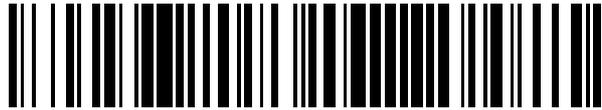


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 127**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2011** **E 11734594 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016** **EP 2498094**

54 Título: **Método para detectar el cáncer de páncreas**

30 Prioridad:

21.01.2010 JP 2010011447

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

30.05.2016

73 Titular/es:

**J-OIL MILLS, INC. (100.0%)
8-1, Akashi-cho Chuo-ku
Tokyo 104-0044, JP**

72 Inventor/es:

**KOBAYASHI, YUKA;
KUSAMA, KEN y
KAMEI, MASUGU**

74 Agente/Representante:

GALLEGO JIMÉNEZ, José Fernando

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 572 127 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).

MÉTODO PARA DETECTAR EL CÁNCER DE PÁNCREAS

Descripción

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para detectar el cáncer de páncreas, y más particularmente a un método para detectar el cáncer de páncreas en el que la haptoglobina patológica se utiliza como marcador tumoral.

Estado de la técnica

10 Dado que el páncreas se encuentra situado profundamente en el interior del cuerpo, el cáncer es difícil de detectar cuando se produce en el páncreas. Los marcadores tumorales para el diagnóstico de cáncer de páncreas incluyen el CEA (valor de referencia: 5,0 ng/mL) y el CA 19-9 (valor de referencia: 37 U/mL). Los resultados de estos marcadores tumorales pueden, sin embargo, incluir falsos positivos y, por lo tanto, no se pueden obtener resultados fiables usando solamente los marcadores tumorales. Para confirmar el cáncer de páncreas se requieren costosos exámenes exhaustivos, como la tomografía computarizada (TC), la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), la ecografía endoscópica (EE), angiografía, etc. Entre estas, la CPRE y la EE son invasivas y pueden suponer una carga para los pacientes.

15 Estudios recientes indican que cuando se desarrolla el cáncer de páncreas, la fucosa se une a las cadenas de azúcar de la haptoglobina, una de las glicoproteínas (Referencias bibliográficas 1 y 2, Referencia de patente 1). De acuerdo con la Referencia bibliográfica 1, esta haptoglobina patológica se incrementa a medida que la etapa del cáncer de páncreas avanza, y desaparecerá después de que el área del tumor del cáncer de páncreas se extirpe quirúrgicamente.

20 Miyoshi et al (proteomics 2008, 8, 3257) describe un método para detectar el cáncer de páncreas usando lectina AA específica para haptoglobina fucosilada1-6alfa.

Zhao et al (J. Proteome Research, 2007, 6, 1864) describe que el nivel de haptoglobina fucosilada se incrementa en el cáncer de páncreas en comparación con la pancreatitis medida con una micromatriz con detección de multilectina.

25 La haptoglobina humana es una glicoproteína compuesta por 406 aminoácidos, que contiene cuatro regiones de N-glicosilación en su cadena β (peso molecular: 40.000). La haptoglobina humana es abundante en el suero de adultos sanos en una concentración de 0,7 a 1,7 mg/mL. El uso de haptoglobina patológica como marcador tumoral para el cáncer de páncreas incluyendo el precoz puede lograrse mediante la detección de precisión de la haptoglobina patológica entre otras moléculas de haptoglobina.

30 Es concebible que la "lectina" de unión a un azúcar pueda usarse para obtener información sobre los cambios en la estructura y transferencia de cadenas de azúcar en la superficie celular asociados con la cancerización. Convencionalmente, la lectina de *Aleuria aurantia* (AAL), la lectina de *Lens culinaris* (LCA), la de lectina *Lotus japonicus* (Lotus), la lectina de *Ulex europaeus* (UEA-1), etc., son conocidas como lectinas para la detección de fucosa. Sin embargo, los métodos de detección que utilizan estas lectinas convencionales a menudo fracasan en mostrar una diferencia significativa entre sujetos sanos y pacientes con cáncer de páncreas.

Lista de citas

Referencias de patente

Referencia de patente 1: Publicación de la solicitud de patente japonesa no examinada No. 2009-168470

Referencias bibliográficas

40 Referencia bibliográfica 1: "Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation". Okuyama N, et. al., Int J Cancer. 2006, 1 de Junio; 118 (11): 2803-8

Referencia bibliográfica 2: "Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: a novel approach for the development of tumor markers". Nakano M, et al, Int J Cancer. 2008, 15 de Mayo; 122 (10): 2301-9

RESUMEN DE LA INVENCION

5 Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar con precisión la haptoglobina patológica, en el que se usa una lectina que se une específicamente a la haptoglobina patológica.

Solución al Problema

10 Después de extensos estudios, los presentes inventores han encontrado que el objeto se puede lograr mediante la(s) siguiente(s) invención(s). La presente invención proporciona un método para detectar el cáncer de páncreas, en donde una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se deja actuar sobre la haptoglobina patológica presente en una muestra obtenida de un cuerpo vivo, donde dicha lectina:

(1) es extraída de basidiomicetos,

15 (2) tiene un peso molecular de 4.000 a 40.000 determinado por electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato sódico (en adelante denominada electroforesis en gel de poli(acrilamida SDS), y

(3) tiene afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C .

(4) tiene una constante de unión de $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor para una cadena de azúcar de alto contenido en manosa y/o un glicolípido que no contiene una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

20 El basidiomiceto pertenece preferiblemente a la familia Strophariaceae, Tricholomataceae, Amanitaceae o Polyporaceae. En particular, el basidiomiceto es *Pholiota terrestris* Overholt, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota aurivella*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateralitium*, *Lepista sordida* o *Amanita muscaria*.

La muestra es, por ejemplo, suero o plasma humano.

25 En particular, el método de la presente invención para detectar el cáncer de páncreas detecta preferiblemente haptoglobina patológica por un ensayo en el que se utiliza la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y el anticuerpo anti-haptoglobina.

La lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ está preferiblemente marcada.

30 Además, se proporciona un método para distinguir el cáncer de páncreas de la pancreatitis en el que la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se deja actuar sobre la haptoglobina patológica contenida en una muestra obtenida de un cuerpo vivo que en suero tiene 30 U/mL o más de un marcador tumoral CA 19-9. La cantidad de CA 19-9 en suero es más preferiblemente 32 U/mL o más, y aún más preferiblemente 35 U/mL o más. En consecuencia, un sujeto sano, un paciente con cáncer de páncreas y un paciente con pancreatitis pueden distinguirse claramente.

La presente invención proporciona un reactivo de diagnóstico o kit para la detección de cáncer de páncreas y/o pancreatitis, que comprende una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, la lectina:

35 (1) es extraída de basidiomicetos,

(2) tiene un peso molecular de 4.000 a 40.000 determinado por electroforesis en gel de poli(acrilamida SDS, y

(3) tiene afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C .

40 (4) una constante de unión de $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor para una cadena de azúcar de alto contenido en manosa y/o un glicolípido que no contiene una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y, anticuerpo anti-haptoglobina. El kit también comprende anticuerpo anti-haptoglobina y/o anticuerpo anti-CA 19-9.

Efectos ventajosos de la invención

El método para la detección de cáncer de páncreas de la presente invención puede detectar la haptoglobina patológica con más precisión que las lectinas específicas de fucosa convencionales. Se espera que la haptoglobina patológica sirva como un marcador tumoral para el cáncer de páncreas. Como resultado, el cáncer de páncreas, previamente difícil de encontrar, puede ser más fácilmente detectado. En particular, el método de la presente invención es superior en comodidad ya que es aplicable para el cribado del cáncer mediante el uso de suero. Además, de acuerdo con un ensayo en el que se utiliza una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de la presente invención y anticuerpo anti-haptoglobina, es posible la detección rápida y simple del cáncer de páncreas. El cáncer de páncreas y la pancreatitis son difíciles de distinguir mediante el uso de solamente el marcador tumoral convencional CA 19-9. Por otra parte, en el método de la presente invención, el cáncer de páncreas y la pancreatitis se pueden distinguir fácilmente con el uso combinado de una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y CA 19-9.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Fig. 1 muestra un perfil de elución de cromatografía de intercambio iónico para PTL en el Ejemplo de Preparación 1.
- La Fig. 2 muestra un perfil de elución de cromatografía de afinidad para PTL en el Ejemplo de Preparación 1.
- La Fig. 3 muestra un perfil de elución de cromatografía hidrófoba para SRL en el Ejemplo de Preparación 2.
- La Fig. 4 muestra un perfil de elución de cromatografía de fase inversa para SRL en el Ejemplo de Preparación 2.
- La Fig. 5 muestra los valores de reacción (absorbancia) cuando haptoglobinas de suero humano (HP suero) y del sobrenadante de células de cáncer de páncreas (HP células cancerígenas) respectivamente se dejaron unir a PTL de acuerdo con la presente invención.
- La Fig. 6 muestra los valores de reacción cuando HP de suero y HP de células cancerígenas respectivamente se dejaron unir a LCA del ejemplo comparativo como en la Figura 5.
- La Fig. 7 muestra los valores de reacción cuando HP de suero y HP de células cancerígenas respectivamente se dejaron unir a AAL del ejemplo comparativo como en la Figura 5.
- La Fig. 8 muestra los valores de reacción (absorbancia) de los estudios de unión de haptoglobina de suero de sujetos sanos y haptoglobina de suero de pacientes con cáncer de páncreas con PTL de acuerdo con la presente invención.
- La Fig. 9 muestra los valores de reacción de los estudios de unión en que PTL fue reemplazada por AAL del ejemplo comparativo.
- La Fig. 10 muestra los resultados de la cuantificación de CA 19-9 en sueros de sujetos sanos, de pacientes con cáncer de páncreas y de pacientes con pancreatitis por un ensayo sándwich usando anticuerpos monoclonales anti-CA 19-9 de ratón y anticuerpos policlonales anti-CA 19-9 de conejo.
- La Fig. 11 muestra la cantidad relativa de haptoglobina en suero calculada a partir de los estudios de unión con el anticuerpo anti-haptoglobina (Anticuerpo anti-HP).
- La Fig. 12 muestra los valores calculados a partir de dividir los valores de reacción de PTL en la Figura 8 entre la cantidad relativa correspondiente de haptoglobina en la Figura 11.
- La Fig. 13 muestra los valores calculados a partir de dividir los valores de reacción de AAL en la Figura 9 entre la cantidad relativa correspondiente de haptoglobina en la Figura 11.

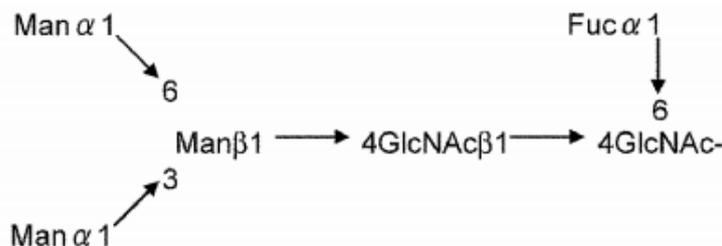
DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

A continuación se describe detalladamente una realización del método de la presente invención para la detección de cáncer de páncreas. El método de la presente invención está caracterizado por permitir que una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que tiene las siguientes propiedades físicas:

- (1) es extraída de basidiomicetos,
- 5 (2) tiene un peso molecular de 4.000 a 40.000 determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, y
- (3) tiene afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C , actúe sobre la haptoglobina patológica contenida en una muestra obtenida de un cuerpo vivo, detectándose así la haptoglobina patológica, y
- 10 (4) tiene una constante de unión de $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor para una cadena de azúcar de alto contenido en manosa y/o un glicolípido que no contiene una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

El método de detección de la presente invención requiere el uso de una lectina que reconozca específicamente una unión de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que se muestra en la siguiente fórmula.

[Fórmula 1]



15

en la que Man representa manosa, GlcNAc representa N-acetil glucosamina y Fuc representa fucosa.

Usando la nueva lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ descubierta por los presentes inventores, el cáncer de páncreas puede ser fácilmente detectado. Las propiedades físicas y químicas de la lectina se describirán a continuación en detalle.

