

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 980**

51 Int. Cl.:

C07K 14/375 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 14/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2009** **PCT/JP2009/003346**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2010** **WO10010674**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009** **E 09800190 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016** **EP 2305704**

54 Título: **Lectina específica de L-fucosa α 1-6**

30 Prioridad:

22.07.2008 JP 2008188390

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

17.03.2017

73 Titular/es:

J-OIL MILLS, INC. (100.0%)

8-1, Akashi-cho Chuo-ku

Tokyo 104-0044, JP

72 Inventor/es:

KOBAYASHI, YUKA;

HIRABAYASHI, JUN;

TATENO, HIROAKI;

KAWAGISHI, HIROKAZU y

DOHRA, HIDEO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ LÓPEZ-MENCHERO , Álvaro Luis

ES 2 605 980 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

Lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una nueva lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, al método de fabricación de la misma y a su aplicación. En particular, la presente invención se refiere a una nueva lectina derivada de basidiomicetos o ascomicetos, al método de fabricación de la misma y a un método para la detección y fraccionamiento de una cadena de azúcar usando la lectina.

Técnica antecedente

Se sabe que el gen de una $\alpha 1 \rightarrow 6$ fucosiltransferasa (FUT8), que transfiere un resto de L-fucosa a la N-acetilglucosamina del extremo reductor del N-glicano a través de un enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$ para formar la fucosilación del núcleo (core-fucosilación), se expresa en relación con la canceración de los hepatocitos. El carcinoma hepatocelular actualmente se detecta por electroforesis de afinidad de lectina usando aglutinina de *Lens culinaris* (LCA) que tiene afinidad por N-glicanos mono- y biantenares core-fucosilados.

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (denominada en lo sucesivo actividad ADCC, por sus siglas en inglés) es una de las funciones inmunitarias que poseen los seres humanos. La actividad ADCC es una actividad a través de la cual los leucocitos, tales como las células asesinas naturales y los monocitos, destruyen a células diana tales como células cancerosas a través de los anticuerpos. La actividad ADCC tiene relación con el mecanismo antitumoral ejercido por fármacos de anticuerpo tales como Herceptin, como ejemplo de anticuerpo humanizado (un agente terapéutico para el cáncer de mama metastásico) y Rituxan, como ejemplo de anticuerpo quimérico (un agente terapéutico para el linfoma no Hodgkin) (Publicación No de patente 1) contra tumores. Cuando estos fármacos de anticuerpo tienen una baja actividad ADCC, se necesita administrar una alta cantidad del fármaco de anticuerpo, lo cual, como consecuencia, causa problemas tales como un mayor coste y efectos secundarios (por ejemplo, infección debida a un compromiso inmunitario).

La actividad ADCC es diferente, con una diferencia de 50 a 100 veces, entre un anticuerpo al que se le transfiere L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y un anticuerpo al que no se le transfiere L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (Publicación No de patente 2). Si puede obtenerse un anticuerpo al que no se le transfiere L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, puede proporcionarse la preparación del anticuerpo que tiene una alta actividad ADCC.

Convencionalmente, además de LCA, se conocen otras lectinas que se unen a la core-fucosa, tales como aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), lectina de *Aleuria aurantia* (AAL), aglutinina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA), aglutinina de *Vicia faba* (VFA) y lectina de *Aspergillus oryzae* (AOL), por ejemplo (Publicaciones de Patente 1 a 5).

Una lectina fúngica reconoce L-fucosa unida por un enlace $\alpha(1-6)$ que comprende la secuencia DPVNVKKLQCDGDTYKCTADLDFGDGR (Publicación No de patente 3).

Publicación No de patente 1: Clynes RA *et al.*, Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. NATURE MED 2000 APR; 6(4): 443-446

Publicación No de patente 2: Toyohide Shinkawa *et al.*, The absence of L-fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetyl glucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem. 2003 Jan 31; 278(5): 3466-73. Epub 2002 Nov 8.

