\beta$ 3GalNac-T1, respectivamente. En primer lugar, se preparó la proteína recombinante para uno de  $\beta$ 3GalT-1,  $\beta$ 3GalT-2,  $\beta$ 3Gal-T4,  $\beta$ 3GalT-6 y  $\beta$ 3GalNac-T1. La etapa (A-1) se repitió para construir un vector de expresión, excepto en que se usaron los cebadores siguientes como un cebador para  $\beta$ 3GalT-1. Por otra parte, para  $\beta$ 3GalT-2,  $\beta$ 3Gal-T4,  $\beta$ 3GalT-6 y  $\beta$ 3GalNac-T1, la etapa (A-1) se repitió para construir un vector de expresión, excepto en que se usó una biblioteca de ADNc de cerebro humano Super Script como biblioteca de ADNc en lugar de una biblioteca de ADNc de colon humano y se usaron los cebadores siguientes como cebador.

Cebador directo para  $\beta$ 3Gal-T1: 5'-tttggatccAGTATAACTCGCCCTACTT-3' (SEQ ID NO: 3)

Cebador inverso para  $\beta$ 3GalT-1: 5'-ttaaagcttCCTAACATCTGAGATG-3' (SEQ ID NO: 4)

40 Cebador directo para  $\beta$ 3Gal-T2: 5'-tttggatccCTGCCAGGCAGAGCTGGA-3' (SEQ ID NO: 5)

Cebador inverso para  $\beta$ 3Gal-T2: 5'-ttaaagcttAATGTAGTTTACGGTGG-3' (SEQ ID NO: 6)

Cebador directo para  $\beta$ 3GalNac-T1: 5'-tttggatccAGCCTTCCCCACTACAATG-3' (SEQ ID NO: 7)

Cebador inverso para  $\beta$ 3GalNac-T1: 5'-ttaaagcttAATAATGGCATGTGGTGT-3' (SEQ ID NO: 8)

Cebador directo para  $\beta$ 3Gal-T4: 5'-tttggatccTTGGGGGAGGAGCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 9)

45 Cebador inverso para  $\beta$ 3Gal-T4: 5'-tttgcgacTCAGCTCTGAAGCCAGGC-3' (SEQ ID NO: 10)

Cebador directo para  $\beta$ 3Gal-T6: 5'-tttggatccGACCCAGGGCGATGTCG-3' (SEQ ID NO: 11)

Cebador inverso para  $\beta$ 3Gal-T6: 5'-ttaaagcttGGCTCAGGGGATGCCCT-3' (SEQ ID NO: 12)

Cada proteína recombinante se preparó realizando la etapa (A-2) con pocas modificaciones. Concretamente, una centésima parte de cada cultivo de toda la noche de las células M15 transformadas se añadió a 15 mL de caldo LB

que contenía los antibióticos y se cultivó a 30°C durante 3 hr. Se añadió a los cultivos IPTG que tenía una concentración final de 0,1 mM y la expresión se indujo a 18°C durante 16 hr. Las células de *E. coli* se recogieron y se sonicaron en 10 mL de Tampón A. Los homogenados se dejaron estar a 25°C durante 16 hr. Después de centrifugar, los sobrenadantes se añadieron a 0,5 mL de agarosa Ni-NTA (QIAGEN GmbH) y se dejaron estar durante 30 min. Las resinas se lavaron con 10 mL de Tampón A y las proteínas recombinantes se eluyeron con Tampón A que contenía 0,25 M imidazol. Como resultado, los rendimientos para  $\beta$ 3GalT-1,  $\beta$ 3GalT-2,  $\beta$ 3Gal-T4,  $\beta$ 3GalT-6 y  $\beta$ 3GalNAc-T1 fueron 0,03 mg, 0,03 mg, 0,06 mg, 0,70 mg y 1,8 mg, respectivamente.

Entonces se identificaron las reactividades usando análisis por transferencia Western. Se cargaron 300 ng de cada proteína obtenida en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear, la membrana se incubó con anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ 3Gal-T5 (1  $\mu$ g/mL). La membrana se lavó y se incubó adicionalmente con anticuerpo de conejo anti IgG/IgM de ratón marcado con HRP (0,3  $\mu$ g/mL: Jackson ImmunoResearch). La detección de la quimioluminiscencia se realizó usando reactivo de detección de transferencia Western ECL (GE Healthcare).

Para las reactividades en antisueros policlonales, se cargaron 50 ng de cada proteína y se incubó una membrana de nitrocelulosa con el antisero policlonal diluido por un factor de 1.000. Después de lavar, la membrana se incubó con un anticuerpo anti Ig de conejo marcado con HRP. La detección de la quimioluminiscencia se realizó como en el caso del anticuerpo monoclonal.

Como se muestra en la Fig. 1, el anticuerpo monoclonal mostró una reactividad intensa frente a  $\beta$ 3Gal-T5. Además, también mostró reactividades frente a  $\beta$ 3GalT-1 y  $\beta$ 3Gal-T4. Por otra parte, el anticuerpo policlonal mostró una reactividad intensa para  $\beta$ 3Gal-T5, así como reactividad para  $\beta$ 3Gal-T4.

Ejemplo 2: expresión de los ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 en células de cáncer de ovario.

La expresión de los ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 en células de cáncer de ovario se investigó por RT-PCR usando cinco tipos diferentes de células de cáncer de ovario. Las células ES-2 (carcinoma de células claras de ovario) se adquirieron en ATCC y las células MCAS (cistoadenocarcinoma mucinoso de ovario), células RMG-I (adenocarcinoma mesonefroide de ovario), células RMG-II (adenocarcinoma mesonefroide de ovario) y células RMUG-L (cistoadenocarcinoma mucinoso de ovario) se adquirieron en Human Science Research Resources Bank (Osaka, Japón).

Las células recogidas se lisaron usando ISOGEN (Nippon Gene, Japón) para aislar ARN totales. Los ADNc se sintetizaron a partir de los ARN obtenidos usando cebadores oligo(dT) y SuperScript III (Invitrogen). Las cantidades de ADNc se normalizaron por las de  $\beta$ -actina (Seko *et al.*, 2002).

Los cebadores siguientes se añadieron a los ADNc y la incubación se realizó a 95°C durante 2 min. Posteriormente, la expresión de  $\beta$ 3Gal-T4 y  $\beta$ 3Gal-T5 se examinó por PCR. La PCR se realizó usando ADN polimerasa GoTaq (Promega) en un volumen de 20  $\mu$ L durante 29 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 62°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos.

Cebador directo para PCR de  $\beta$ 3Gal-T4: 5'-ATTCTTGCTGGGAGAGCCGAAC-3' (SEQ ID NO: 13)

Cebador inverso para PCR de  $\beta$ 3Gal-T4: 5'-AAGTACAGAAGAGGCACTTCCTC-3' (SEQ ID NO: 14)

Cebador directo para PCR de  $\beta$ 3Gal-T5: 5'-GAAACGAAAGAGGTGGACCAG-3' (SEQ ID NO: 15)

Cebador inverso para PCR de  $\beta$ 3Gal-T5: 5'-GAGCTCCTCCAATCTGATGTTCA-3' (SEQ ID NO: 16)

Como se muestra en la Fig. 4, el ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 se expresó en cada una de las células ES-2, células MCAS, células RMG-I y células RMUG-L. Por otra parte, el ARNm de  $\beta$ 3Gal-T5 se expresó en cada una de las células ES-2, células RMG-I, células RMG-II y células RMUG-L.

El ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 y el ARNm de  $\beta$ 3Gal-T5 se expresaron en cuatro cepas de células de cáncer de ovario entre las cinco cepas de células de cáncer de ovario. Además, en las cinco cepas de células de cáncer de ovario, se expresó uno de ARNm de  $\beta$ 3Gal-T4 o ARNm de  $\beta$ 3Gal-T5.