- 20 (1) El origen de la lectina

La fuente de la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ pueden ser basidiomicetos. Entre los basidiomicetos, la lectina pertenece preferiblemente a la familia Strophariaceae, Tricholomataceae, Polyporaceae y Amanitaceae. La Strophariaceae incluye *Pholiota terrestris Overholts*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateritium*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota aurivella* y *Pholiota adiposa*. La Tricholomataceae incluye *Lepista sordida*. La Polyporaceae incluye *Trichaptum elongatum* y *Microporus vernicipes*. La Amanitaceae incluye *Amanita muscaria*. En vista de la especificidad del reconocimiento de la lectina para una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y de la eficacia de la purificación de la lectina, entre estos basidiomicetos, son particularmente preferidos Strophariaceae, Tricholomataceae, o Amanitaceae y más preferidos son *Pholiota terrestris Overholts*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota aurivella*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateritium*, *Lepista sordida* o *Amanita muscaria*.

- 30 (2) El peso molecular de la lectina

El peso molecular de la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ es de 4.000 a 40.000, preferiblemente de 4.000 a 20.000, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. El peso molecular en la presente invención, fue determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, por ejemplo, de acuerdo con el método de Laemmli (Nature, 227: 680, 1976).

- 35 (3) La constante de unión de la lectina

La constante de unión de la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ para las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ es $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor, preferiblemente $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor, y más preferiblemente $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o mayor. Es decir, que es significativamente mayor que la de AAL, lectinas de *Aspergillus* (AOL), LCA, lectinas de *Daffodil* (NPA) y lectinas

de *Pisum sativum* (PSA), que son previamente conocidas por tener afinidad por la fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Esto significa que la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se une a una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con un selectividad extremadamente alta en comparación con las lectinas convencionales.

5 Las constantes de unión antes mencionadas se pueden medir, por ejemplo, mediante el método de cromatografía de afinidad frontal (FAC). El método FAC se describe en detalle, por ejemplo, en PCT/JP2009/003346.

Las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ pueden tener ácido siálico en el extremo no reductor. Las lectinas específicas de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ convencionales (por ejemplo, LCA, NPA y PSA) mostraron menor afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que tienen ácido siálico en el extremo no reductor. Por otro lado, la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ es superior a las convencionales en que también muestra mayor afinidad por estas cadenas de azúcar.

10 (4) Especificidad de unión al azúcar de la lectina

La lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ preferiblemente no se une sustancialmente a una cadena de azúcar de alto contenido en manosa y/o un glicolípido que no tenga una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Esto proporciona a la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ una especificidad de unión aún mayor. En el presente documento, "no se une sustancialmente a" significa que la constante de unión es $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor, preferiblemente $1,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ o menor, y, en particular preferiblemente 0.

15

(5) La unión de la lectina a una cadena ramificada

La lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ preferiblemente tiene afinidad por una cadena de azúcar mono-, bi-, tri- y/o tetra-antennada con un N-enlace fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25° C , y más preferiblemente una constante de unión de $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor.

20 (6) La secuencia de aminoácidos de la lectina

Las lectinas específicas de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ tienen en común la estructura de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 1 en la Tabla 1. Xaa en las posiciones 4, 5, 6 y 7 de la SEQ ID No: 1 representan Asp/Asn/Glu/Thr, Thr/Ser/Ala, Tyr/Phe y Gln/Lys/Glu, respectivamente, donde las barras significan "o".

25 Ejemplos específicos de la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que se pueden utilizar en el método de la presente invención se muestran en las SEQ ID Nos: 2-6. La lectina que se muestra en la SEQ ID No: 2 es una nueva lectina que tiene un peso molecular de 4.500 que se puede extraer de *Pholiota terrestris Overholts* (PTL). Xaa en las posiciones 10 y 17 de la SEQ ID No: 2 puede ser cualquier residuo de aminoácido, aunque preferiblemente es Cys. Xaa en las posiciones 20, 23, 27, 33, 35 y 39 son Tyr/Ser, Phe/Tyr, Arg/Lys/Asn, Asp/Gly/Ser, Asn/Ala y Thr/Gln, respectivamente.

30 La lectina que se muestra en la SEQ ID No: 3 es una nueva lectina que tiene un peso molecular de 4.500 que se puede extraer de *Stropharia rugosoannulata* (SRL). Xaa en las posiciones 10 y 17 de la SEQ ID No: 3 puede ser cualquier residuo de aminoácido, aunque preferiblemente es Cys. Xaa en las posiciones 4, 7, 9, 13, 20, 27, 29, 33, 34 y 39 es Pro/Gly, Glu/Lys, Val/Asp, Asn/Asp/Glu, His/Ser, Lys/His, Val/Ile, Gly/Asn/Ser, Ala/Thr y Arg/Thr, respectivamente.

35 La lectina que se muestra en la SEQ ID No: 4 es una nueva lectina que tiene un peso molecular de 4.500 que se puede extraer de *Lepista sordida* (LSL). Xaa en las posiciones 10 y 17 de la SEQ ID No: 4 puede ser cualquier residuo de aminoácido, aunque preferiblemente es Cys. Xaa en las posiciones 1, 4, 7, 8, 9, 13, 16, 20, 22, 25, 27, 31 y 34 es Ala/Gln, Pro/Lys, Ala/Ser, Met/Ile/Val, Tyr/Thr, Asp/Asn, Lys/Glu, Ala/Asn, Val/Asp/Asn, Asp/Asn, Arg/His/Asn, Gln/Arg y Thr/Val, respectivamente.

40 La lectina que se muestra en la SEQ ID No: 5 es una nueva lectina que se puede extraer de *Naematoloma sublateritium* (NSL). Xaa en las posiciones 10 y 17 de la SEQ ID NO: 5 puede ser cualquier residuo de aminoácido, aunque preferiblemente es Cys. Xaa en las posiciones 13, 14 y 16 es Asp/Thr, Ser/Ala y Gln/Lys, respectivamente.

La lectina se muestra en la SEQ ID No: 6 es también una nueva lectina que tiene un peso molecular de 4.500 que se puede extraer de *Naematoloma sublateritium* (NSL). La SEQ ID No: 6 es una variante en la que una Asn se inserta en

el péptido de la SEQ ID No: 5. Por lo tanto, Xaa en las posiciones 10 y 18 de la SEQ ID No: 6 puede ser cualquier residuo de aminoácido, aunque preferiblemente es Cys. Xaa en las posiciones 14, 15 y 17 es Asp/Thr, Ser/Ala y Gln/Lys, respectivamente.

5 La lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede comprender generalmente 2-10, preferiblemente 2-4 subunidades de las lectinas de SEQ ID Nos: 2-6, que están unidas entre sí.

Tabla 1

Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No:
	Cys Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Cys	1
PTL	Ala Pro Val Pro Val Thr Lys Leu Val Xaa Asp Gly Asp Thr Tyr Lys Xaa Thr Ala Xaa Leu Asp Xaa Gly Asp Gly Xaa Trp Val Ala Gln Trp Xaa Thr Xaa Val Phe His Xaa Gly	2
SRL	Ala Pro Val Xaa Val Thr Xaa Leu Xaa Xaa Asp Gly Xaa Ser Tyr Lys Xaa Thr Ala Xaa Leu Asp Tyr Gly Asp Gly Xaa Trp Xaa Ala Gln Trp Xaa Xaa Asn Val Phe His Xaa	3
LSL	Xaa Pro Val Xaa Val Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gly Xaa Thr Tyr Xaa Xaa Thr Ala Xaa Leu Xaa Tyr Gly Xaa Gly Xaa Trp Val Ala Xaa Trp Ser Xaa Ala Val Phe His Gln Ser	4
NSL	Ala Pro Val Pro Val Thr Lys Leu Val Xaa Asp Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Thr Ala Asn Leu Asp Phe Gly Asp Gly Asn Trp Val Ala Gln Trp Ser Thr Asn Val Phe His Asn	5
NSL	Ala Pro Val Pro Val Thr Lys Leu Val Xaa Asp Asp Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Thr Ala Asn Leu Asp Phe Gly Asp Gly Asn Trp Val Ala Gln Trp Ser Thr Asn Val Phe His Asn	6

La lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede ser (a) una proteína o un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en cualquiera de las SEQ ID Nos: 2-5, así como (b) una proteína o un péptido que tiene uno o más aminoácidos eliminados, insertados o sustituidos en la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera

de las SEQ ID Nos: 2-5, y además, funcionalmente equivalente a una proteína o un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID Nos: 2-5. En donde "funcionalmente equivalente" significa que la proteína o péptido tiene afinidad por una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor, preferiblemente $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor, y más preferiblemente $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o mayor.

5 Un ejemplo de una variante de (b) es la proteína o el péptido que se muestra en la SEQ ID No: 6.

La lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ es en particular preferiblemente PTL, SRL, NSL, LSL y lectina de *Amanita muscaria* (AML), y más preferiblemente PTL y SRL. PTL y SRL son las más adecuadas para la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ utilizada en el método de discriminación de la presente invención, ya que no se unen a ninguna fucosa que no sea una fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, ni a cadenas de azúcar de alto contenido en manosa que no tienen fucosa, mostrando así propiedades diferentes a las de las lectinas con afinidad por fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ convencionales.

10

La lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede ser aislada de basidiomicetos usando métodos de extracción, separación o purificación, etc. conocidos o una combinación adecuada de los mismos. Por ejemplo, estos incluyen una etapa de obtención de un extracto en medio acuoso a partir de basidiomicetos usando un medio acuoso como disolvente de extracción. A partir del extracto, se puede obtener una lectina, teniendo la lectina un peso molecular de 4.000 a 40.000, preferiblemente de 4.000-20.000 medido por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, y teniendo afinidad por cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor, preferiblemente $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor, y más preferiblemente $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C .

15

Preferiblemente, el basidiomiceto se selecciona de al menos una de las familias Strophariaceae, Tricholomataceae, Polyporaceae y Amanitaceae. En particular preferiblemente, pertenece a la familia Strophariaceae como *Pholiota terrestris* Overholts, *Pholiota squarrosa* (*Pholiota squarrosa* (Fr.) Kummer), *Pholiota adiposa* (*Pholiota adiposa* (Fr.) Kummer), *Nameko mushroom* (*Pholiota nameko* (T. Ito) S.Ito & Imai), *Stropharia rugosoannulata* (*Stropharia rugosoannulata* Farlow en Murr.), *Naematoloma sublateritium* (*Naematoloma sublateritium* (Fr.) Karst o *Hypholoma sublateritium* (Fr.) Quel), Tricholomataceae como *Lepista sordida* (*Lepista sordida* (Schum.:Fr.) Sing.), Polyporaceae como *Trichaptum elongatum* y *Microporus vernicipes* y Amanitaceae como *Amanita muscaria*. Una porción de estos basidiomicetos a ser utilizados son preferiblemente un cuerpo fructífero.

20

25

No hay ninguna limitación en particular para el método de obtención de un extracto soluble en agua a partir de un medio acuoso y un cuerpo fructífero de basidiomiceto, siempre y cuando se permita que el medio acuoso tenga contacto con el cuerpo fructífero del basidiomiceto. En vista de la eficiencia de la extracción, se prefiere un método de fracturar el cuerpo fructífero del basidiomiceto en un medio acuoso en una suspensión. Además, los métodos de fracturación incluyen métodos convencionales utilizando un mezclador, un homogeneizador.

30

El disolvente acuoso puede incluir un tampón, y una mezcla de un disolvente orgánico miscible en agua con agua o con un tampón. Preferiblemente, es un tampón, o una mezcla de un tampón y un disolvente orgánico.

Se puede utilizar cualquier tampón conocido como tampón, sin ninguna limitación en particular. Entre éstos, las soluciones tampón que tienen capacidad tamponante entre pH 3 y 10, más preferiblemente entre pH 6 y 8. Específicamente, incluyen tampón fosfato, tampón citrato, tampón de ácido acético, y tampón de Tris. En particular, se prefiere tampón fosfato en vista de la eficiencia de extracción.

35

Las concentraciones de sal en las soluciones tampón son, sin ninguna limitación en particular, preferiblemente 1-100 mM, y más preferiblemente 5-20 mM en vista de la eficiencia de extracción y la capacidad tamponante.

Las soluciones tampón pueden además contener sales. Por ejemplo, el tampón fosfato salino, en donde se añade cloruro sódico al tampón fosfato, etc. es preferido como medio acuoso.

40

Cualquier disolvente orgánico miscible en agua puede ser usado como disolvente orgánico sin ninguna limitación particular. En particular, son preferidos acetona, metanol, etanol, 2-propanol y acetonitrilo. En el caso de mezclar un disolvente orgánico con agua o un tampón, el contenido de disolvente orgánico es preferiblemente del 10 al 40% en masa.