Publicación No de patente 3: Oda, Y., *et al.*, A new fungal lectin recognizing alpha (1-6)-linked fucose in the N-glycan, J. Biol. Chem., 2003, 278(34), p. 32439-47

Publicación de Patente 1: documento WO2002/030954

Publicación de Patente 2: documento WO2003/084569

Publicación de Patente 3: ejemplo de la Publicación de la Solicitud de Patente Japonesa No Examinada n.º H02-083337

Publicación de Patente 4: ejemplo 5 de la Publicación de la Solicitud de Patente Japonesa No Examinada n.º 2002-112786

Publicación de Patente 5: publicación de la Solicitud de Patente Japonesa No Examinada n.º 2007-161633

Divulgación de la invención

Las lectinas conocidas usadas para la detección de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ también tienen afinidad, no solo por la cadena de azúcar con enlace L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, sino también por una cadena de azúcar

glicolípida que tiene un enlace distinto de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar de alto contenido de manosa que no tiene L-fucosa. Específicamente, AAL y AOL también tienen afinidad por la L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 2$ y la L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 3$, por ejemplo. LCA, PSA y VFA específicas de manosa también tienen afinidad por N-glicanos mono- y diantennares no fucosilados. De esta manera, no ha sido posible la detección precisa de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y tampoco ha sido posible aislar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. No se conoce ninguna lectina que pueda unirse específicamente solo a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

En vista de lo anterior, un objetivo de la presente invención es proporcionar una nueva lectina que pueda unirse específicamente a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Esta invención puede proporcionar un método más preciso para la detección de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ usando la nueva lectina en comparación con un caso convencional, y un método para el fraccionamiento de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ basándose en la detección de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

Los presentes inventores han encontrado una nueva lectina que tiene una afinidad muy alta por una cadena de azúcar que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Los presentes inventores han descubierto que la nueva lectina puede detectar específicamente una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y que esta lectina puede usarse para la purificación de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ o una cadena de azúcar que no es L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$). La expresión "cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ " significa una estructura en la que la L-fucosa se une a la N-acetilglucosamina terminal reductora de un N-glicano por un enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$. La expresión "cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ " significa una cadena de azúcar que no tiene una L-fucosa unida por enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$ en las moléculas.

Específicamente, la presente invención proporciona una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que: (1) se extrae a partir de basidiomicetos o ascomicetos, (2) tiene un peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) de 4.000 a 40.000, y (3) tiene una afinidad por una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ representada por una constante de asociación de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor (a 25 °C). La constante de asociación en el presente documento significa un valor numérico que se mide por cromatografía de afinidad frontal (FAC) a una temperatura de análisis de 25 °C.

La cadena de azúcar L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede incluir un sialo N-glicano.

Además, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (4) preferentemente no está sustancialmente unida a cadenas de azúcar de alto contenido de manosa y/o glicolípidos que no incluyen cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

Además, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ preferentemente (5) tiene afinidad por N-glicanos mono-, di-, tri- y tetra-antennares $\alpha 1 \rightarrow 6$ fucosilados con una constante de asociación de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor (a 25 grados C).

A los basidiomicetos pertenecen, por ejemplo, *Strophariaceae*, *Tricholomataceae*, *Amanitaceae* o *Polyporaceae*.

Son basidiomicetos, por ejemplo, *Pholiota terrestris*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota adiposa*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateralium*, *Lepista sordida* o *Amanita muscaria*.

En particular, la secuencia de aminoácidos de la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (6) se muestra en la secuencia número 1.

La presente invención también proporciona la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que es (a) una proteína o péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de los números de secuencia 2 a 5 o (b) una proteína o péptido en el que uno o una pluralidad de aminoácidos se han delecionado, insertado o sustituido en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias con los números 2 a 5 y que es funcionalmente equivalente a una proteína o péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias con los números 2 a 5. La expresión "funcionalmente equivalente" significa una afinidad con una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ representada por una constante de asociación de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor (a 25 grados C).

La proteína o péptido mostrado en (b) tiene una secuencia de aminoácidos mostrada por una secuencia número 6, por ejemplo.

La presente invención también proporciona una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que es una proteína o péptido que tiene una homología de al menos un 37 % o mayor con una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias con los números 2 a 6 y que es funcionalmente equivalente a una proteína o péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias con los números 2 a 6.

La presente invención también proporciona un método para fabricar una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ mediante el cual un extracto en medio acuoso (extracto soluble en agua) de basidiomicetos y/o ascomicetos se aplica a (i) cromatografía hidrófoba y cromatografía de fase inversa, (ii) cromatografía de afinidad o (iii)

cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular, obteniéndose de esta manera una lectina que (vi) tiene un peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) de 4.000 a 40.000 y que (v) tiene una afinidad representada con una constante de asociación a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor (a 25 grados C).