Ejemplo 3: preparación de anticuerpo de GlcNAc6ST-2

(A) Preparación de la forma soluble de GlcNAc6ST-2 (Preparación de antígeno para inmunización)

(A-1) Construcción de un vector de expresión de GlcNAc6ST-2

Se amplificó por PCR un fragmento de ADNc que codifica un péptido que carece de los dominios citoplásmico y transmembrana. La PCR se realizó usando un ADNc de longitud completa preparado previamente (Glycobiology, 2002, 12, p. 379-388) y el cebador directo para GlcNAc6ST2 y cebador inverso para GlcNAc6ST2 siguientes. El

fragmento de ADNc obtenido codifica un péptido que consiste en los aminoácidos 28° a 386° en la secuencia de aminoácidos de GlcNAc6ST-2.

Cebador directo para GlcNAc6ST2: 5'-tttgtcgacAGCCACAACATCAGCT-3' (SEQ ID NO: 17)

Cebador inverso para GlcNAc6ST2: 5'-ttaaagcttAGTGGATTTGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 18)

- 5 En las secuencias anteriores, las secuencias en letras minúsculas contienen sitios de restricción apropiados para fusionarse con un vector de expresión. Los ADNc obtenidos se insertaron en un sitio de clonación del vector pQE9 (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) y se transformaron células de *E. coli* M15 con el vector resultante. Las secuencias de nucleótidos de los plásmidos obtenidos se determinaron con un Analizador Genético Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

10 (A-2) Expresión y purificación de GlcNAc6ST-2

La etapa (A-2) en el Ejemplo 1 se repitió para obtener 3,5 mg de GlcNAc6ST-2, excepto en que el cultivo para la inducción de la expresión por IPTG se realizó en 1,25L usando un vector de expresión de GlcNAc6ST-2 en lugar de un vector de expresión de  $\beta$ 3Gal-T5. Las proteínas obtenidas se refirieron como GlcNAc6ST-2 de *E. coli*.

(B) Preparación de la forma soluble de GlcNAc6ST-2 en *Pichia pastoris* (Preparación de antígeno para cribado)

- 15 GlcNAc6ST-2 se preparó usando levaduras para cribar anticuerpos monoclonales. Se amplificó por PCR un fragmento de ADNc que codifica un péptido que carece de los dominios citoplásmico y transmembrana. La PCR se realizó usando un ADNc de longitud completa preparado previamente (Glycobiology, 12, p. 379-388, 2002) y los cebadores directo para GlcNAc6ST2-pichia y cebador inverso para GlcNAc6ST2-pichia siguientes.

Cebador directo para GlcNAc6ST2-pichia: 5'-tttctaggTACAGCCACAACATCAG-3' (SEQ ID NO: 19)

- 20 Cebador inverso para GlcNAc6ST2-pichia: 5'-tttgcggccgcTTAGTGGATTTGCTCAGG-3' (SEQ ID NO: 20)

El ADNc obtenido se insertó en los sitios de clonación apropiados para el vector pPIC9-His y la secuencia de nucleótidos se determinó con un Analizador Genético Prism 310. La producción y purificación del GlcNAc6ST-2 recombinante se realizó según el método conocido (Glycobiology 15 p. 943-951, 2005). A partir de 500 mL de un cultivo en medio de complejo de metanol tamponado, se obtuvieron 300  $\mu$ g de la proteína recombinante. Debe indicarse que esta fracción contenía actividad GlcNAc6ST-2 sustancial. La proteína obtenida se refirió como GlcNAc6ST-2 de levadura.

- 25

(C) Preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales

La Etapa (C) en el Ejemplo 1 se repitió para obtener una cepa de hibridoma para la producción de anticuerpo monoclonal y para obtener antisuero policlonal, excepto en que se usaron células GlcNAc6ST-2 de *E. coli* como inmunógeno y que se usó GlcNAc6ST-2 de levadura como antígeno de cribado para el anticuerpo monoclonal. El hibridoma se inoculó intraperitonealmente en cinco ratones para obtener 13 mL de ascites. El fluido ascítico obtenido se purificó por cromatografía de afinidad con proteína A-Sefarosa (0,9 x 7,9 cm; equilibrada con PBS: GE Healthcare) para obtener 12,6 mg de anticuerpo.

- 30

(D) Identificación de especificidades en los anticuerpos monoclonales y policlonales

- 35 Para identificar las especificidades en los anticuerpos monoclonales y policlonales resultantes respecto a GlcNAc6ST-2, se examinó la reactividad respecto a cada uno de GlcNAc6ST1, GlcNAc6ST3, GlcNAc6ST4, GlcNAc6ST5, Gal6ST y Ch6ST1, respectivamente. En primer lugar, se preparó la proteína recombinante para cada uno de GlcNAc6ST1, GlcNAc6ST3, GlcNAc6ST4, GlcNAc6ST5, Gal6ST y Ch6ST1. Después, la etapa (A-1) en el Ejemplo 1 se repitió para construir un vector de expresión, excepto en que se usaron los cebadores siguientes.

- 40 Cebador directo para GlcNAc6ST1: 5'-tttgtcgacTACAAGTGGCACAAG-3' (SEQ ID NO: 21)

Cebador inverso para GlcNAc6ST1: 5'-tttgtcgacCCCTTTTAGAGACGG-3' (SEQ ID NO: 22)

Cebador directo para GlcNAc6ST3: 5'-tttgtcgacTCCCGGCCAGGGCCCTC-3' (SEQ ID NO: 23)

Cebador inverso para GlcNAc6ST3: 5'-ttaaagcttCAGTCAGGCGATGCCCA-3' (SEQ ID NO: 24)

Cebador directo para GlcNAc6ST4: 5'-tttgtcgacGGCGGCCGCGACGG-3' (SEQ ID NO: 25)

- 45 Cebador inverso para GlcNAc6ST4: 5'-ttaaagcttGGGAGGCTACGTGGCGC-3' (SEQ ID NO: 26)

Cebador directo para GlcNAc6ST5: 5'-tttgtcgacTCCCGGCCAGGGCCCTC-3' (SEQ ID NO: 27)

Cebador inverso para GlcNAc6ST5: 5'-ttaaagcttGCTACAACACTGTGGCCTC-3' (SEQ ID NO: 28)

Cebador directo para Gal6ST: 5'-ttgtcgacACCTTCACCGCCAAGTC-3' (SEQ ID NO: 29)

Cebador inverso para Gal6ST: 5'-ttaaagcttCACGAGAAGGGGCGGAA-3' (SEQ ID NO: 30)

Cebador directo para Ch6ST1: 5'-ttgtcgacATATCAAGGGTCTCAGA-3' (SEQ ID NO: 31)

Cebador inverso para Ch6ST1: 5'-ttaaagcttCTACGTGACCCAGAAGGT-3' (SEQ ID NO: 32)

- 5 La Etapa (D) en el Ejemplo 1 para la expresión y purificación de  $\beta$ 3GalT-1 y siguientes se repitió para obtener cada proteína recombinante, excepto en que se usaron 15 mL de cultivo para la inducción de la expresión por IPTG. Los rendimientos para GlcNAcc6ST1, GlcNAcc6ST3, GlcNAcc6ST4, GlcNAcc6ST5, Gal6ST y Ch6ST1 fueron 0,20 mg, 1,2 mg, 0,26 mg, 0,83 mg, 0,26 mg y 0,13 mg, respectivamente.