45

Preferiblemente, la etapa de extracción comprende además una etapa de eliminación de los materiales insolubles de una mezcla de un medio acuoso y un cuerpo fructífero de basidiomiceto. Los métodos de eliminación de los materiales

insolubles pueden incluir un método como la filtración y la centrifugación, pero la centrifugación es preferida en vista de la eficiencia de eliminación.

5 En particular, la etapa de extracción es preferiblemente una etapa de fracturar el cuerpo fructífero de basidiomiceto en tampón de fosfato salino y la eliminación de los materiales insolubles por centrifugación para obtener un extracto en medio acuoso.

Para un método de manufactura de la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, el uso de cualquiera de los siguientes métodos de purificación permite una purificación más eficiente.

Método de purificación 1

10 El extracto en medio acuoso obtenido mediante la etapa anterior se somete a precipitación con sulfato de amonio para obtener una fracción que contiene la lectina, que es purificada a continuación por cromatografía hidrófoba y cromatografía de fase inversa.

Método de purificación 2

El extracto en medio acuoso obtenido mediante la etapa anterior se somete a cromatografía de afinidad usando los soportes en los que la tiroglobulina es inmovilizada en agarosa.

15 Método de purificación 3

El extracto soluble en agua obtenido mediante la etapa anterior se somete a precipitación con sulfato de amonio para obtener una fracción que contiene lectina, que luego es dializada y liofilizada. Entonces la fracción de lectina cruda se disuelve en tampón de Tris y posteriormente es sometida a cromatografía de intercambio iónico. A continuación, la fracción activa resultante es concentrada, y, posteriormente, es separada mediante cromatografía de filtración en gel.

20 El método de manufactura de la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede comprender una etapa de diálisis de la fracción que contiene la lectina obtenida en la etapa de purificación anterior, y una etapa de liofilización de la solución de lectina dializada. De este modo, la lectina se puede aislar fácilmente. La etapa de diálisis y la etapa de liofilización pueden ser realizadas mediante métodos conocidos y comúnmente utilizados.

25 La lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, que es (a) una proteína o un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en cualquiera de las SEQ ID Nos: 2-5, o (b) una proteína o un péptido que tiene uno o más aminoácidos eliminados, insertados o sustituidos en la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID Nos: 2-5, y además, funcionalmente equivalente a una proteína o un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID Nos: 2-5, puede ser extraída de la planta natural, y también puede ser expresada artificialmente en un huésped no nativo o sintetizada químicamente. La expresión en un huésped y la síntesis química se pueden realizar por métodos conocidos y comúnmente utilizados.

30 Preferiblemente, se pre-incorpora un medio de marcaje en la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ utilizada para la detección. Dicha lectina puede ser posteriormente denominada como una lectina marcada. Una lectina marcada comprende al menos una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y un medio de marcaje, y está marcada de forma detectable.

35 Para dichos medios de marcaje, cualquier método conocido de marcaje puede ser aplicado sin ninguna limitación en particular, incluyendo, por ejemplo, el marcaje con un isótopo radiactivo y fijación de un compuesto marcado.

40 Para dichos compuestos marcados, cualquiera de los compuestos usados comúnmente para este propósito puede ser aplicado sin ninguna limitación en particular, incluyendo, por ejemplo, un compuesto marcado directa o indirectamente, una enzima, y un compuesto de fluorescencia. Específicamente, se incluye biotina, digoxigenina, peroxidasa de rábano silvestre, isotiocianato de fluoresceína y CyDye. Estos compuestos marcados se pueden unir convencionalmente a una lectina.

No hay limitación particular para las muestras anteriores, siempre que se obtengan de un cuerpo vivo comprendiendo animales incluido el hombre, incluyendo las muestras, por ejemplo, sangre, plasma, suero, lágrima, saliva, fluido

corporal, leche, orina, sobrenadantes de cultivos celulares, materiales secretados de un animal transgénico. Cuando el método de detección de la presente invención se utiliza para el cribado del cáncer de páncreas, se pueden utilizar como muestra el suero o el plasma obtenidos de humanos. El suero se puede extraer de forma convencional a partir de sangre.

5 Las lectinas específicas de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ mostrarán alta afinidad por cualquiera de las cadenas de azúcar que tienen una unión fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (por ejemplo, inmunoglobulina G, α -fetoproteína, antígeno prostático específico, etc. mostrados en la Tabla 1). A fin de eliminar la detección de estas cadenas de azúcar, el método de la presente invención detecta preferiblemente haptoglobina patológica por un ensayo sándwich utilizando la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y anticuerpo anti-haptoglobina.

10 Para el ensayo sándwich, en primer lugar, el anticuerpo anti-haptoglobina se hace reaccionar con una muestra como el sobrenadante de cultivo celular y suero para obtener un complejo de haptoglobina o haptoglobina patológica con el anticuerpo anti-haptoglobina. Estos complejos se aíslan y purifican por cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación, etc. A continuación, el complejo se hace reaccionar con la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ para obtener un complejo de lectina-haptoglobina patológica- anticuerpo anti-haptoglobina.

15 Alternativamente, en el ensayo sándwich, la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se puede hacer reaccionar primero con una muestra que contiene haptoglobina patológica para obtener un complejo de lectina-haptoglobina patológica, y luego el complejo lectina-haptoglobina patológica puede hacerse reaccionar con el anticuerpo anti-haptoglobina para obtener un complejo de lectina-haptoglobina patológica-anticuerpo anti-haptoglobina.

20 El anticuerpo anti-haptoglobina que puede reconocer específicamente la haptoglobina se puede obtener en base a métodos convencionales. Un ejemplo es un método de inmunización de animales con haptoglobina como antígeno para obtener un anticuerpo anti-haptoglobina. El anticuerpo anti-haptoglobina puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

25 Los métodos para la detección de la unión de la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con la haptoglobina patológica incluyen ELISA (ELISA sándwich, etc.), cromatografía de lectinas, transferencia de lectinas, tinción de lectinas, un chip de lectinas, el método de condensación y el método de resonancia de plasmón superficial como el sistema Biacore^(R). En particular, se prefiere el método de detección utilizando el sistema avidina-biotina o estreptavidina-biotina debido a su alta sensibilidad.

30 En el ELISA sándwich, se añade anticuerpo anti-haptoglobina y se inmoviliza en una placa antes de añadir las muestras como el suero. A continuación, se añade una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ marcada con biotina, permitiendo que la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ reaccione con la haptoglobina patológica contenida en el suero. Se añade una solución de estreptavidina marcada con HRP (peroxidasa de rábano silvestre) como compuesto marcado secundario, dejando reaccionar la biotina con la estreptavidina. A continuación, se añade sustrato cromogénico de HRP para medir la intensidad de color con un absorbímetro (para HRP, una longitud de onda de 450 nm). Si se crea previamente una curva de calibración utilizando una muestra estándar que contiene una concentración conocida de haptoglobina patológica, la cuantificación de la haptoglobina patológica es también posible.

35 La cromatografía de lectina es cromatografía de afinidad que utiliza la propiedad de una lectina inmovilizada en un soporte para unirse específicamente con una cadena de azúcar. Se puede esperar un alto rendimiento cuando se combina con HPLC.

40 Materiales de gel como agarosa, dextrano, celulosa, almidón y poliacrilamida se utilizan generalmente como un soporte en el que se inmoviliza la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Para este propósito se pueden utilizar los productos disponibles comercialmente, sin ninguna limitación en particular, incluyendo Sepharose 4B y Sepharose 6B (ambos de GE healthcare bioscience). Las columnas de la cromatografía de lectina incluyen aquellas en las que la lectina se inmoviliza sobre una microplaca o nanopocillos.

45 La concentración de la lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ para ser inmovilizada es generalmente de 0,001 a 100 mg/mL, preferiblemente 0,01 a 20 mg/mL. Cuando el soporte es un gel de agarosa, éste se activa mediante CNBr, etc., y luego la lectina se acopla al mismo. La lectina puede inmovilizarse en el gel en el que se ha introducido un espaciador activado. Además, después de inmovilizar a la lectina en el gel que tiene un grupo formilo introducido, el

gel puede ser reducido con NaCNBH_3 . Por otra parte, se puede utilizar un gel activado disponible comercialmente tal como NHS-Sepharose (GE healthcare bioscience).

5 Una muestra de cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se carga en una columna, que a continuación se trata con una solución tampón para su lavado. Una solución tampón ejemplo es una solución tampón que tiene una concentración molar de 5 a 500 mM, preferiblemente de 10 a 500 mM, y un valor de pH de 4,0 a 10,0, preferiblemente de 6,0 a 9,0, y un contenido de NaCl de 0 a 0,5 M, preferiblemente de 0,1 a 0,2 M, y un contenido de CaCl_2 , MgCl_2 o MnCl_2 de 0 a 10 mM, preferiblemente de 0 a 5 mM.

10 La elución de las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ después de lavar la columna de afinidad se realiza en un tampón neutro no desnaturalizante usando un agente de elución como cloruro de sodio, azúcar hapteno. Este tampón puede ser el mismo que el anterior. La concentración del agente de elución es preferiblemente una concentración de 1 a 500 mM, en particular preferiblemente de 10 a 200 mM.

La presente invención también proporciona un método para distinguir el cáncer de páncreas de la pancreatitis, en donde una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se deja actuar con haptoglobina patológica contenida en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo que tiene 30 U/mL o más de CA 19-9 en suero, la lectina:

15 (1) es extraída de basidiomicetos,
 (2) tiene un peso molecular de 4.000 a 40.000 determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, y
 (3) tiene afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C .

20 El funcionamiento de este método de distinción es el mismo que el del método de detección anterior para el cáncer de páncreas excepto que se usa una muestra obtenida de un cuerpo vivo que tiene 30 U/mL o más de CA 19-9 en suero. Como se muestra en la Tabla 3 y en la Fig. 10, el cáncer de páncreas y la pancreatitis son difíciles de distinguir usando solamente el marcador tumoral convencional CA 19-9. Por otro lado, según el método de la presente invención en el que el marcador CA 19-9 y una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se utilizan en combinación, el cáncer de páncreas
 25 y la pancreatitis se distinguen fácilmente como se muestra en la Fig. 8.

La presente invención también proporciona un reactivo de diagnóstico o kit para detectar cáncer de páncreas y/o pancreatitis, que comprende una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, la lectina:

30 (1) es extraída de basidiomicetos,
 (2) tiene un peso molecular de 4.000 a 40.000 determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, y
 (3) tiene afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C , y
 (4) tiene una constante de unión de $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor para una cadena de azúcar de alto contenido en manosa y/o un glicolípido que no contiene una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

35 Dicha lectina está preferiblemente marcada. El reactivo de diagnóstico o kit comprende opcionalmente lo que se incluye en los kits de reactivos de diagnóstico conocidos, como un marcador (una enzima y los sustratos cromogénicos de la misma, un isótopo radiactivo, un material luminiscente, un material fluorescente, un material de color), un tampón, una placa y una solución de desactivante. En particular, comprende preferiblemente un reactivo para extraer la haptoglobina de una muestra obtenida de un cuerpo vivo (por ejemplo, un anticuerpo anti-haptoglobina).

40 Ejemplos

Los ejemplos de la presente invención se muestran a continuación para ilustrar la presente invención en detalle. Sin embargo no se pretende limitar la presente invención a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo de Preparación 1: Manufactura de PTL

De acuerdo con la etapa de purificación que se muestra a continuación, la lectina de *Pholiota terrestris Overholts* (PTL) fue aislada y purificada a partir de *Pholiota terrestris Overholts*.

Extracción

5 El polvo liofilizado (2,5 g) obtenido por liofilización de *Pholiota terrestris Overholts* (7,5 g) se extrajo con 50 mL de tampón de Tris 10 mM (pH 7,2) a 4 °C durante 2 horas. El extracto resultante se centrifugó (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). A continuación, el sobrenadante se sometió a filtrado a través de una gasa para obtener así el primer extracto. Este residuo de extracción se volvió a extraer con 50 mL de tampón de Tris 10 mM (pH 7,2) a 4 °C durante la noche. Después de centrifugar este extracto (15.000 rpm, 20 min, 4 °C), el sobrenadante se sometió a filtrado a través de una gasa para obtener así el segundo extracto. A continuación, estos extractos se filtraron colectivamente por un filtro de papel para obtener de este modo el extracto de *Pholiota terrestris*.
10

Cromatografía de intercambio de iones

15 El extracto (87 mL) fue aplicado en una columna de DEAE-Sepharose (GE Healthcare Bioscience) equilibrada con tampón de Tris 10 mM (pH 7,2). Después de que la columna fue lavada con el tampón, la fracción unida se desorbió con NaCl 0,1 M en el tampón. A continuación, las fracciones que mostraban actividad de hemoaglutinación (mostrado por ← → en la Fig. 4) se dializaron extensamente frente a agua destilada y se liofilizaron.