Los basidiomicetos preferentemente se seleccionan entre al menos uno de *Strophariaceae*, *Tricholomataceae*, *Amanitaceae* y *Polyporaceae*.

El basidiomiceto, preferentemente, es al menos uno seleccionado entre *Pholiota terrestris*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota adiposa*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateritium*, *Lepista sordida* y *Amanita muscaria*.

Los basidiomicetos y/o ascomicetos usados en el método de fabricación de una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ preferentemente son carpóforos (cuerpos fructíferos).

La presente invención también proporciona un método para detectar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que incluye un proceso para hacer que una cadena de azúcar actúe sobre la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

La cadena de azúcar es un marcador tumoral, por ejemplo.

La presente invención también proporciona un método de fraccionamiento de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que incluye un proceso para hacer que una cadena de azúcar actúe sobre la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Específicamente, la invención proporciona un método para el fraccionamiento de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ mediante el uso de la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ inmovilizada.

La cadena de azúcar que actúa en el método de fraccionamiento, por ejemplo, está unida a un anticuerpo.

La presente invención también proporciona un agente de diagnóstico y un kit de agentes de diagnóstico para detectar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. El agente de diagnóstico incluye la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ como principio activo.

La nueva lectina de la presente invención tiene una afinidad mucho mayor que la convencional, con una constante de asociación de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor por una cadena de azúcar, glicopéptidos y glicoproteínas que tienen una L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Específicamente, solo puede reconocerse específicamente una cadena de azúcar que tiene una estructura de cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Usando esta especificidad, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede usarse en diversas aplicaciones, como se muestra más adelante.

A diferencia de una lectina convencional que tiene una afinidad por una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, la presente invención puede detectar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una especificidad más selectiva.

El método de fraccionamiento de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de la presente invención puede proporcionar, basándose en una identificación precisa de una L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, un fraccionamiento más estricto entre una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Como resultado, una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ o una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede purificarse con una alta pureza. En particular, mediante el uso del método de fraccionamiento de la presente invención para retirar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de la preparación de anticuerpo que consiste en una mezcla de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, el fármaco de anticuerpo puede tener una mayor actividad ADCC. Como resultado, la preparación de anticuerpo puede formularse en una dosificación reducida, consiguiéndose de esta manera de forma ventajosa, por ejemplo, un menor coste y menos efectos secundarios. Además, la preparación de anticuerpo también puede recetarse en función de un síntoma o un efecto secundario.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama estructural de un oligosacárido de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y un oligosacárido que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ usados en un ejemplo de trabajo y un ejemplo comparativo de la presente invención.

La Fig. 2 es un diagrama estructural de un oligosacárido de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y un oligosacárido que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ usados en un ejemplo de trabajo y un ejemplo comparativo de la presente invención.

La Fig. 3 ilustra el proceso de purificación de PTL del Ejemplo 1.

La Fig. 4 es un diagrama de elución de cromatografía de intercambio iónico de PTL del Ejemplo 1.

La Fig. 5 es un diagrama de elución de cromatografía de afinidad de PTL del Ejemplo 1.

La Fig. 6 ilustra el resultado de SDS-PAGE de PTL del Ejemplo 1 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

La Fig. 7 ilustra el proceso de purificación de SRL del Ejemplo 2.

La Fig. 8 es un diagrama de elución de cromatografía hidrófoba de SRL del Ejemplo 2.

La Fig. 9 es un diagrama de elución de cromatografía de fase inversa de SRL del Ejemplo 2.

La Fig. 10 ilustra el resultado de SDS-PAGE de SRL del Ejemplo 2 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

La Fig. 11 ilustra el resultado del espectro de MS de PTL del Ejemplo 1.

La Fig. 12 ilustra el resultado del espectro de MS de SRL del Ejemplo 2.

La Fig. 13 ilustra el resultado de la transferencia de Western usando PTL del Ejemplo 1 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

La Fig. 14 ilustra el resultado de una transferencia de Western usando SRL del Ejemplo 2 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

La Fig. 15 ilustra el resultado de una transferencia de Western usando AAL del Ejemplo comparativo 1 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

La Fig. 16 ilustra el resultado de una transferencia de Western usando AOL del Ejemplo comparativo 2 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

La Fig. 17 ilustra el resultado de una transferencia de Western usando LCA del Ejemplo comparativo 3 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

La Fig. 18 ilustra el resultado cuando se marcan solo proteínas por CBB como control (una fotografía como un sustituto de un dibujo).