Tabla 1

		Número de muestras	GN6ST2	$\beta$ 3Gal T5	GN6St2 + $\beta$ 3Gal T5	CA602/125	CA564
Estadios de la enfermedad	Estadios de la enfermedad I a II	31	74,2	87,1	96,8	73,1	70,8
	Estadios de la enfermedad III a IV	29	58,6	93,1	93,1	96,3	95,5
Tipos Histológicos	adenocarcinoma seroso	18	44,4	88,9	88,9	93,8	92,9
	adenocarcinoma mucinoso	10	70,0	100	100	71,4	85,7
	adenocarcinoma endometrioide	13	76,9	84,6	100	77,8	83,3
	adenocarcinoma de células claras	16	75,0	87,5	93,8	86,7	69,2
	Seroso+ Endometrioide	31	58,1	87,1	93,5	88,0	90,0
	Mucinoso + Células claras	26	73,1	92,3	96,2	81,8	75,0

- 10 \* Las proporciones positivas se proporcionan en %.

Entonces se realizó el método de transferencia western. Se repitió la etapa (D) de la transferencia western en el Ejemplo 1, excepto en que se usaron 200 ng de cada uno de los antígenos para la electroforesis.

Como se muestra en la Fig. 2, el anticuerpo monoclonal mostró una reactividad intensa sólo frente a GlcNAc6ST-2. Por otra parte, el antisuero policlonal mostró reactividad frente a todos los antígenos.

- 15 Ejemplo 4: construcción de ELISA en sandwich de  $\beta$ 3Gal-T5 y GlcNAc6ST-2

La construcción de un sistema de inmunoensayo para  $\beta$ 3Gal-T5 y GlcNAc6ST-2 se realizó por un método ELISA en sandwich usando el anticuerpo monoclonal y el antisuero policlonal obtenidos mediante la inmunización con  $\beta$ 3Gal-T5 y usando el anticuerpo monoclonal y el antisuero policlonal obtenidos mediante la inmunización con GlcNAc6ST-2.

- 20 (A) Sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5

- 25 Se añadieron 50  $\mu$ L de anticuerpo monoclonal de  $\beta$ 3Gal-T5, que se había diluido previamente hasta una concentración de 1  $\mu$ g/mL con PBS, a placas de 96 pocillos negras de alta unión (Corning Inc., Corning, NY) y se inmovilizó a 4°C durante 16 hr. La superficie de cada pocillo se bloqueó con PBS que contenía 1% BSA a 25°C durante 1 hr. El  $\beta$ 3Gal-T5 no desnaturalizado (*E. coli*) como material de referencia se diluyó hasta una concentración de 250 ng/mL, 125 ng/mL, 62,5 ng/mL, 16 ng/mL y 4,0 ng/mL con un diluyente en el que se había añadido 1% BSA a PBS-0,1% Tween-20 (PBS-T). Se añadieron 50  $\mu$ L del  $\beta$ 3Gal-T5 no desnaturalizado (*E. coli*) a los pocillos y se incubó a 25°C durante 2 hr. Después de lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50  $\mu$ L de antisuero policlonal de

β3Gal-T5 diluido por un factor de 1.000 y se incubó a 25°C durante 1,5 hr. Después de lavar con PBS-T tres veces, se añadió anticuerpo de burro anti-Ig de conejo marcado con HRP (0,3 μg/mL: GE Healthcare) diluido con PBS-T y se incubó a 25°C durante 1 hr. Los pocillos se lavaron con PBS-T cuatro veces y se añadieron 100 μL de Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (PIERCE, Rockford, IL) y la cuantificación quimioluminiscente se realizó usando una Placa CHAMELEON V (HIDEX Oy, Turku, Finlandia)

(B) Sistema de detección de GlcNAc6ST-2

La Etapa (A) se repitió para construir un ELISA en sandwich de GlcNAc6ST-2, excepto en que el anticuerpo monoclonal que tiene una concentración de 3 μL/mL respecto a GlcNAc6ST-2 se inmovilizó, el antisuero policlonal respecto a GlcNAc6ST-2 se diluyó por un factor de 3.000 y se usó GlcNAc6ST-2 (*E. coli*) como material de referencia.

Como se muestra en la Fig. 3, se obtuvo una buena curva estándar lineal para cada uno del sistema de detección de β3Gal-T5 y el sistema de detección de GlcNAc6ST-2.

(C) Mejora en una curva estándar para el sistema de detección de β3Gal-T5

La Etapa (A) se repitió para obtener la curva estándar para β3Gal-T5, excepto en que se diluyó β3Gal-T5 no desnaturalizado (*E. coli*) usando PBS-0,1% Tween-20 (PBS-T) en el que se añadió suero humano normal al 10% en lugar de usar PBS-0,1% Tween-20 (PBS-T). Los resultados se muestran en la Fig. 5A. A bajas concentraciones de β3Gal-T5, se mejoró la linealidad de la curva estándar. Además del suero humano normal, el uso de sueros de bovino, caballo, oveja, cabra o semejantes mostró los mismos efectos que los obtenidos en el suero humano normal.

(D) Mejora en una curva estándar para el sistema de detección de GlcNAc6ST-2

La Etapa (B) se repitió para obtener la curva estándar para GlcNAc6ST-2, excepto en que se diluyó GlcNAc6ST-2 no desnaturalizado (*E. coli*) usando PBS-0,1% Tween-20 (PBS-T) en el que se añadió suero humano normal al 10% en lugar de usar PBS-0,1% Tween-20 (PBS-T). Los resultados se muestran en la Fig. 5A. A bajas concentraciones de GlcNAc6ST-2, se mejoró la linealidad de la curva estándar.

Ejemplo 5: Medida en los sueros de pacientes con cáncer de ovario usando el sistema de detección de β3Gal-T5

Los sueros de 60 casos de pacientes con cáncer de ovario y los sueros de 8 muestras de mujeres adultas sanas se midieron usando el sistema de detección de β3Gal-T5. Los sueros de los pacientes con cáncer de ovario que se van a usar en la medida se obtuvieron de pacientes con cáncer de ovario de los estadios I a IV que se confirmaron por operación abdominal. En los 57 casos, fue posible determinar los tipos histológicos de cáncer de ovario usando examen histológico. En estos pacientes con cáncer de ovario no se confirmó ningún desarrollo distinto del cáncer de ovario.

Se repitió la Etapa (A) en el Ejemplo 4, excepto en que se usaron los sueros de los pacientes y de las personas sanas diluidos con PBS-T por un factor de 10 en lugar de β3Gal-T5 no desnaturalizado (*E. coli*). La cantidad de β3Gal-T5 en los sueros se determinó por la curva estándar (A) en la Fig. 3. El valor de una media + 2SD en mujeres adultas sanas se definió como un punto de corte y se determinó si el suero de cada paciente era positivo o negativo.

En los ejemplos, el anticuerpo monoclonal y el antisuero policlonal se obtuvieron inmunizando con β3Gal-T5 en (D) del Ejemplo 1. Se examinaron las reactividades del anticuerpo monoclonal y el antisuero policlonal respecto a otras β1,3-galactosiltransferasas. Como resultado, es posible detectar tanto la enzima β3Gal-T4 como la enzima β3Gal-T5 por ELISA usando el anticuerpo monoclonal y el antisuero policlonal.

Ejemplo 6: medida en los sueros de pacientes con cáncer de ovario usando el sistema de detección de GlcNAc6ST-2

Los sueros de 60 casos de pacientes con cáncer de ovario y los sueros de 8 muestras de mujeres adultas sanas como se ha ensayado en el Ejemplo 5, se midieron usando el sistema de detección de GlcNAc6ST-2.

Se repitió la Etapa (B) del Ejemplo 4, excepto en que se usaron los sueros de los pacientes diluidos con PBS-T por un factor de 10 en lugar de GlcNAc6ST-2 (*E. coli*). La cantidad de GlcNAc6ST-2 en los sueros se determinó por la curva estándar (B) en la Fig. 3. El valor de una media + 2SD en mujeres adultas sanas se definió como un punto de corte y se determinó si el suero de cada paciente era positivo o negativo.