Cromatografía de afinidad

20 El dializado liofilizado se disolvió de nuevo en tampón de fosfato salino 10 mM (pH 7,4, en adelante denominado simplemente PBS). A continuación, la solución del extracto fue aplicado en una columna de tiroglobulina inmovilizada en agarosa equilibrada con el mismo tampón. Después de que la columna fue lavada con PBS, la fracción unida se desorbió con amoníaco 0,2 M. A continuación, las fracciones que mostraban actividad de hemoaglutinación (mostrado por ← → en la Fig. 2) fueron recogidas, ultrafiltradas y liofilizadas; obteniendo de este modo 1,07 mg de la PTL. Las propiedades físicas y químicas de la PLT con respecto a (2) peso molecular, (3) constantes de unión, (4) especificidad de unión a carbohidratos, (5) unión a cadenas ramificadas y (6) secuencias de aminoácidos se describen en el documento PCT/JP2009/003346 antes citado.

25 Ejemplo de Preparación 2: Manufactura de SRL

De acuerdo con las etapas de purificación que se muestran a continuación, la lectina de *Stropharia rugosoannulata* (SRL) fue aislada y purificada a partir de *Stropharia rugosoannulata*.

Extracción

30 El polvo liofilizado de *Stropharia rugosoannulata* (400 g) se extrajo con 1,6 L de PBS a 4 °C durante 2 horas. El líquido resultante se centrifugó (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). A continuación, el sobrenadante se sometió a filtrado a través de una gasa para obtener así el primer extracto. Este residuo de extracción se volvió a extraer con 0,8 L de PBS a 4 °C durante la noche. Este extracto se centrifugó (10.000 rpm, 20 min, 4 °C). A continuación, el sobrenadante se sometió a filtrado a través de una gasa para obtener así el segundo extracto. Estos extractos se mezclaron para obtener de ese modo líquido de extracción de *Stropharia rugosoannulata*.

35 Precipitación con sulfato amónico

Se añadió (NH₄)₂SO₄ sólido (1,3 kg) al sobrenadante resultante (2,4 L) para obtener un 80% de saturación. Después de reposar a 4 °C durante la noche, los precipitados se recogieron mediante centrifugación (10.000 rpm, 20 min, 4 °C) y se dializaron extensivamente frente a agua destilada y se liofilizaron, recogiendo de este modo la fracción de precipitación *Stropharia rugosoannulata*-sulfato amónico 80%.

40 Cromatografía hidrófoba

La fracción de precipitación *Stropharia rugosoannulata*-sulfato amónico 80% fue aplicada a Butil-TOYOPEARL 650M (TOSOH CORPORATION) equilibrada con sulfato de amonio-PBS 2 M para realizar una purificación por cromatografía hidrófoba. En esta cromatografía, se recogieron fracciones de elución con agua destilada, se ultrafiltraron, y se

liofilizaron, obteniendo de este modo la fracción cruda de lectina de *Stropharia rugosoannulata* (mostrada por ← → en la Fig. 3).

Cromatografía de fase inversa

5 La fracción cruda de lectina de *Stropharia rugosoannulata* fue aplicada en la columna C8 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) equilibrada con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05% / acetonitrilo (100/0). En esta cromatografía, se recogió la fracción de elución TFA 0,05%/acetonitrilo (70/30) (mostrada por ← → en la Fig. 4). A continuación, el disolvente se eliminó por evaporación a temperatura ambiente y los polvos secos resultantes se recogieron, obteniendo de este modo 7,5 mg de la SRL. Las propiedades físicas y químicas de la SRL con respecto a (2) peso molecular, (3) constantes de unión, (4) especificidad de unión a carbohidratos, (5) unión a cadenas ramificadas y (6) 10 secuencias de aminoácidos se describen en el documento PCT/JP2009/003346 antes citado.

Ejemplo de Referencia 1: Detección de diversas glicoproteínas en suero por las lectinas

Se investigó por ELISA la afinidad entre las glicoproteínas que se muestran en la Tabla 1 y las lectinas marcadas con biotina que se muestran a continuación: PTL (una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que se puede utilizar en la presente invención), y las siguientes lectinas disponibles comercialmente que se cree que son específicas de fucosa: 15 LCA (Seikagaku Biobusiness Corporation, J-OIL MILLS, Inc), AAL (Seikagaku Biobusiness Corporation, J-OIL MILLS, Inc), Lotus (Seikagaku Biobusiness Corporation, J-OIL MILLS, Inc), y UEA-I (Seikagaku Biobusiness Corporation, J-OIL MILLS, Inc).

La glicoproteína del suero (seroalbúmina humana (CALBIOCHEM), Inmunoglobulina G (Sigma), transferrina (Sigma), fibrinógeno (AbD Serotec), Inmunoglobulina A (BETYL) $\alpha 2$ -macroglobulina (BMO), Inmunoglobulina M (ROCKLAND), 20 Complemento C3 (CALBIOCHEM), haptoglobina (BIODESIGN), $\alpha 1$ -glicoproteína ácida (Sigma), α -fetoproteína (Fitzgerald), α -fetoproteína L3 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) y el antígeno prostático específico (Scipac) se disolvieron en PBS a 1 mg/mL, y posteriormente se diluyeron a 10 ng/mL con tampón carbonato 0,1 M (pH 9,5). Se añadieron cincuenta μ L de la solución diluida a una placa de microtitulación (Nunc 439454), y después se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavarse una vez con Tween 20 (monolaurato de sorbitán polioxietileno) (en lo sucesivo abreviado como Tween)/PBS al 0,05%, se añadieron 200 μ L de albúmina de suero bovino (BSA)/PBS al 1% a los pocillos, y después se incubó a 37 °C durante 1 hora. La placa se lavó dos veces con Tween/PBS al 0,05%. 25

Se añadieron a los pocillos cincuenta μ L de la solución de lectina marcada con biotina preparada a 1 μ g/mL con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS y, a continuación, se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 50 μ L de la solución de estreptavidina marcada con HRP (1 μ g/mL) 30 diluida con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y después se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar tres veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 μ L de sustrato cromogénico de HRP (nombre del producto: TMB Peroxidase substrate system, KPL), y después se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Para detener la reacción, se añadieron 50 μ L de fosfato 1 M. La absorbancia a 450 nm se midió en el lector de placas POWERSCAN^(R) HT (DS PHARMA).

35 A los valores de absorbancia a 450 nm se les sustrajo el valor de la absorbancia del pocillo de la placa en que no se inmovilizó ninguna glicoproteína, y los valores resultantes se tomaron como valores de reacción. La afinidad se ordenó clasificando los valores de reacción de acuerdo con los siguientes criterios. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Alta: 0,5 o más,

Moderada: 0,2 a 0,5,

40 Baja: 0,1 a 0,2,

No unido: 0 a 0,1.

Tabla 2

Proteína	Información sobre los carbohidratos	Especies de lectina				
		Lectina de <i>Pholiota terrestris Overholts</i>	Lectina de <i>Lens culinaris</i>	Lectina de <i>Aleuria aurantia</i>	Lectina de <i>Lotus japonicus</i>	Lectina de <i>Ulex europaeus</i>
		PTL	LCA	AAL	Lotus	UEA-1
Seroalbúmina humana (HAS)	Sin cadena de azúcar	No unido	No unido	Baja	No unido	No unido
Inmunoglobulina G (IgG)	N-glicano con fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	Baja	No unido	Baja	No unido	No unido
Transferrina (TF)	N-glicano que no incluye L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	No unido	No unido	Baja	No unido	No unido
Fibrinógeno (FB)	N-glicano que no incluye L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	No unido	No unido	Baja	No unido	No unido
Inmunoglobulina A (IgA)	N-glicano con fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	Moderada	No unido	Moderada	No unido	No unido
$\alpha 2$ -Macroglobulina ($\alpha 2$ MG)	N-glicano con fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	Moderada	No unido	Alta	No unido	No unido
Inmunoglobulina M (IgM)	N-glicano con fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	Baja	No unido	Moderada	No unido	No unido
Complemento C3 (C3)	Con cadenas de azúcar, detalles desconocidos	No unido	No unido	Baja	No unido	No unido
Haptoglobina (HP)	N-glicano y O-glicano con casi nada de fucosa	No unido	No unido	Baja	No unido	No unido
$\alpha 1$ -Glicoproteína ácida (AGP)	N-glicano que no incluye L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	No unido	No unido	Moderada	No unido	No unido
α -fetoproteína (AFP)	N-glicano que no contiene fucosa	No unido	No unido	Moderada	No unido	No unido
α -fetoproteína (AFP-L3)	N-glicano con fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	Alta	Alta	Alta	No unido	No unido
Antígeno prostático específico (PSA)	Cadena de azúcar con fucosa	Alta	No unido	Moderada	No unido	No unido

5 La PTL tenía afinidad por α -fetoproteína L3 (AFP-L3) y antígeno prostático específico (PSA) que contienen fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, mientras que no mostró afinidad por la haptoglobina que esencialmente no tiene fucosa. La LCA muestra afinidad sólo por la AFP-L3. La AAL muestra afinidad por muchas proteínas fucosiladas, como IgA y $\alpha 2$ MG. Tiene un modo de unión similar al de la PTL, aunque a menudo muestra una absorción no específica significativa. La Lotus y la UEA-I tienen una baja afinidad por las glicoproteínas en el suero.

10 Tomando en conjunto estos resultados, LCA, Lotus y UEA-I conocidas previamente por tener afinidad por la fucosa también pueden no ser capaces de detectar las glicoproteínas que tienen una cadena azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Además, la AAL también detecta glicoproteínas distintas a las que tienen una cadena azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Por otro lado, la PTL tiene afinidad sólo por glicoproteínas que tienen una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

Ejemplo 1: Detección de la haptoglobina patológica en el sobrenadante de un cultivo de una línea celular de cáncer de páncreas por ELISA utilizando PTL

15 El ejemplo de Referencia 1 reveló que la PTL no tenía afinidad por la haptoglobina. Por lo tanto, se evaluó por ELISA la capacidad de PTL para detectar haptoglobina extraída del sobrenadante de un cultivo de una línea celular de cáncer de páncreas (PSN-1, disponible de DS PHARMA) y haptoglobina extraída de suero humano (disponible de

BIODESIGN) como control negativo, respectivamente. Pruebas similares a las de PTL también se realizaron para LCA y AAL como control positivo.

La extracción de haptoglobina a partir de células de cáncer de páncreas

5 Se concentraron mil mL del sobrenadante del cultivo de la línea celular de cáncer de páncreas a 1 mL con un filtro de ultrafiltración (Nombre del producto: VIVA SPIN 20-10 K, SARTORIUS). Se añadió la solución concentrada anterior al gel (Sephacrose 4 Fast Flow NHS-activado (GE healthcare)) en el que el anticuerpo anti-haptoglobina (The Binding Site) fue pre-inmovilizado. Una hora después de mezclarla cada 10 minutos a temperatura ambiente, la solución que contenía el gel se añadió a un tubo de filtración de 0,45 µm (Millipore), a continuación se centrifugó a 400 x g a temperatura de 4 °C durante 5 minutos, y seguidamente se desechó el filtrado. A continuación, se añadieron 200 µL de PBS, y después se centrifugó a 400 x g a temperatura de 4 °C durante 5 minutos, y seguidamente se desechó el filtrado. Esto se repitió dos veces. Después, se añadieron 200 µL de tampón de elución (glicina 100 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0) y, a continuación, se centrifugó a 400 x g a temperatura de 4 °C durante 5 minutos, y se recolectó el filtrado. Esto se repitió dos veces. Después de neutralizar la solución de haptoglobina (HP) obtenida por la combinación de estas soluciones con NaOH 3N, se añadieron 600 µL de PBS.