La Fig. 19 ilustra el resultado de la detección de glicoproteínas por ELISA usando PTL del Ejemplo 1.

La Fig. 20 ilustra el resultado de la detección de glicoproteínas por ELISA usando SRL del Ejemplo 2.

La Fig. 21 ilustra el resultado de la detección de glicoproteínas por ELISA usando AAL del Ejemplo comparativo 1.

La Fig. 22 ilustra el resultado de la detección de glicoproteínas por ELISA usando AOL del Ejemplo comparativo 2.

La Fig. 23 ilustra el resultado de la detección de glicoproteínas por ELISA usando LCA del Ejemplo comparativo 3.

La Fig. 24 ilustra el resultado de detección de una diferencia en una cadena de azúcar entre α -fetoproteínas L1 y L3 por ELISA usando PTL del Ejemplo 1.

La Fig. 25 ilustra el resultado de detección de una diferencia en una cadena de azúcar entre las α -fetoproteínas L1 y L3 por ELISA usando el SRL del Ejemplo 2.

La Fig. 26 ilustra el resultado de detección de una diferencia en una cadena de azúcar entre las α -fetoproteínas L1 y L3 por ELISA usando AAL del Ejemplo comparativo 1.

La Fig. 27 ilustra el resultado de detección de una diferencia en una cadena de azúcar entre las α -fetoproteínas L1 y L3 por ELISA usando AOL del Ejemplo comparativo 2.

La Fig. 28 ilustra el resultado de detección de una diferencia en una cadena de azúcar entre las α -fetoproteínas L1 y L3 por ELISA usando LCA del Ejemplo comparativo 3.

La Fig. 29 ilustra el proceso de purificación de NSL del Ejemplo 3.

La Fig. 30 es un diagrama de elución de cromatografía hidrófoba de NSL del Ejemplo 3.

La Fig. 31 es un diagrama de elución de cromatografía de fase inversa de NSL del Ejemplo 3.

La Fig. 32 ilustra el resultado de SDS-PAGE de NSL del Ejemplo 3 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

La Fig. 33 ilustra el proceso de purificación de LSL del Ejemplo 4.

La Fig. 34 es un diagrama de elución de cromatografía hidrófoba de LSL del Ejemplo 4.

La Fig. 35 es un diagrama de elución de cromatografía de fase inversa de LSL del Ejemplo 4.

La Fig. 36 ilustra el resultado de SDS-PAGE de LSL del Ejemplo 4 (una fotografía como sustituto de un dibujo).

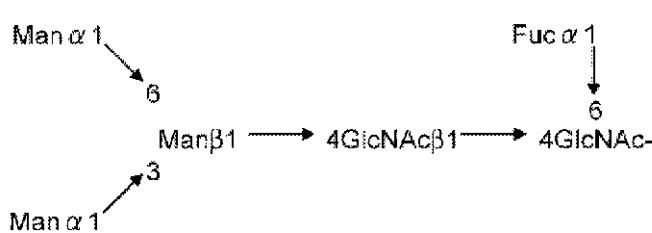
La Fig. 37 ilustra el resultado del espectro de MS de NSL del Ejemplo 3.

La Fig. 38 ilustra el resultado del espectro de MS de LSL del Ejemplo 4.

Mejor modo de realizar la invención

La siguiente sección mostrará un ejemplo de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ a la que se une la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

[Fórmula química 1]



[En la fórmula, Man significa manosa, GlcNAc significa N-acetilglucosamina y Fuc significa L-fucosa].

Además de la anterior, las cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ incluyen, por ejemplo, oligosacáridos libres, glicoaminoácidos, glicopéptidos, glicolípidos, glicoproteínas, proteoglicanos y células. Además, las cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ también pueden marcarse con fluorescencia, por ejemplo, por CyDye, aminobenzoato de

4-etilo (ABEE) y amino piridina. Una cadena de azúcar unida a N incluye una del tipo de alto contenido de manosa, una de tipo complejo y una de tipo híbrido, por ejemplo. Además, una cadena de azúcar unida a N también puede ser la obtenida por descomposición parcial de la cadena de azúcar químicamente por ácido o hidrazina, por ejemplo, o aquella para la cual se usa cualquier enzima de entre sialidasa, galactosidasa, N-acetilhexosaminidasa, fucosidasa y manosidasa de forma simultánea o en un método por etapas para descomponer parcialmente la cadena de azúcar. Como alternativa, una cadena de azúcar unida a N también puede ser la obtenida añadiendo azúcar, tal como glucosa o un grupo funcional tal como un grupo acetilo, un grupo sulfato o un grupo fosfato, por ejemplo, a la cadena de azúcar.