Ejemplo comparativo 1

En los sueros de 60 casos de los pacientes con cáncer de ovario y en los sueros de 8 muestras de las mujeres adultas sanas según se ha ensayado en el Ejemplo 5, se midió CA125 que se conoce como un marcador convencional para cáncer de ovario.



La medida de CA125 se realizó usando un kit de reactivo ECLusys CA125II (Roche Diagnostics), según el protocolo adjunto.

#### Ejemplo comparativo 2

- 5 En los sueros de 60 casos de los pacientes con cáncer de ovario y en los sueros de 8 muestras de las mujeres adultas sanas según se ha ensayado en el Ejemplo 5, se midió CA546 que se conoce como un marcador convencional para cáncer de ovario.

La medida de CA546 se realizó usando un kit de reactivo PLATE Kainos CA546 (Kainos Laboratories, Inc.), según el protocolo adjunto.

#### Ejemplo analítico 1

- 10 Los 60 casos ensayados de cáncer de ovario se clasificaron en estadios de la enfermedad o tipos histológicos de cáncer de ovario y se analizaron las proporciones positivas obtenidas de los Ejemplos 4 y 5 y Ejemplo Comparativo 1 y 2. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

- 15 En el cáncer de ovario temprano de estadios I y II, la proporción positiva detectada usando el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5 fue 87,1% y la proporción positiva detectada usando el sistema de detección de GlcNAc6ST-2 fue 74,2%. Fue posible detectar cáncer de ovario en una proporción alta en comparación con las proporciones positivas detectadas usando CA125 y CA546. Además, en la medida que usa el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5 y/o el sistema de detección de GlcNAc6ST-2, 96,8% de las muestras fueron positivas. Así, fue posible detectar a los pacientes con cáncer de ovario temprano en una proporción alta, combinando los métodos inmunológicos de  $\beta$ 3Gal-T5 y GlcNAc6ST-2.

- 20 Además, si los cánceres de ovario se clasifican en cada uno de los tipos histológicos, la proporción positiva para adenocarcinoma mucinoso fue 100%, la proporción positiva para adenocarcinoma endometriode fue 84,6% y la proporción positiva para adenocarcinoma de células claras fue 87,5%, según el método inmunológico usando el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5. Estas proporciones positivas fueron mayores que las obtenidas por CA125 o CA546. En particular, el método inmunológico usando el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5 fue capaz de detectar el adenocarcinoma mucinoso y el adenocarcinoma de células claras en una proporción alta, a pesar de que estos cánceres son habitualmente intratables y resistentes a quimioterapias.

- 25 Además de esto, la proporción positiva para cáncer de ovario endometriode fue 100% y la proporción positiva para cáncer de ovario de células claras fue 93,8% combinando los métodos inmunológicos del sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5 y el sistema de detección de GlcNAc6ST-2. Así, fue capaz de detectar estos tipos de cáncer de ovario en una proporción alta.

Ejemplo 7: medida en sueros de pacientes con cáncer endometrial usando el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5

- 30 Los sueros de 30 casos de pacientes con cáncer endometrial y los sueros de 40 muestras de mujeres adultas sanas se midieron usando el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5. Entre los pacientes con cáncer endometrial, 26 pacientes se diagnosticaron quirúrgicamente como estadio I a estadio III. En un caso entre los 30 casos, se confirmó una presencia de cáncer cervical. En los 29 casos restantes, no se confirmó ningún desarrollo distinto del cáncer endometrial.

- 35 Se repitió la Etapa (C) del Ejemplo 4, excepto en que se añadieron los sueros de los pacientes con cáncer endometrial y seres humanos sanos diluidos con PBS-T por un factor de 10, en lugar de  $\beta$ 3Gal-T5 desnaturizado (*E. coli*). Los valores de  $\beta$ 3Gal-T5 en los sueros se determinaron por la curva estándar (A) en la Fig. 5. Los resultados obtenidos de los 30 casos de los pacientes con cáncer endometrial se muestran en la Tabla 2. El valor de una media + 2SD en mujeres adultas sanas se definió como un punto de corte y se determinó si el suero del paciente era positivo o negativo. En este caso, el valor medio para las mujeres sanas fue 2,1 ng/mL y el punto de corte fue 5,4 ng/mL. Dieciocho casos (60%) entre los 30 casos fueron positivos.

Ejemplo 8: medida en sueros de pacientes con cáncer endometrial usando el sistema de detección de GlcNAc6ST-2

- 40 Los sueros de 30 casos de pacientes con cáncer endometrial y los sueros de 40 muestras de las mujeres adultas sanas ensayados como en el Ejemplo 7, se midieron usando el sistema de detección de GlcNAc6ST-2.

- 45 Se repitió la Etapa (D) del Ejemplo 4, excepto en que se añadieron los sueros de los pacientes diluidos con PBS-T por un factor de 10, en lugar de GlcNAc6ST-2 (*E. coli*). Los valores de GlcNAc6ST-2 en los sueros se determinaron por la curva estándar (B) en la Fig. 5. Los resultados obtenidos de los 30 casos de los pacientes con cáncer endometrial se muestran en la Tabla 2. El valor de una media + 2SD en mujeres adultas sanas se definió como un punto de corte y se determinó si el suero del paciente era positivo o negativo. En este caso, el valor medio para las mujeres sanas fue 2,0 ng/mL y el punto de corte fue 7,8 ng/mL. Diez casos (33%) entre los 30 casos fueron positivos.

Ejemplo comparativo 3

En los sueros de 9 casos de los pacientes con cáncer endometrial entre las 30 muestras ensayadas como en el Ejemplo 7, se midió CA125 que es conocido como un marcador convencional para cáncer endometrial.

- 5 La medida de CA125 se realizó usando un kit de reactivo ECLusys CA125II (Roche Diagnostics) según el protocolo adjunto. Un valor de medida de 35 U/mL o más se determinó como positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 2. 5 casos (38,5%) de 13 casos fueron positivos.

Ejemplo comparativo 4

En los sueros de 19 casos de los pacientes con cáncer endometrial entre los 30 casos ensayados como en el Ejemplo 7, se midió CA602 que es conocido como un marcador convencional para cáncer endometrial.

- 10 La medida de CA602 se realizó usando un kit de reactivo PLATE Kainos CA602 (Kainos Laboratories, Inc.), según el protocolo adjunto. Un valor de medida de 63 U/mL o más se determinó como positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 2. 5 casos (26,3%) de 19 casos fueron positivos.

Ejemplo comparativo 5

- 15 En los sueros de 23 casos de los pacientes con cáncer endometrial entre los 30 casos ensayados como en el Ejemplo 7, se midió CA19-9 que es conocido como un marcador para cáncer de páncreas y un marcador para cáncer endometrial.

La medida de CA19-9 se realizó usando un kit de reactivo ECLusys CA19-9 II (Roche Diagnostics), según el protocolo adjunto. Un valor de medida de 37 U/mL o más se determinó como positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 2. 4 casos (16,7%) de 24 casos fueron positivos.