15 La cuantificación de haptoglobina por ELISA

La cantidad de haptoglobina contenida en la solución de HP se cuantificó por ELISA como sigue. Se disolvió haptoglobina de suero humano (BIODESIGN) en BSA 1%/PBS a de 0 a 200 ng/mL, que se utilizaron como soluciones estándar de haptoglobina. El anticuerpo anti-haptoglobina monoclonal de ratón (Nippon Biotest Laboratories Inc.) se diluyó 10.000 veces con tampón carbonato 0,1 M (pH 9,5). Se añadieron cincuenta µL de la solución diluida a una placa de microtitulación (Nunc), y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar una vez con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 200 µL de BSA 1%/PBS a los pocillos, y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 µL de la solución estándar de haptoglobina o de la solución de HP, y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 50 µL de una solución de un anticuerpo anti-haptoglobina policlonal de oveja (The Binding Site) convenientemente diluido con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 µL de una solución de un anticuerpo IgG anti-oveja marcado con HRP (Millipore) convenientemente diluido con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar tres veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 µL de sustrato cromogénico de HRP (Nombre del producto: TMB Peroxidase substrate system, KPL), y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para detener la reacción, se añadieron 50 µL de fosfato 1 M. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Nombre del producto: POWERSCAN^(R) HT, DS PHARMA).

Se creó una curva de calibración a partir de la absorbancia de las soluciones de haptoglobina estándar, a partir de la cual se calculó la concentración de haptoglobina en la solución de HP derivada de células de cáncer de páncreas.

La reacción de la PTL con haptoglobina patológica

35 La haptoglobina patológica contenida en la solución de HP se detectó por ELISA como sigue. Se diluyó la solución de HP obtenida anteriormente con tampón carbonato 0,1 M (pH 9,5) de manera que la haptoglobina fuera 10 ng/mL (la solución HP diluida). Del mismo modo, también se preparó la haptoglobina del suero humano (BIODESIGN) a 10 ng/mL como control negativo (la solución de haptoglobina derivada de suero humano). Se añadieron 50 µL de la solución HP diluida y la solución de haptoglobina derivada de suero humano en una placa de microtitulación (Nunc), y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar una vez con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 200 µL de BSA 1%/PBS, y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 50 µL de la solución de PTL marcada con biotina convenientemente diluida con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 50 µL de la solución de estreptavidina marcada con HRP (1 µg/mL) diluida con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar tres veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 µL de sustrato cromogénico de HRP (Nombre del producto: TMB Peroxidase substrate system, KPL), y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para detener la reacción, se añadieron 50 µL de fosfato 1M. La absorbancia a 450 nm se midió en un lector de placas (nombre del producto: POWERSCAN^(R) HT, DS PHARMA).

A efectos comparativos, también se llevaron a cabo ensayos similares en los que se utilizaron LCA y AAL en lugar de PTL.

5 A los valores de absorbancia a 450 nm se les sustrajo el valor de la absorbancia del pocillo de la placa en que no se inmovilizó ninguna glicoproteína, y los valores resultantes se tomaron como valores de reacción. Los valores de reacción de haptoglobina de suero humano y de células de cáncer de páncreas se muestran en las Figs. 5-7.

10 Como se muestra en las Figs. 5-7, la PTL no tiene afinidad por la haptoglobina de suero humano. Sin embargo, tiene afinidad por la haptoglobina del sobrenadante del cultivo de células de cáncer de páncreas. Para la LCA, la afinidad es baja tanto para la haptoglobina de células de cáncer de páncreas como para la del suero humano. La AAL también puede detectar la diferencia entre ellas, aunque su relación relativa es menor que la de PTL. De los resultados anteriores, es evidente que el cáncer de páncreas puede ser detectado dejando que la PTL, una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, actúe sobre la haptoglobina de células de cáncer de páncreas.

Ejemplo 2: Detección de la haptoglobina patológica en el suero de pacientes con cáncer de páncreas mediante ELISA utilizando la PTL

15 De acuerdo con el Ejemplo 1, es evidente que la haptoglobina patológica como marcador tumoral de cáncer de páncreas puede ser detectada mediante el uso de la PTL, una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. De acuerdo con ello, se evaluó por ELISA la capacidad de la PTL para detectar la haptoglobina patológica en el suero de los siguientes individuos, respectivamente: sujetos sanos ($n = 9$, 6 varones, 3 mujeres, edad media: 32,8) (abreviatura: sano 1-9),
20 pacientes con cáncer de páncreas ($n = 8$, 4 hombres, 4 mujeres, edad media: 52,1) (abreviatura: cáncer de páncreas 1-8) y pacientes con pancreatitis ($n = 4$, 1 hombre, 3 mujeres, edad media: 59,5) (abreviatura: pancreatitis 1-4). A efectos comparativos, también se llevaron a cabo pruebas similares a la PTL con AAL.

Extracción de haptoglobina a partir de suero

25 Se diluyeron con 190 μL de PBS diez μL de muestras de suero de los sujetos sanos, de los pacientes con cáncer de páncreas y de los pacientes con pancreatitis. Las soluciones de suero diluidas se añadieron al gel con anticuerpo anti-haptoglobina (The Binding Site) inmovilizado. Se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora mezclando cada 10 minutos. La solución que contenía el gel se añadió a un tubo de filtración de 0,45 μL (Millipore) y, a continuación, se centrifugó a 400 x g a 4 °C durante 5 minutos, y se desechó el filtrado. A continuación, se añadieron 200 μL de PBS, y seguidamente se centrifugó a 400 x g a 4 °C durante 5 minutos, y se desechó el filtrado. Esto se repitió dos veces.
30 A continuación, se añadieron 200 μL de tampón de elución (glicina 100 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0), y después se centrifugó a 400 x g a temperatura de 4 °C durante 5 minutos, y se recolectó el filtrado. Esto se repitió dos veces. Los filtrados obtenidos se combinaron y se tomaron como la solución de HP, y se neutralizó con NaOH 3N, y después se añadieron 600 μL de PBS.

Detección de haptoglobina patológica por ELISA

35 La haptoglobina patológica contenida en la solución de HP fue detectada por ELISA como sigue. Primero, la solución de HP obtenida anteriormente se diluyó 10 veces con tampón carbonato 0,1 M (pH 9,5). Se añadieron cincuenta μL de la solución diluida a una placa de microtitulación (Nunc), y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar una vez con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 200 μL de BSA 1%/PBS, y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 50 μL de la solución de lectina marcada con biotina convenientemente diluida con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 50 μL de una solución de estreptavidina marcada con HRP (1 mg/mL) diluida con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar tres veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 μL de sustrato cromogénico de HRP (Nombre del producto: TMB Peroxidase substrate system, KPL), y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para detener la reacción, se añadieron 50 μL de fosfato 1 M. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Nombre del producto: POWERSCAN^(R) HT, DS PHARMA).

45 A los valores de absorbancia a 450 nm se les sustrajo el valor de la absorbancia del pocillo de la placa en que no se inmovilizó ninguna glicoproteína, y los valores resultantes se tomaron como valores de reacción. Los resultados se muestran en las Figs. 8 y 9.

5 Como se muestra en las Figs. 8 y 9, los valores de reacción con la haptoglobina patológica por PTL muestran distintivamente valores más altos solamente para los sueros de los pacientes con cáncer de páncreas respecto a los sueros de los sujetos sanos y los de los pacientes con pancreatitis. La AAL fue capaz de detectar la diferencia entre los individuos sanos y los pacientes con cáncer de páncreas, mientras para algunos pacientes también detectó valores de reacción inferiores a los de los sujetos sanos.

Cuantificación de CA 19-9 por ELISA

10 La cuantificación del marcador tumoral CA 19-9 contenido en el suero de sujetos sanos, pacientes con cáncer de páncreas y pacientes con pancreatitis se realizó mediante ELISA como sigue. Se utilizó Lyphochek Tumor Marker Control (BIO-RAD) como muestra estándar. Se diluyó anticuerpo anti-CA 19-9 monoclonal de ratón (Fitzgerald) 1000 veces con tampón carbonato 0,1 M (pH 9,5). Se añadieron cincuenta μ L de la solución diluida a una placa de microtitulación (Nunc), y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar una vez con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 200 μ L de BSA 1%/PBS, y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 μ L de cada suero y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

15 Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron a los pocillos 50 μ L de una solución de un anticuerpo anti-CA 19-9 policlonal de conejo (Acris) convenientemente diluido con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 μ L de una solución de un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con HRP (Nippon Chemi-Con Corporation) convenientemente diluido con BSA 1%/Tween 0,05%/PBS, y se dejó a 37 °C durante 30 minutos. Después de lavar tres veces con Tween 0,05%/PBS, se añadieron 50 μ L de sustrato cromogénico de HRP (Nombre del producto: TMB Peroxidase substrate system, KPL),
20 y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para detener la reacción, se añadieron 50 μ L de fosfato 1 M. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Nombre del producto: POWERSCAN^(R) HT, DS PHARMA).

Se creó una curva de calibración a partir de los valores de reacción de la muestra estándar, a partir de la cual se calcularon las concentraciones de CA 19-9 en cada uno de los sueros. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y la Fig. 10.

25

Tabla 3

Muestra	La cantidad de CA 19-9 (U/mL)
Sano 1	28,6
Sano 2	19,1
Sano 3	6,5
Sano 4	9,5
Sano 5	20,5
Sano 6	23,9
Sano 7	21,2
Sano 8	22,0
Sano 9	24,3
Cáncer de páncreas 1	56,3
Cáncer de páncreas 2	42,6
Cáncer de páncreas 3	46,8
Cáncer de páncreas 4	41,6
Cáncer de páncreas 5	43,5
Cáncer de páncreas 6	68,4
Cáncer de páncreas 7	45,8
Cáncer de páncreas 8	52,3

Pancreatitis 1	35,1
Pancreatitis 2	37,0
Pancreatitis 3	39,0
Pancreatitis 4	35,7

5 Como se muestra en la Fig. 10, la cantidad de CA 19-9 en el suero de los sujetos sanos, los pacientes con cáncer de páncreas y los pacientes con pancreatitis muestra valores claramente más elevados tanto para los sueros de los pacientes con pancreatitis como para los de los pacientes con cáncer de páncreas respecto a los sueros de los sujetos sanos. Por lo tanto, es evidente que distinguir el cáncer de páncreas de la pancreatitis es difícil mediante la detección solamente del CA 19-9.

Por otro lado, como se muestra en las Figs. 8 y 10, un paciente con cáncer de páncreas y un paciente con pancreatitis pueden distinguirse mediante la detección de la haptoglobina patológica usando una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ en un individuo que tenga una cantidad de CA 19-9 superior a la de un individuo sano.

10 La cantidad de haptoglobina también se midió usando el anticuerpo anti-haptoglobina en lugar de la lectina. Los valores relativos, que se normalizan de tal manera que el valor de reacción (absorbancia) para Sano 1 se fijara en 1, se muestran como la cantidad relativa de haptoglobina (Cantidad relativa de HP) en la Fig. 11. Además, se calculó la "absorbancia/Cantidad relativa de HP " dividiendo los valores de reacción (absorbancia) en las Figs. 8 y 9 por la Cantidad relativa de HP. La "Absorbancia/Cantidad relativa de HP" significa el grado relativo de fucosilación de la haptoglobina en cada muestra. Los resultados se muestran en las Figs. 12 y 13.