(1) Los basidiomicetos o ascomicetos a partir de los cuales se puede obtener la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ pertenecen, por ejemplo, a *Strophariaceae*, *Tricholomataceae*, *Polyporaceae* y *Amanitaceae*. *Strophariaceae* incluye *Pholiota terrestris*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateralitium*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota adiposa* y *Pholiota adiposa*, por ejemplo. *Tricholomataceae* incluye *Lepista sordida*, por ejemplo. *Polyporaceae* incluye *Trichaptum elongatum* y *Microporus affinis*, por ejemplo. *Amanitaceae* incluye *Amanita muscaria*, por ejemplo. Entre estos basidiomicetos o ascomicetos, desde los puntos de vista de la eficacia de recuperación de lectina y la especificidad de unión a azúcar, se prefieren particularmente *Strophariaceae*, *Tricholomataceae* o *Amanitaceae*. También son basidiomicetos o ascomicetos preferidos *Pholiota terrestris*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota adiposa*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateralitium*, *Lepista sordida* o *Amanita muscaria*.

La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (2) tiene un peso molecular en SDS-PAGE de 4.000 a 40.000 y, preferentemente, de 4.000 a 20.000. El peso molecular por SDS-PAGE se mide por el método de Laemmli, por ejemplo (Nature, volumen 227, página 680, 1976).

La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ tiene (3) una constante de asociación (K_a) para la cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor, preferentemente de $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor y, más preferentemente, de $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o mayor. Específicamente, cuando la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se compara con AAL, AOL, LCA, NPA y PSA que, como se sabe convencionalmente, tiene afinidad por la L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ tiene una constante de asociación notablemente alta. Esto significa que la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se une a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con una selectividad mucho mayor que en la lectina convencional.

La cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede tener un ácido siálico en el extremo no reductor de la misma. Una lectina específica de core-fucosa convencional (por ejemplo, LCA, NPA y PSA) tiene una baja afinidad por una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que tiene un ácido siálico en el extremo no reductor. Por otra parte, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ es superior a la convencional porque tiene una alta afinidad también por la cadena de azúcar como se ha descrito anteriormente.

La siguiente sección describirá un método para calcular una constante de asociación por cromatografía de afinidad frontal (FAC). Este método se basa en el siguiente principio. Cuando se hace fluir un diluyente de una concentración fija de una cadena de azúcar marcada con fluorescencia (por ejemplo, la mostrada en las Figs. 1 y 2) en una columna en la que está inmovilizada lectina, la cadena de azúcar fluye hacia el exterior de la columna en un corto periodo de tiempo cuando la lectina y la cadena de azúcar no tienen una interacción entre ellas. Entonces, se observa inmediatamente el extremo frontal de elución (frente). Cuando hay una afinidad con lectina, se retrasa la elución de la cadena de azúcar.

La preparación de una columna de lectina usada en el aparato se realiza en el método descrito más adelante. 1. Se disuelve lectina purificada en una concentración de 0,1 a 0,2 M de solución tampón de NaHCO_3 (pH 8,3 a 8,5). 2. La lectina se inmoviliza, a través de un grupo amino primario de lectina, un vehículo tal como sepharose activado con NHS. 3. Después, la lectina se bloquea por solución tampón Tris que incluye, por ejemplo, amina primaria o etanolamina. 4. La lectina-sepharose se suspende en tampón Tris 10 mM, que incluye un 0,8 % de NaCl (pH 7,4, TBS). Después, la resina con lectina inmovilizada se introduce en una columna en miniatura ($\phi 2 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$, 31,4 μl). 5. La columna en miniatura en la que se introduce la resina con lectina inmovilizada se protege por un soporte y la columna de lectina se conecta a un aparato de análisis automático FAC (FAC-1, SHIMADZU CORPORATION).