- 20 Tabla 2

Número de muestra	Estadio de la enfermedad	grado <sup>3)</sup>	CA602	CA125	CA19-9	GlcNAc6ST2	β3Gal-T4/5
1	1A	G1	4	NT	8	<b><u>15,2</u></b>	0
2	1B	G2	48	NT	22	<b><u>262</u></b>	0
3	2A	G1	9	NT	7	0	<b><u>25,1</u></b>
4	3C	G1	NT <sup>2)</sup>	22	<b><u>82</u></b>	<b><u>17,9</u></b>	<b><u>41,1</u></b>
5	2A	G1	19	<b><u>93</u></b>	12	<b><u>15,1</u></b>	<b><u>62,9</u></b>
6	1B	G1	<b><u>94</u></b>	NT	<b><u>88</u></b>	0	<b><u>49,9</u></b>
7	3A	Carcinosarcoma	<b><u>614</u></b>	NT	13	<b><u>16,0</u></b>	0
8	1B	G1	6	NT	<1	0	0
9	1A	G1	25	NT	24	0	0
10	3C	G3	NT	<b><u>830</u></b>	<b><u>1.145</u></b>	3,0	0
11	3A	G3	NT	<b><u>81</u></b>	13	0	0
12	1B	G3	NT	28	22	<b><u>23,6</u></b>	<b><u>21,3</u></b>
13	1B	G1	21	26	19	0	0
14	1B	G1	15	NT	NT	<b><u>9,8</u></b>	<b><u>26,4</u></b>
15	1A	G1	8	NT	7	4,0	<b><u>24,7</u></b>
16	1B	G1	NT	NT	NT	6,4	0
17	1A	G1	NT	4	28	0	0
18	2A	G1	20	NT	28	3,2	<b><u>31,8</u></b>

## ES 2 434 958 T3

19	1B	G1	9	NT	19	6,0	<b><u>32,3</u></b>
20	1C	G2	22	22	<1	0	0
21	1A	G1	29	NT	7	5,8	<b><u>24,7</u></b>
22	1B	G2	12	NT	8	6,3	<b><u>20,9</u></b>
23	1C	G1	<b><u>81</u></b>	NT	<b><u>100</u></b>	<b><u>28,6</u></b>	<b><u>29,7</u></b>
24	2A	G1	NT	15	<1	5,1	<b><u>9,2</u></b>
25	3A <sup>1)</sup>	G1	<b><u>92</u></b>	NT	NT	0	<b><u>21,8</u></b>
26	3A	G3	<b><u>409</u></b>	NT	15	0	0
27			NT	<b><u>214</u></b>	19	0	<b><u>13,1</u></b>
28			NT	<b><u>84</u></b>	NT	<b><u>63,3</u></b>	<b><u>22,9</u></b>
29			NT	11	NT	0,4	<b><u>9,0</u></b>
30			NT	25	NT	<b><u>28,8</u></b>	<b><u>11,2</u></b>

<sup>1)</sup>: complicado con cáncer cervical

<sup>2)</sup>: NT: no ensayado

<sup>3)</sup>: El grado representa un grado de histodiferenciación (es decir, grado de malignidad del cáncer endometrial). G1 (grado 1) indica una forma bien diferenciada y es un tipo que es similar a la estructura glandular histológicamente normal. Por otra parte, G3 (grado 3) indica una forma poco diferenciada y es un tipo que muestra una propagación aleatoria.

### Ejemplo analítico 2

Los resultados mostrados en la Tabla 2 se reclasificaron en las proporciones positivas obtenidas por cada uno de los marcadores, como se muestra en la Tabla 3.

10 Tabla 3

Resultados de medidas en los sueros de los pacientes con cáncer endometrial

Marcador	Número de muestras (a)	Número de muestras positivas (b)	Proporción positiva 5% (b/a x 100)
CA602	19	5	26,3
CA125	13	5	38,5
CA19-9	24	4	16,7
GlcNAcST2	30	10	33,3
β3Gal-T4/5	30	18	60,0
GlcNAcST2 + β3Gal-T4/5	30	21	70,0

15 Las proporciones positivas para cada uno de CA602, CA125 y CA19-9, conocidos como marcadores convencionales para el cáncer endometrial fueron 26,3%, 38,5% y 16.7%, respectivamente. Por otra parte, la proporción positiva para el sistema de detección de β3Gal-T5 fue 60% y se confirmó la proporción positiva alta. Además, la proporción positiva para el sistema de detección de GlcNAc6ST-2 fue 33,3%, que fue mayor que las proporciones positivas para CA602 y CA19-9 y menor que la proporción positiva para CA125. Sin embargo, se demostró que el sistema de detección de GlcNAc6ST-2 puede detectar eficazmente el cáncer endometrial que no fue detectado por los marcadores convencionales, como se muestra en los números de muestra de 1, 2 y 12 de la Tabla 2. Además, en la medida usando el sistema de detección de β3Gal-T5 y/o el sistema de detección de GlcNAc6ST-2, el 70% de las muestras fueron positivas. Así, fue posible detectar el cáncer endometrial en proporciones altas, combinando los métodos inmunológicos del sistema de detección de β3Gal-T5 y el sistema de detección de GlcNAc6ST-2.

Ejemplo 9

5 Los sueros de 6 casos de los pacientes con cáncer endometrial se midieron usando el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5. 6 casos de la presente invención y 30 casos medidos en el Ejemplo 7 se dividieron en el estadio de la enfermedad I y estadios de la enfermedad II a IV. Las proporciones positivas para cada uno del estadio de la enfermedad I y estadios de la enfermedad II a IV se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Proporción positiva para el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5 según el estadio de la enfermedad

Estadios de la enfermedad	Número de muestras (a)	Número de muestras positivas (b)	Proporción positiva % (b/a x 100)
Estadio I	21	12	57,1
Estadios II a IV	15	11	73,3

10 Como se muestra en la Tabla 4, la proporción positiva para el sistema de detección de  $\beta$ 3Gal-T5 en el estadio de la enfermedad I de cáncer endometrial temprano fue 57,1% y fue posible detectar el cáncer endometrial en proporciones altas, incluso en el estadio temprano de la enfermedad.

**Aplicabilidad industrial**

Según el método de detección y el kit de detección para cáncer de ovario según la invención, es posible detectar con proporciones altas de éxito cáncer de ovario o cáncer endometrial.

15 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, son posibles varios cambios y modificaciones obvios para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Tokyo Institute of Technology  
 <120> Método para detectar cáncer ginecológico  
 <130> TIT-807
- 5 <150> JP 2007-219046  
 <151> 2007-08-24  
 <150> JP 2008-063641  
 <151> 2008-03-13  
 <160> 35
- 10 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 15 <220>  
 <223> Cebador directo para b3Gal-T5  
 <400> 1  
**tttgctcgaca gtctaaatcc ttccaag** 28  
 <210> 2
- 20 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para b3Gal-T5
- 25 <400> 2  
**tttaagcttc agacaggcgg acaatc** 26  
 <210> 3  
 <211> 28  
 <212> ADN
- 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para 3Gal-T1  
 <400> 3  
**tttggatcca gtataactcg ccctactt** 28
- 35 <210> 4  
 <211> 25

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para 3Gal-T1  
 5 <400> 4  
**tttaagcttc ctaacatctg agatg** 25  
 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para 3Gal-T2  
 <400> 5  
**tttggatccc tgccaggcag agctgga** 27  
 15 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador inverso para 3Gal-T2  
 <400> 6  
**tttaagctta atgtagttta cggtagg** 26  
 <210> 7  
 <211> 28  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para 3GalNac-T1  
 <400> 7  
 30 **tttggatcca gccttcccca ctacaatg** 28  
 <210> 8  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador inverso para 3GalNac-T1

	<400> 8		
	<b>tttaagctta ataatggcat gtggtgt</b>		<b>27</b>
	<210> 9		
	<211> 27		
5	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo para 3Gal-T4		
	<400> 9		
10	<b>tttggatcct tgggggagga gctgctg</b>		<b>27</b>
	<210> 10		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador inverso para 3Gal-T4		
	<400> 10		
	<b>tttgtcgact cagctctgaa gccaggc</b>		<b>27</b>
	<210> 11		
20	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo para 3Gal-T6		
25	<400> 11		
	<b>tttggatccg accccagggc gatgtcg</b>		<b>27</b>
	<210> 12		
	<211> 26		
	<212> ADN		
30	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso para 3Gal-T6		
	<400> 12		
	<b>tttaagcttg gctcagggga tgccct</b>		<b>26</b>
35	<210> 13		
	<211> 22		