15 Como se muestra en las Figs. 12 y 13, está claro que la PTL puede detectar con más precisión que las lectinas convencionales los cambios en las cadenas de azúcar de la haptoglobina cuando una célula normal se convierte en una célula de cáncer de páncreas. Se espera que la Absorbancia/Cantidad relativa de HP sea un indicador de la fase clínica del cáncer de páncreas, ya que también representa el grado de fucosilación de haptoglobina. Por lo tanto, el 20 cáncer de páncreas se puede detectar también por la cantidad de haptoglobina patológica por haptoglobina, detectada usando una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

A partir de los resultados anteriores, es evidente que el cáncer de páncreas puede ser detectado midiendo la haptoglobina patológica utilizando la PTL. En el proceso de cancerización de una célula normal a una célula de cáncer 25 de páncreas, la PTL puede detectar la haptoglobina patológica como marcador tumoral, con más exactitud que las lectinas específicas de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ conocidas previamente. Debido a su alta especificidad, la PTL puede fácilmente detectar un compuesto objetivo de cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, en una mezcla de un compuesto de cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y otros compuestos de cadena de azúcar con mayor precisión que las otras lectinas. Además, el cáncer de páncreas puede ser discriminado de la pancreatitis mediante la combinación de la 30 detección de la haptoglobina patológica usando la PTL y la detección de otro marcador tumoral, el CA 19-9, que muestra un valor más alto en un individuo con enfermedad pancreática que en un individuo sano. Se puede emplear para un reactivo de diagnóstico o un kit de reactivo de diagnóstico para el cáncer de páncreas o la pancreatitis, basándose el reactivo o el kit en la interacción entre la PTL y una cadena de azúcar.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> J-OIL MILLS, INC.
- <120> Método para detectar el cáncer de páncreas
- <130> NP2167
- 40 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.1
- 45 <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
<223> parte común de las secuencias No.2 a No.5
- 5 <220>
<221> MISC_FEATURES
<222> (4)..(4)
<223> x representa Asp/Asn/Glu/Thr.
- 10 <220>
<221> MISC_FEATURES
<222> (5)..(5)
<223> x representa Thr/Ser/Ala.
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURES
<222> (6)..(6)
<223> x representa Tyr/Phe.
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURES
<222> (7)..(7)
<223> x representa Gln/Lys/Glu.
- 25 <400> 1

Cys Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
1 5

- <210> 2
<211> 40
30 <212> PRT
<213> Pholiota terrestris Overholts
- <220>
<221> MISC_FEATURES
35 <222> (10)..(10)
<223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.
- <220>
<221> MISC_FEATURES
40 <222> (17)..(17)
<223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.
- <220>
<221> MISC_FEATURES
45 <222> (20)..(20)
<223> x representa Tyr/Ser.
- <220>
<221> MISC_FEATURES
50 <222> (23)..(23)
<223> x representa Phe/Tyr.
- <220>
<221> MISC_FEATURES
55 <222> (27)..(27)
<223> x representa Arg/Lys/Asn.
- <220>
<221> MISC_FEATURES
60 <222> (33)..(33)
<223> x representa Asp/Gly/Ser.
- <220>

- <221> MISC_FEATURES
 <222> (35)..(35)
 <223> x representa Asn/Ala.
- 5 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (39)..(39)
 <223> x representa Thr/Gln.
- 10 <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ala | Pro | Val | Pro | Val | Thr | Lys | Leu | Val | Xaa | Asp | Gly | Asp | Thr | Tyr | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
-
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Xaa | Thr | Ala | Xaa | Leu | Asp | Xaa | Gly | Asp | Gly | Xaa | Trp | Val | Ala | Gln | Thr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
-
- | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Xaa | Thr | Xaa | Val | Phe | His | Xaa | Gly |
| | | 35 | | | | | 40 |
- <210> 3
 <211> 39
- 15 <212> PRT
 <213> Stropharia rugosoannulata Farlow in Murr.
- <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (4)..(4)
 <223> x representa Pro/Gly.
- 20 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (7)..(7)
 <223> x representa Glu/Lys.
- 25 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (9)..(9)
 <223> x representa Val/Asp.
- 30 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (10)..(10)
 <223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.
- 35 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (13)..(13)
 <223> x representa Asn/Asp/Glu.
- 40 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (17)..(17)
 <223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.
- 45 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (20)..(20)
 <223> x representa His/Ser.
- 50 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (27)..(27)
 <223> x representa Lys/His.
- 55

5 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (29)..(29)
 <223> x representa Val/Ile.

10 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (33)..(33)
 <223> x representa Gly/Asn/Ser.

15 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (34)..(34)
 <223> x representa Ala/Thr.

20 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (39)..(39)
 <223> x representa Arg/Thr.

<400> 3

Ala Pro Val Xaa Val Tyr Xaa Leu Xaa Xaa Asp Gly Xaa Ser Thr Lys
1 5 10 15

Xaa Thr Ala Xaa Leu Asp Tyr Gly Asp Gly Xaa Trp Xaa Ala Gln Trp
20 25 30

Xaa Xaa Asn Val Phe His Xaa
35

25 <210> 4
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Lepista sordida (Schum. : Fr.) Sing.

30 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (1)..(1)
 <223> x representa Ala/Gln.

35 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (4)..(4)
 <223> x representa Pro/Lys.

40 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (7)..(7)
 <223> x representa Ala/ser.

45 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (8)..(8)
 <223> x representa Met/Ile/Val.

50 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (9)..(9)
 <223> x representa Tyr/Thr.

55 <220>

<221> MISC_FEATURES
 <222> (10)..(10)
 <223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.

5 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (13)..(13)
 <223> x representa Asp/Asn.

10 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (16)..(16)
 <223> x representa Lys/Glu.

15 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (17)..(17)
 <223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.

20 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (20)..(20)
 <223> x representa Ala/Asn.

25 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (22)..(22)
 <223> x representa Val/Asp/Asn.

30 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (25)..(25)
 <223> x representa Asp/Asn.

35 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (27)..(27)
 <223> x representa Arg/His/Asn.

40 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (31)..(31)
 <223> x representa Gln/Arg.

45 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (34)..(34)
 <223> x representa Thr/Val.

50 <400> 4

Xaa Asp Val Xaa Val Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gly Xaa Thr Tyr Xaa
1 5 10 15

Xaa Thr Ala Xaa Leu Xaa Tyr Gly Xaa Gly Xaa Trp Val Ala Xaa Trp
20 25 30

Ser Xaa Ala Val Phe His Gln Ser
35 40

55 <210> 5
 <211> 39
 <212> PRT

<213> Naematoloma sublateritium (Fr.) Karst/Hypholoma sublateritium(Fr.)Quel

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 5 <222> (10)..(10)
 <223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 10 <222> (13)..(13)
 <223> x representa Asp/Thr.

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 15 <222> (14)..(14)
 <223> x representa Ser/Ala.

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 20 <222> 16)..(16)
 <223> x representa Gln/Lys.

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 25 <222> (17)..(17)
 <223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.

<400> 5

Ala Pro Val Pro Val Thr Lys Leu Val Xaa Asp Gly Xaa Xaa Phe Xaa
1 5 10 15

Xaa Thr Ala Asn Leu Asp Phe Gly Asp Gly Asn Trp Val Ala Gln Trp
20 25 30

Ser Thr Asn Val Phe His Asn
35

<210> 6
 <211> 40
 <212> PRT
 35 <213> Naematoloma sublateritium (Fr.) Karst/Hypholoma sublateritium(Fr.)Quel

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 40 <222> (10)..(10)
 <223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 45 <222> (14)..(14)
 <223> x representa Asp/Thr.

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 50 <222> 15)..(15)
 <223> x representa Ser/Ala.

<220>
 <221> MISC_FEATURES
 55 <222> (17)..(17)
 <223> x representa Gln/Lys.

<220>

<221> MISC_FEATURES

<222> (18)..(18)

<223> x representa cualquier aminoácido, preferiblemente Cys.

5

<400> 6

Ala Pro Val Pro Val Thr Lys Leu Val Xaa Asp Asp Gly Xaa Xaa Phe
 1 5 10 15

Xaa Xaa Thr Ala Asn Leu Asp Phe Gly Asp Gly Asn Trp Val Ala Gln
 20 25 30

Trp Ser Thr Asn Val Phe His Asn
 35 40

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar el cáncer de páncreas, que comprende las etapas de:
- 5 1) poner en contacto una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una muestra que se ha obtenido de un cuerpo vivo con el fin de dejarse actuar sobre la haptoglobina patológica presente en la muestra y obtener un complejo lectina-haptoglobina patológica, donde dicha lectina:
- (1) es extraída de basidiomicetos,
- (2) tiene un peso molecular de 4.000 a 40.000 determinado por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS,
- 10 (3) tiene afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C , y
- (4) tiene una constante de unión de $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor para una cadena de azúcar de alto contenido en manosa y/o un glicolípido que no contiene una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y
- 2) determinar el complejo lectina-haptoglobina patológica para detectar la existencia del cáncer de páncreas.
- 15 2. El método para detectar cáncer de páncreas según la Reivindicación 1, en donde dicho basidiomiceto pertenece a Strophariaceae, Tricholomataceae, Amanitaceae o Polyporaceae.
3. El método para detectar cáncer de páncreas según la Reivindicación 2, en donde dicho basidiomiceto es *Pholiota terrestris Overholts*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota aurivella*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateritium*, *Lepista sordida* o *Amanita muscaria*.
- 20 4. El método para detectar cáncer de páncreas según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha muestra es suero o plasma humano.
5. El método para detectar cáncer de páncreas según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde la haptoglobina patológica se detecta usando dicha lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, y una o más lectinas o anticuerpos.
- 25 6. El método para detectar cáncer de páncreas según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde la haptoglobina patológica se detecta mediante un ensayo que usa dicha lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y anticuerpo anti-haptoglobina.
7. El método para detectar cáncer de páncreas, según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ está marcada.
- 30 8. Un método para distinguir cáncer de páncreas de pancreatitis, que comprende las etapas
- 1) poner en contacto una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una muestra que se ha obtenido de un cuerpo vivo que tiene 30 U/mL o más de marcador tumoral CA 19-9 en suero con el fin de dejarse actuar sobre la haptoglobina patológica presente en la muestra y obtener un complejo lectina-haptoglobina patológica, donde dicha lectina:
- 35 (1) es extraída de basidiomicetos,
- (2) tiene un peso molecular de 4.000 a 40.000 determinado por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS,
- (3) tiene afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C , y
- 40 (4) tiene una constante de unión de $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor para una cadena de azúcar de alto contenido en manosa y/o un glicolípido que no contiene una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y
- 2) determinar el complejo lectina-haptoglobina patológica para detectar la existencia del cáncer de páncreas.

9. El método según la Reivindicación 8, en donde dicho basidiomiceto pertenece a Strophariaceae, Tricholomataceae, Amanitaceae o Polyporaceae.
- 5 10. El método según la Reivindicación 9, en donde dicho basidiomiceto es *Pholiota terrestris* Overholts, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota aurivella*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateritium*, *Lepista sordida* o *Amanita muscaria*.
11. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 10, en donde dicha muestra es suero o plasma humano.
12. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 11, en donde la haptoglobina patológica se detecta usando dicha lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, y una o más lectinas o anticuerpos.
- 10 13. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 12, en donde la haptoglobina patológica se detecta mediante un ensayo que usa dicha lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y anticuerpo anti-haptoglobina.
14. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 13, en donde dicha lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ está marcada.
15. Un reactivo de diagnóstico o kit para detectar cáncer de páncreas y/o pancreatitis, que comprende una lectina específica de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, donde dicha lectina:
- 15 (1) es extraída de basidiomicetos,
- (2) tiene un peso molecular de 4.000 a 40.000 determinado por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS,
- (3) tiene afinidad por las cadenas de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una constante de unión de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor a 25°C , y
- 20 (4) tiene una constante de unión de $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor para una cadena de azúcar de alto contenido en manosa y/o un glicolípido que no contiene una cadena de azúcar de fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y, anticuerpo anti-haptoglobina.
16. El reactivo de diagnóstico o kit para detectar de cáncer de páncreas y/o pancreatitis según la Reivindicación 15, que además comprende anticuerpo anti-CA 19-9.