En la columna de lectina equilibrada, se vierte cadena de azúcar piridilaminada (cadena de azúcar PA) diluida por una solución de tampón de análisis (10 mM de tampón Tris que incluye un 0,8 % de NaCl (pH 7,4, TBS)) que tiene una concentración (2,5 nM) suficientemente menor que la constante de disociación (K_d) de lectina, en una cantidad de 300 μl a un caudal de 0,125 ml/min. Después, se detecta la elución de la cadena de azúcar PA de la columna por un detector de fluorescencia (longitud de onda de excitación/longitud de onda de fluorescencia: 310 nm/380 nm).

Basándose en los datos de detección, usando el extremo frontal de elución (V_0) de la cadena de azúcar (ramnosa PA) que no interacciona con lectina como referencia, se calcula el retraso ($V - V_0$) del extremo frontal de elución (V) de una cadena de azúcar que interacción con lectina como la fuerza de interacción. Después, basándose en las siguientes expresiones de criterios FAC, se calcula la constante de asociación (K_a) entre la cadena de azúcar y la lectina basándose en $V - V_0$ y B_t . Si la fuerza de interacción (valor $V - V_0$) y la constante de asociación son mayores, se provoca una mayor afinidad entre la lectina y una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

[Fórmula 1]

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{B_t}{V-V_0} - [A]_0 \quad (1)$$

$$\frac{1}{[A]_0(V-V_0)} = \frac{K_d}{B_t} \cdot \frac{1}{[A]_0} + \frac{1}{B_t} \quad (2)$$

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{B_t}{V-V_0} \quad (3)$$

5 En la fórmula, A significa una sustancia usada para la elución, A_0 significa la concentración inicial de la sustancia A, B significa un ligando inmovilizado, V significa el volumen de elución, V_0 significa el volumen del extremo frontal de elución de la sustancia que no interacciona en absoluto con el ligando B inmovilizado, B_t significa una cantidad de ligando eficaz, K_d significa una constante de disociación (una inversa de la constante de asociación)].

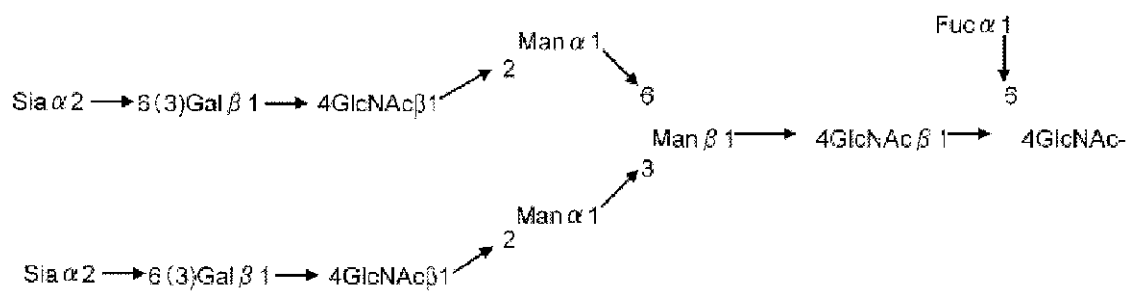
10 La especificidad de unión al azúcar de la lectina también puede confirmarse usando eritrocitos que pueden aglutinarse específicamente por la lectina para investigar el tipo de azúcar que puede inhibir la aglutinación de los eritrocitos y su concentración.