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para PCR de 3Gal-T4  
 5 <400> 13  
**attcttgctg ggagagccga ac** 22  
 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para PCR de 3Gal-T4  
 <400> 14  
**aagtacagaa gaggcacttc ctc** 23  
 15 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador directo para PCR de 3Gal-T5  
 <400> 15  
**ggaaacgaaa gaggtggacc ag** 24  
 <210> 16  
 <211> 23  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para PCR de 3Gal-T5  
 <400> 16  
 30 **gagctcctcc aatctgatgt tca** 23  
 <210> 17  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador directo para GlcNac6ST2



	<400> 17	
	<b>tttgtcgaca gccacaacat cagct</b>	25
	<210> 18	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso para GlcNac6ST2	
	<400> 18	
10	<b>tttaagctta gtggatttgc tcag</b>	24
	<210> 19	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo para GlcNac6ST2-pichia	
	<400> 19	
	<b>tttcctaggt acagccacaa catcag</b>	26
	<210> 20	
20	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso para GlcNac6ST2-pichia	
25	<400> 20	
	<b>tttgcggccg cttagtggat ttgctcagg</b>	29
	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para GlcNac6ST1	
	<400> 21	
	<b>tttgtcgact acaagtggca caag</b>	24
35	<210> 22	
	<211> 24	

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para GlcNac6ST1  
 5 <400> 22  
**tttgtcgacc ccttttagag acgg** 24  
 <210> 23  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para GlcNac6ST3  
 <400> 23  
**tttgtcgact cccggccagg gccctc** 26  
 15 <210> 24  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador inverso para GlcNac6ST3  
 <400> 24  
**tttaagcttc agtcaggcga tgccca** 26  
 <210> 25  
 <211> 23  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para GlcNac6ST4  
 <400> 25  
 30 **tttgtcgacg gcggccgcga cgg** 23  
 <210> 26  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador inverso para GlcNac6ST4

<400> 26  
**tttaagcttg ggaggctacg tggcgc** 26  
 <210> 27  
 <211> 26  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para GlcNac6ST5  
 <400> 27  
 10 **tttgtcgact cccggccagg gccctc** 26  
 <210> 28  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador inverso para GlcNac6ST5  
 <400> 28  
**tttaagcttg ctacaactgt ggcctc** 26  
 <210> 29  
 20 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para Gal6ST  
 25 <400> 29  
**tttgtcgaca ccttcaccgc caagtc** 26  
 <210> 30  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para Gal6ST  
 <400> 30  
**tttaagcttc acgagaaggg gcggaa** 26  
 35 <210> 31  
 <211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador directo para Ch6ST1

5 <400> 31

**tttgtcgaca tatcaagggt ctcaga**

26

<210> 32

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para Ch6ST1

<400> 32

**tttaagcttc tacgtgaccc agaaggt**

27

15 <210> 33

<211> 310

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

ES 2 434 958 T3

Met Ala Phe Pro Lys Met Arg Leu Met Tyr Ile Cys Leu Leu Val Leu  
1 5 10 15

Gly Ala Leu Cys Leu Tyr Phe Ser Met Tyr Ser Leu Asn Pro Phe Lys  
20 25 30

Glu Gln Ser Phe Val Tyr Lys Lys Asp Gly Asn Phe Leu Lys Leu Pro  
35 40 45

Asp Thr Asp Cys Arg Gln Thr Pro Pro Phe Leu Val Leu Leu Val Thr  
50 55 60

Ser Ser His Lys Gln Leu Ala Glu Arg Met Ala Ile Arg Gln Thr Trp  
65 70 75 80

Gly Lys Glu Arg Met Val Lys Gly Lys Gln Leu Lys Thr Phe Phe Leu  
85 90 95

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

Ser Gln Arg His Gly Asp Ile Ile Gln Lys Asp Phe Leu Asp Val Tyr  
115 120 125

Tyr Asn Leu Thr Leu Lys Thr Met Met Gly Ile Glu Trp Val His Arg  
130 135 140

Phe Cys Pro Gln Ala Ala Phe Val Met Lys Thr Asp Ser Asp Met Phe  
145 150 155 160

Ile Asn Val Asp Tyr Leu Thr Glu Leu Leu Leu Lys Lys Asn Arg Thr  
165 170 175

Thr Arg Phe Phe Thr Gly Phe Leu Lys Leu Asn Glu Phe Pro Ile Arg  
180 185 190

Gln Pro Phe Ser Lys Trp Phe Val Ser Lys Ser Glu Tyr Pro Trp Asp  
195 200 205

Arg Tyr Pro Pro Phe Cys Ser Gly Thr Gly Tyr Val Phe Ser Gly Asp  
210 215 220

Val Ala Ser Gln Val Tyr Asn Val Ser Lys Ser Val Pro Tyr Ile Lys  
225 230 235 240

Leu Glu Asp Val Phe Val Gly Leu Cys Leu Glu Arg Leu Asn Ile Arg  
245 250 255

Leu Glu Glu Leu His Ser Gln Pro Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Arg  
260 265 270

ES 2 434 958 T3

Phe Ser Val Cys Leu Phe Arg Arg Ile Val Ala Cys His Phe Ile Lys  
275 280 285

Pro Arg Thr Leu Leu Asp Tyr Trp Gln Ala Leu Glu Asn Ser Arg Gly  
290 295 300

Glu Asp Cys Pro Pro Val  
305 310

<210> 34

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 34

Met Gln Leu Arg Leu Phe Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Val Ile Val Trp Thr Leu Phe Gly Pro Ser Gly Leu Gly Glu Glu Leu  
 20 25 30

Leu Ser Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Pro Ala Pro Ala Ser Pro Gly  
 35 40 45

Pro Pro Leu Ala Leu Pro Arg Leu Leu Ile Pro Asn Gln Glu Ala Cys  
 50 55 60

Ser Gly Pro Gly Ala Pro Pro Phe Leu Leu Ile Leu Val Cys Thr Ala  
 65 70 75 80

Pro Glu Asn Leu Asn Gln Arg Asn Ala Ile Arg Ala Ser Trp Gly Gly  
 85 90 95

Leu Arg Glu Ala Arg Gly Leu Arg Val Gln Thr Leu Phe Leu Leu Gly  
 100 105 110

Glu Pro Asn Ala Gln His Pro Val Trp Gly Ser Gln Gly Ser Asp Leu  
 115 120 125

Ala Ser Glu Ser Ala Ala Gln Gly Asp Ile Leu Gln Ala Ala Phe Gln  
 130 135 140

Asp Ser Tyr Arg Asn Leu Thr Leu Lys Thr Leu Ser Gly Leu Asn Trp  
 145 150 155 160

Ala Glu Lys His Cys Pro Met Ala Arg Tyr Val Leu Lys Thr Asp Asp  
 165 170 175

Asp Val Tyr Val Asn Val Pro Glu Leu Val Ser Glu Leu Val Leu Arg  
 180 185 190

ES 2 434 958 T3

Gly Gly Arg Trp Gly Gln Trp Glu Arg Ser Thr Glu Pro Gln Arg Glu  
 195 200 205

Ala Glu Gln Glu Gly Gly Gln Val Leu His Ser Glu Glu Val Pro Leu  
 210 215 220

Leu Tyr Leu Gly Arg Val His Trp Arg Val Asn Pro Ser Arg Thr Pro  
 225 230 235 240

Gly Gly Arg His Arg Val Ser Glu Glu Gln Trp Pro His Thr Trp Gly  
 245 250 255

Pro Phe Pro Pro Tyr Ala Ser Gly Thr Gly Tyr Val Leu Ser Ala Ser  
 260 265 270

Ala Val Gln Leu Ile Leu Lys Val Ala Ser Arg Ala Pro Leu Leu Pro  
 275 280 285

Leu Glu Asp Val Phe Val Gly Val Ser Ala Arg Arg Gly Gly Leu Ala  
 290 295 300

Pro Thr Gln Cys Val Lys Leu Ala Gly Ala Thr His Tyr Pro Leu Asp  
 305 310 315 320