25

Figura 1

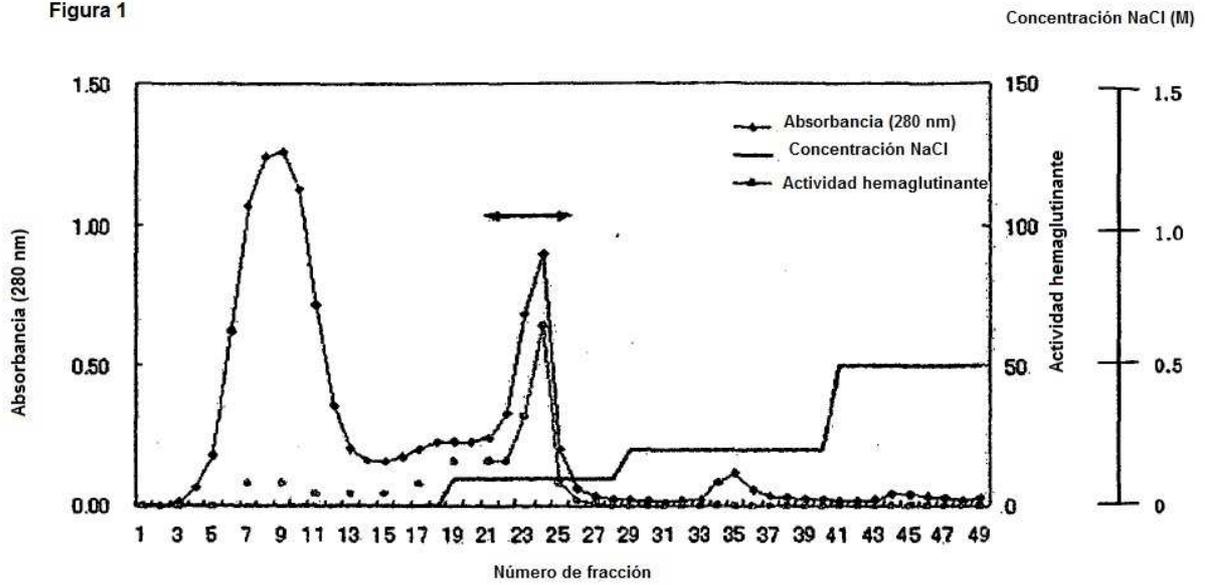


Figura 2

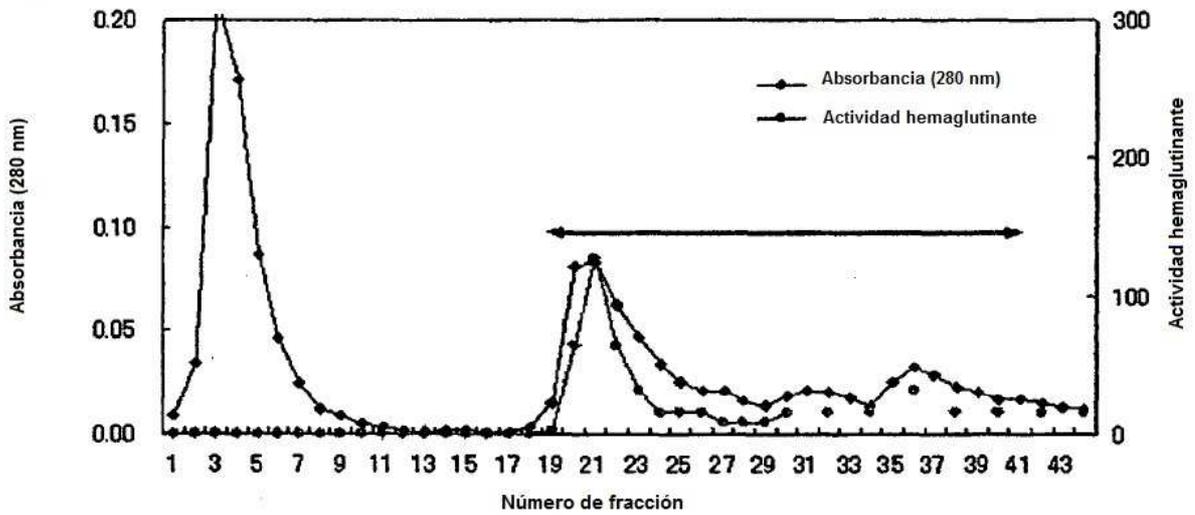


Figura 3

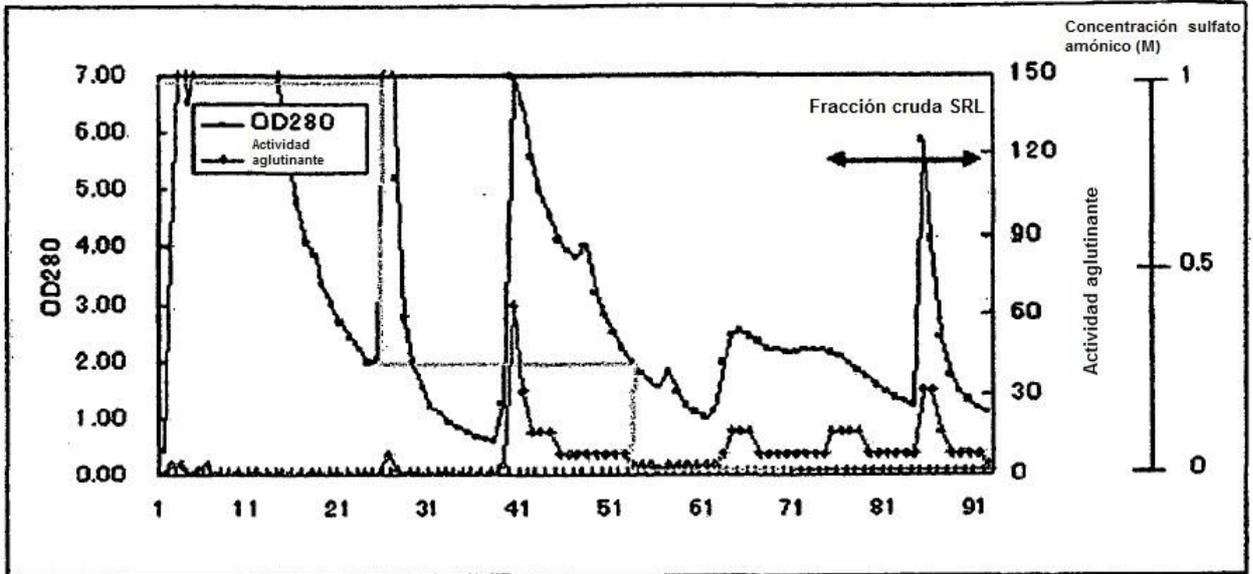


Figura 4

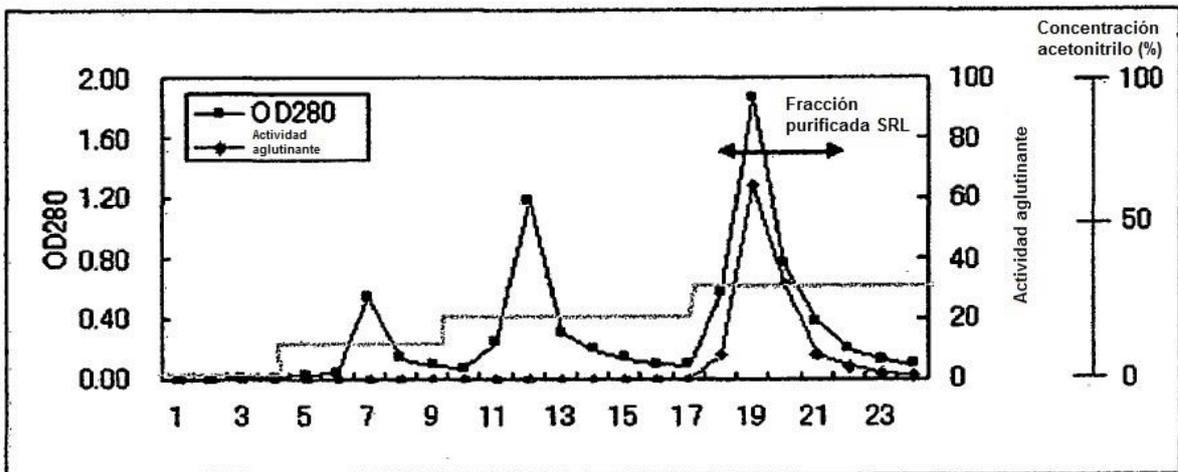


Figura 5

PTL

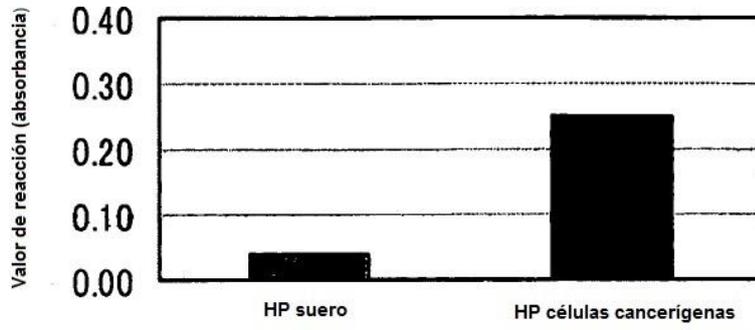


Figura 6

LCA

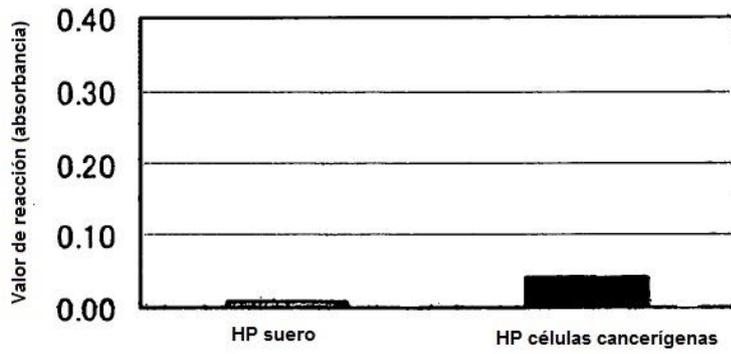