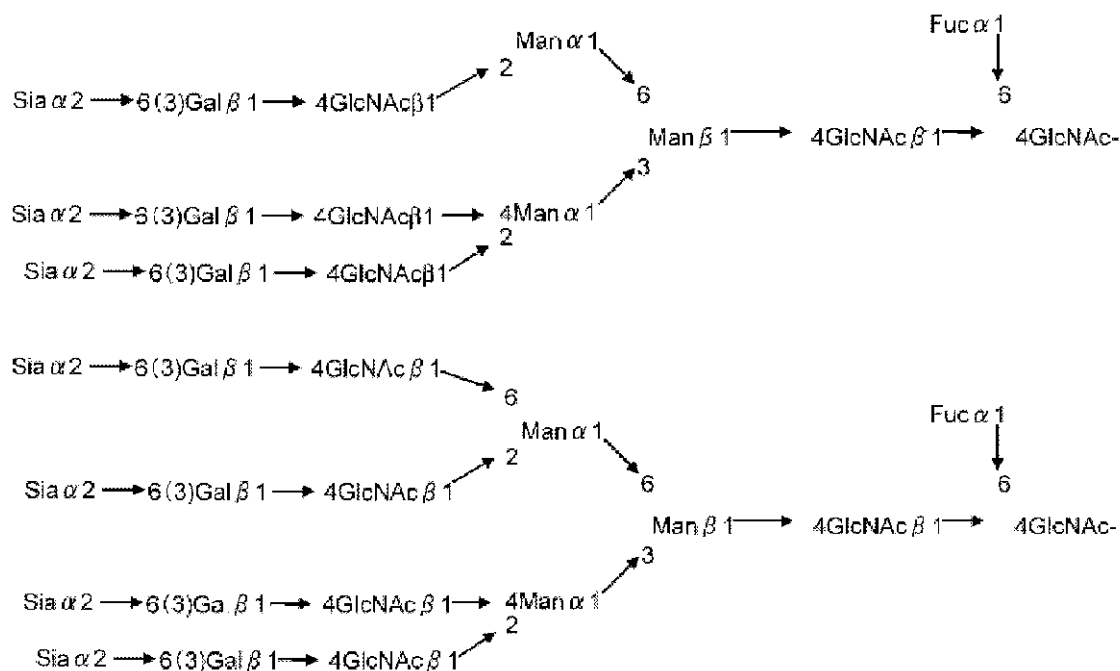
Además, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (4) preferentemente no se une de manera sustancial a una cadena de azúcar de alto contenido de manosa y/o glicolípido, sin incluir una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. De esta manera, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ tiene una mayor especificidad de unión. La expresión "no se une de manera sustancial", en el presente documento, significa una constante de asociación de $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ o menor y, preferentemente, una constante de asociación de $1,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ o menor y, de una forma particularmente preferida, una constante de asociación de 0.

Además, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (5) preferentemente tiene una afinidad por los N-glicanos mono-, di-, tri- y tetra-antennares $\alpha 1 \rightarrow 6$ fucosilados. La afinidad se representa por una constante de asociación de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor (a 25 grados C) y, más preferentemente, se representa por una constante de asociación de $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor.

25 A continuación, se muestran ejemplos de las estructuras de N-glicanos mono-, di-, tri-, tetra-antennares $\alpha 1 \rightarrow 6$ fucosilados que tienen afinidad por la lectina de la presente invención.

[Fórmula química 2]





La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos común, en particular, como se muestra por la secuencia número 1. Los 4º, 5º, 6º y 7º Xaa en la secuencia número 1 significan Asp/Asn/Glu/Thr, Thr/Ser/Ala, Tyr/Phe y Gln/Lys/Glu, respectivamente, entre los cuales las líneas diagonales significan "o".

Un ejemplo específico de la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de la presente invención es la proteína o péptido mostrado por las secuencias con los números 1 a 6.

La lectina mostrada por la secuencia número 2 es una nueva lectina que puede extraerse de *Pholiota terrestris* (denominada en lo sucesivo PTL). Los 10º y 17º Xaa de la secuencia número 2 pueden ser cualquier resto de aminoácido, pero preferentemente son Cys. Los 20º, 23º, 27º, 33º, 35º y 39º Xaa son Tyr/Ser, Phe/Tyr, Arg/Lys/Asn, Asp/Gly/Ser, Asn/Ala y Thr/Gln, respectivamente.

La lectina mostrada por la secuencia número 3 es una nueva lectina que puede extraerse de *Stropharia rugosoannulata* (denominada en lo sucesivo SRL). El 10º y 17º Xaa de la secuencia número 3 pueden ser cualquier resto de aminoácido, pero preferentemente son Cys. Los 4º, 7º, 9º, 13º, 20º, 27º, 29º, 33º, 34º y 39º Xaa son Pro/Gly, Glu/Lys, Val/Asp, Asn/Asp/Glu, His/Ser, Lys/His, Val/Ile, Gly/Asn/Ser, Ala/Thr y Arg/Thr, respectivamente.

La lectina mostrada por la secuencia número 4 es una nueva lectina que puede extraerse de *Lepista sordida* (denominada en lo sucesivo LSL). Los 10º y el 17º Xaa de la secuencia número 4 pueden ser cualquier resto de aminoácido, pero preferentemente son Cys. Los 1º, 4º, 7º, 8º, 9º, 13º, 16º, 20º, 22º, 25º, 27º, 31º y 34º Xaa son 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.

La lectina mostrada por la secuencia número 5 es una nueva lectina que puede extraerse de *Naematoloma sublateralitium* (denominada en lo sucesivo NSL). Los 10º y 17º