Arg Cys Cys Tyr Gly Lys Phe Leu Leu Thr Ser His Arg Leu Asp Pro  
 325 330 335

Trp Lys Met Gln Glu Ala Trp Lys Leu Val Gly Gly Ser Asp Gly Glu  
 340 345 350

Arg Thr Ala Pro Phe Cys Ser Trp Phe Gln Gly Val Leu Gly Ile Leu  
 355 360 365

Arg Cys Arg Ala Ile Ala Trp Leu Gln Ser  
 370 375

<210> 35

<211> 386

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 35



ES 2 434 958 T3

Met Leu Leu Pro Lys Lys Met Lys Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Ile Leu Ala Leu Phe Phe His Met Tyr Ser His Asn Ile Ser  
 20 25 30  
 Ser Leu Ser Met Lys Ala Gln Pro Glu Arg Met His Val Leu Val Leu  
 35 40 45  
 Ser Ser Trp Arg Ser Gly Ser Ser Phe Val Gly Gln Leu Phe Gly Gln  
 50 55 60  
 His Pro Asp Val Phe Tyr Leu Met Glu Pro Ala Trp His Val Trp Met  
 65 70 75 80  
 Thr Phe Lys Gln Ser Thr Ala Trp Met Leu His Met Ala Val Arg Asp  
 85 90 95  
 Leu Ile Arg Ala Val Phe Leu Cys Asp Met Ser Val Phe Asp Ala Tyr  
 100 105 110  
 Met Glu Pro Gly Pro Arg Arg Gln Ser Ser Leu Phe Gln Trp Glu Asn  
 115 120 125  
 Ser Arg Ala Leu Cys Ser Ala Pro Ala Cys Asp Ile Ile Pro Gln Asp  
 130 135 140  
 Glu Ile Ile Pro Arg Ala His Cys Arg Leu Leu Cys Ser Gln Gln Pro  
 145 150 155 160  
 Phe Glu Val Val Glu Lys Ala Cys Arg Ser Tyr Ser His Val Val Leu  
 165 170 175  
 Lys Glu Val Arg Phe Phe Asn Leu Gln Ser Leu Tyr Pro Leu Leu Lys  
 180 185 190  
 Asp Pro Ser Leu Asn Leu His Ile Val His Leu Val Arg Asp Pro Arg  
 195 200 205  
 Ala Val Phe Arg Ser Arg Glu Arg Thr Lys Gly Asp Leu Met Ile Asp  
 210 215 220

Ser Arg Ile Val Met Gly Gln His Glu Gln Lys Leu Lys Lys Glu Asp  
 225 230 235 240

Gln Pro Tyr Tyr Val Met Gln Val Ile Cys Gln Ser Gln Leu Glu Ile  
 245 250 255

Tyr Lys Thr Ile Gln Ser Leu Pro Lys Ala Leu Gln Glu Arg Tyr Leu  
 260 265 270

Leu Val Arg Tyr Glu Asp Leu Ala Arg Ala Pro Val Ala Gln Thr Ser  
 275 280 285

Arg Met Tyr Glu Phe Val Gly Leu Glu Phe Leu Pro His Leu Gln Thr  
 290 295 300

Trp Val His Asn Ile Thr Arg Gly Lys Gly Met Gly Asp His Ala Phe  
 305 310 315 320

His Thr Asn Ala Arg Asp Ala Leu Asn Val Ser Gln Ala Trp Arg Trp  
 325 330 335

Ser Leu Pro Tyr Glu Lys Val Ser Arg Leu Gln Lys Ala Cys Gly Asp  
 340 345 350

Ala Met Asn Leu Leu Gly Tyr Arg His Val Arg Ser Glu Gln Glu Gln  
 355 360 365

Arg Asn Leu Leu Leu Asp Leu Leu Ser Thr Trp Thr Val Pro Glu Gln  
 370 375 380

Ile His  
 385

**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vitro para detectar cáncer de ovario caracterizado porque se detectan  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4.
- 5 2. Un método in vitro para detectar cáncer endometrial caracterizado porque se detectan  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 en sangre, suero o plasma.
3. Un método in vitro para detectar cáncer de ovario caracterizado porque se detecta GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2 en sangre, suero o plasma.
4. Un método in vitro para detectar cáncer endometrial caracterizado porque se detecta GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.
- 10 5. Un método in vitro para detectar cáncer de ovario caracterizado porque se detectan  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 y GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.
6. Un método in vitro para detectar cáncer endometrial caracterizado porque se detectan  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 y GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.
- 15 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 y 6, caracterizado porque se usa un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado porque se usa un anticuerpo que se une específicamente a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.
9. Uso de un kit para detectar cáncer de ovario in vitro, en el que el kit contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que tiene capacidad de unión específica a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4.
- 20 10. Uso de un kit para detectar cáncer endometrial in vitro por la detección de  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y/o  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 en sangre, suero o plasma, en el que el kit contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que tiene capacidad de unión específica a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4.
- 25 11. Uso de un kit para detectar cáncer de ovario in vitro por la detección de GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2 en sangre, suero o plasma, en el que el kit contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que tiene capacidad de unión específica a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.
12. Uso de un kit para detectar cáncer endometrial in vitro, en el que el kit contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que tiene capacidad de unión específica a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.
13. Un kit para detectar cáncer de ovario caracterizado porque contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que tiene capacidad de unión específica a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 y un anticuerpo o un fragmento de éste que tiene capacidad de unión específica a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.
- 30 14. Un kit para detectar cáncer endometrial caracterizado porque contiene un anticuerpo o un fragmento de éste que tiene capacidad de unión específica a  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-5 y  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa-4 y un anticuerpo o un fragmento de éste que tiene capacidad de unión específica a GlcNAc 6-O-sulfotransferasa-2.