Figura 7

AAL

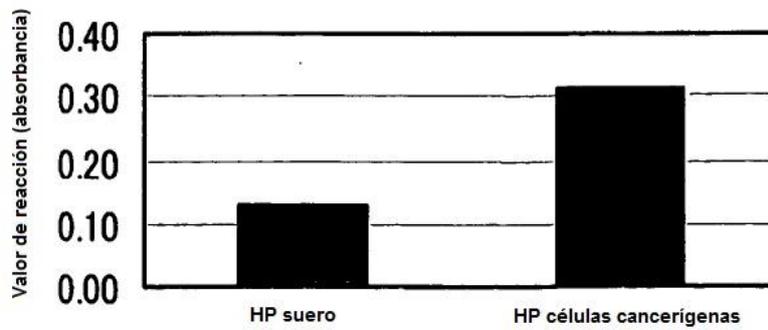


Figura 8

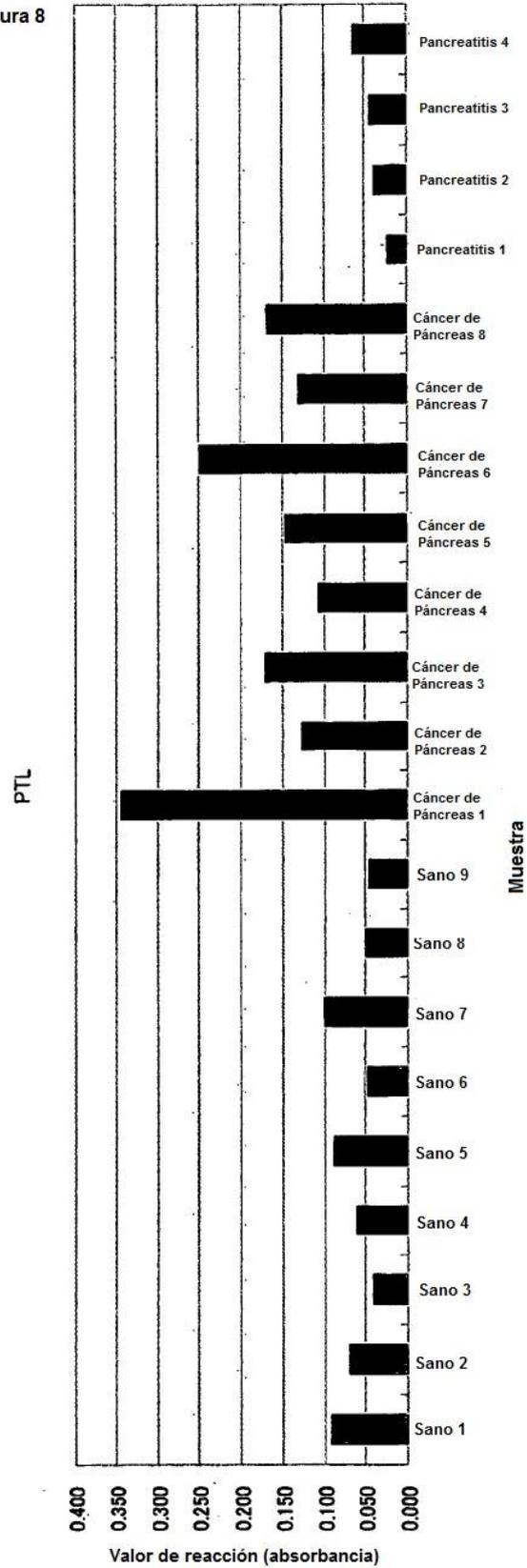


Figura 9

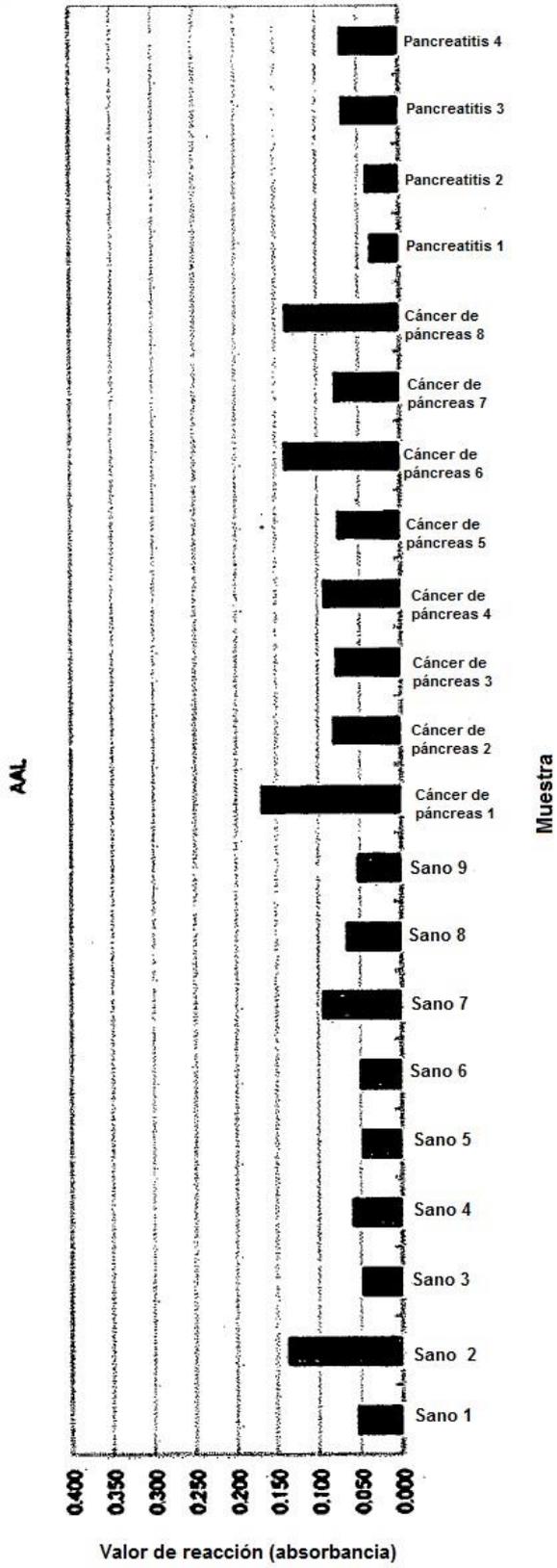


Figura 10

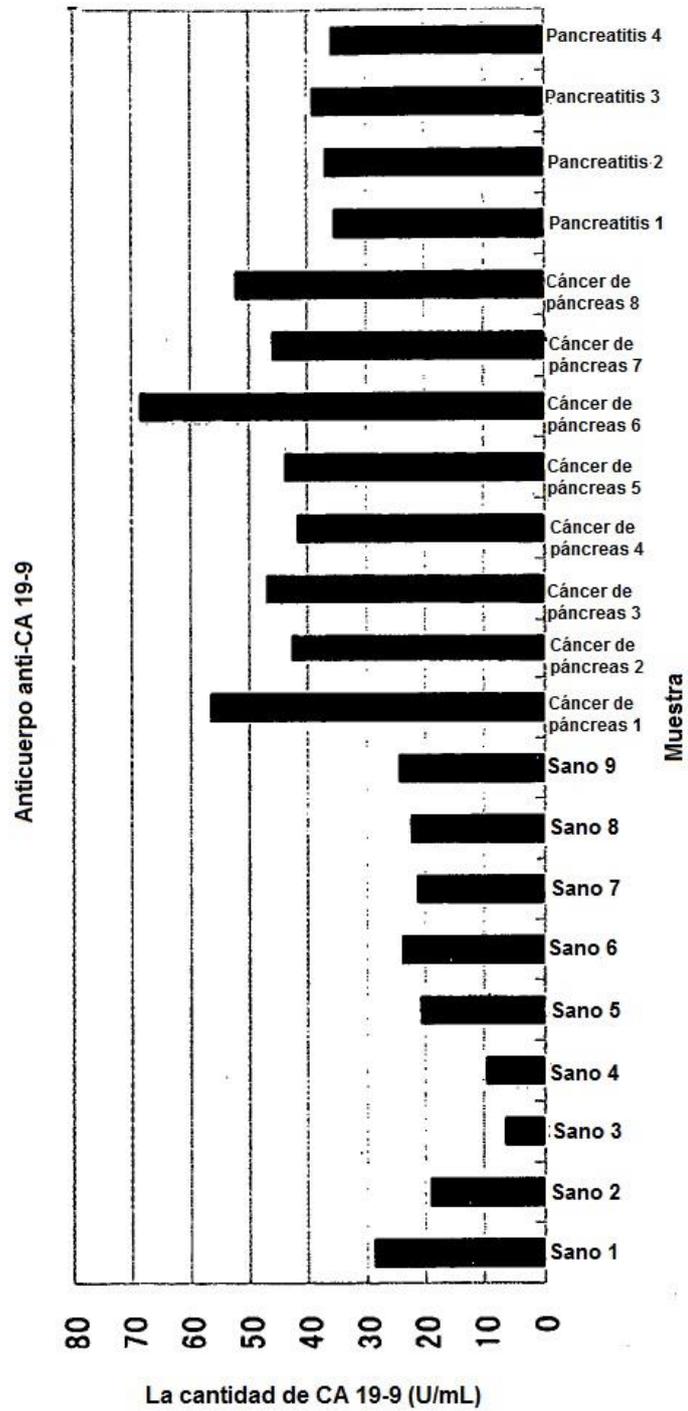


Figura 11

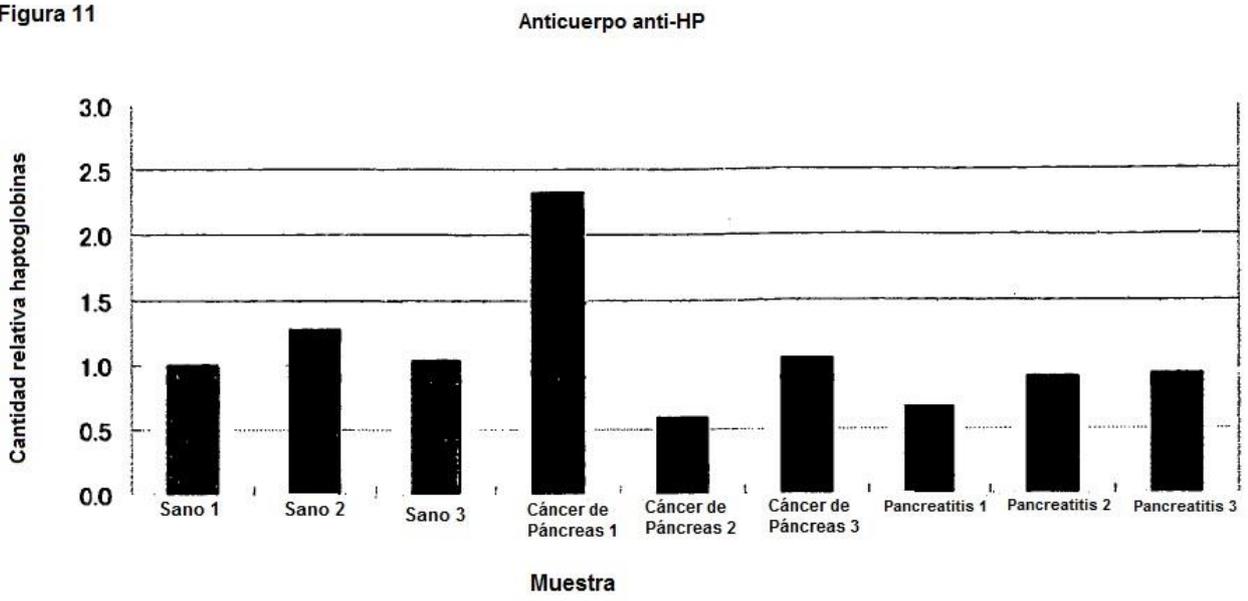


Figura 12

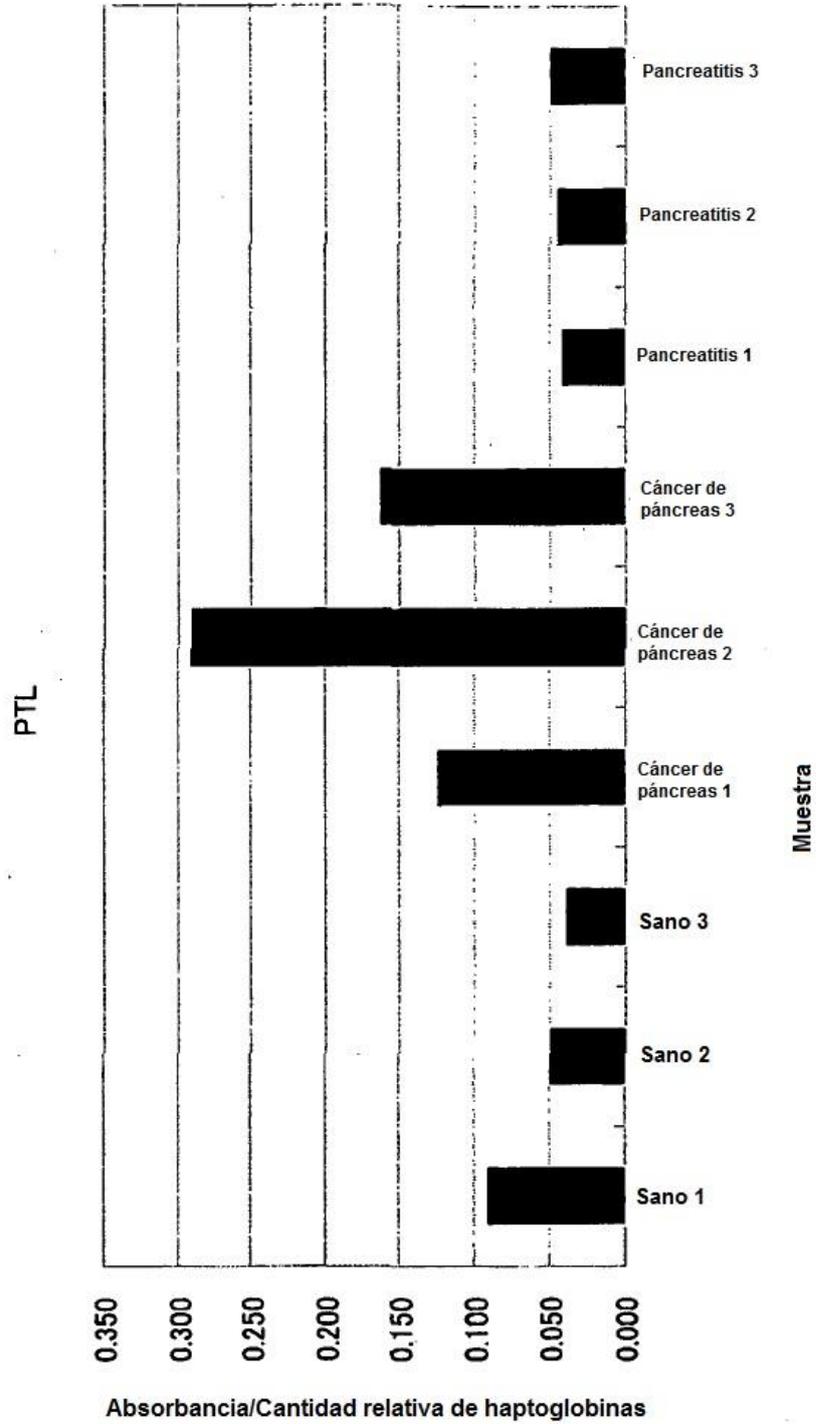


Figura 13