Figura 1

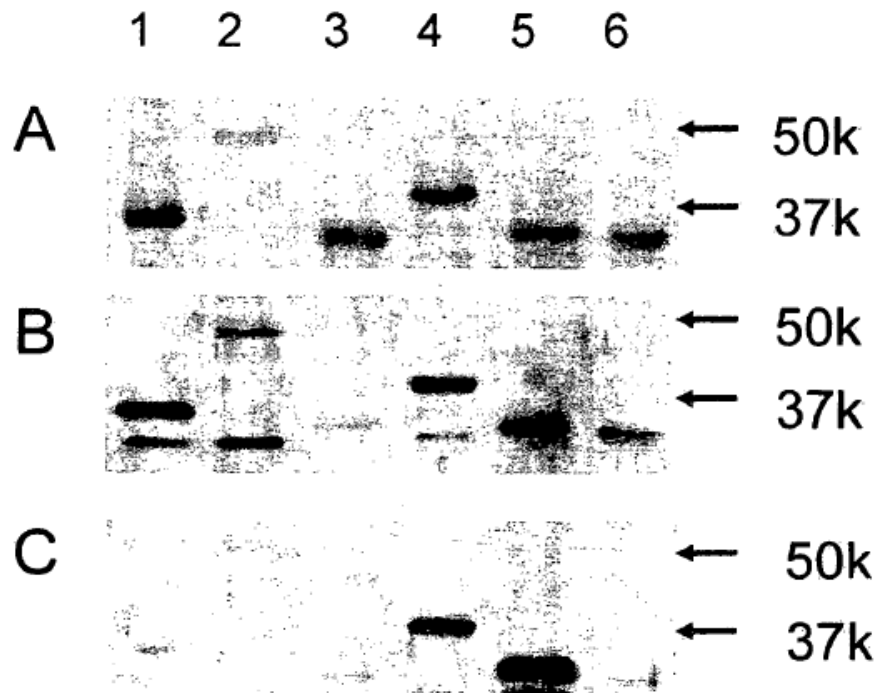


Figura 2

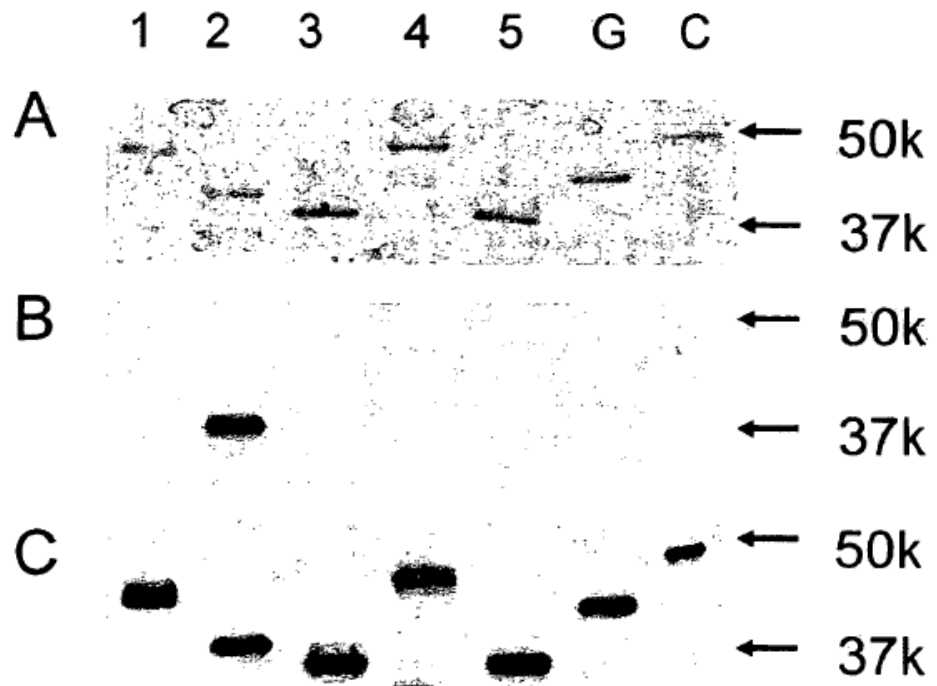


Figura 3

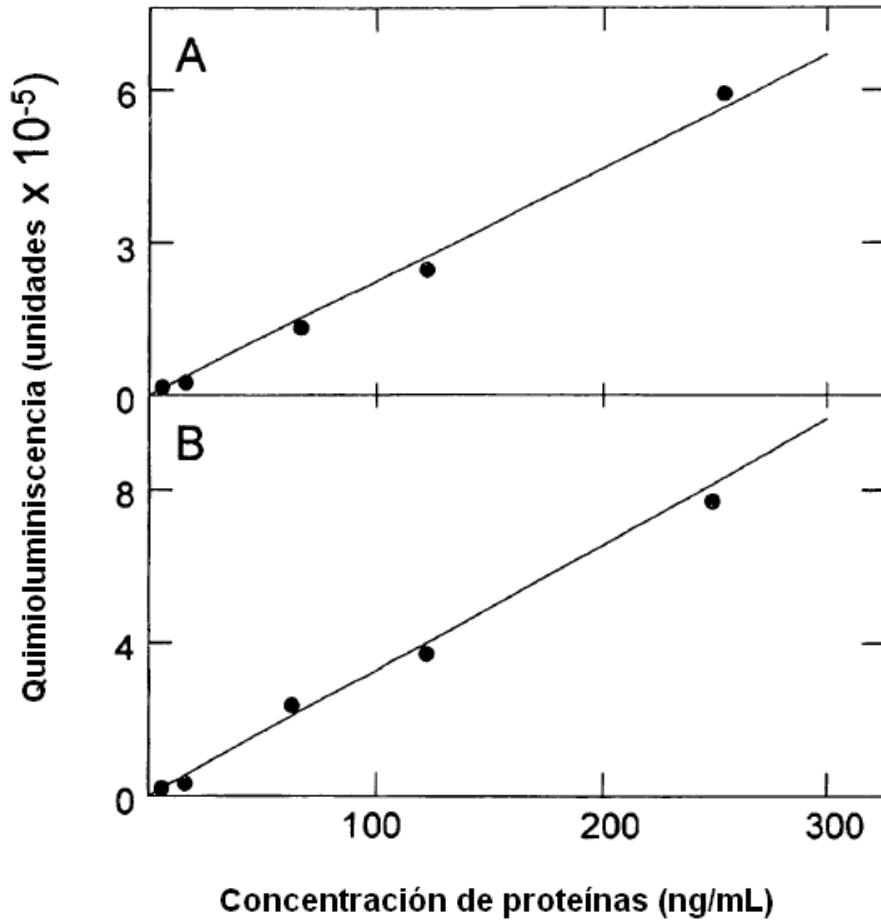


Figura 4

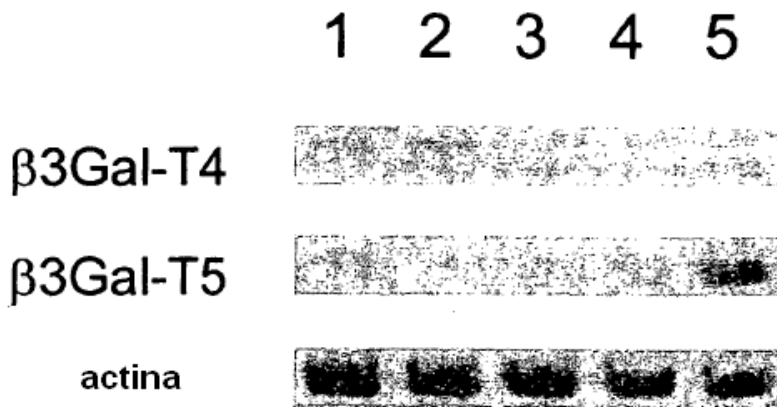
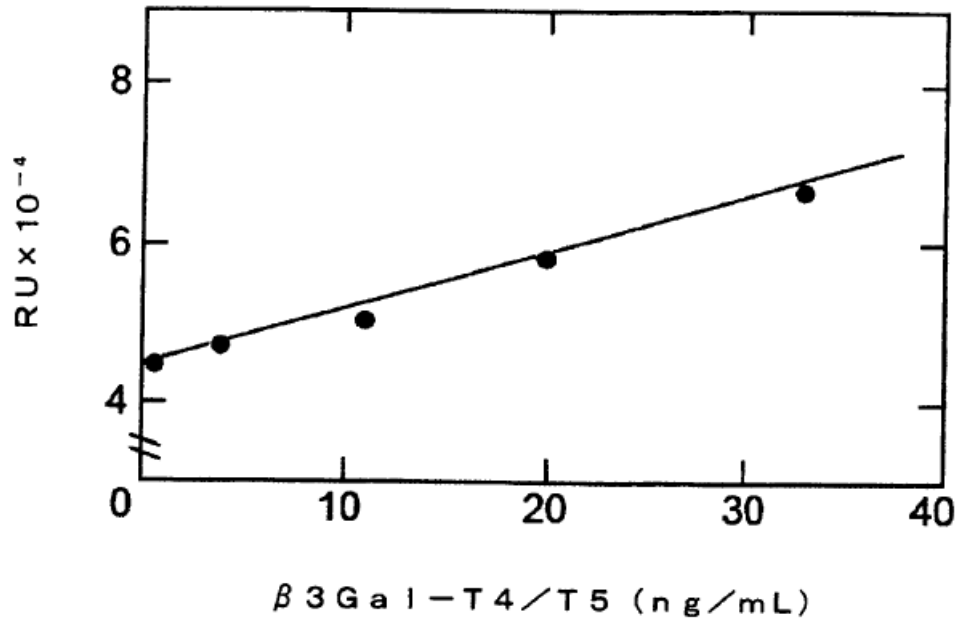


Figura 5

(A)



(B)

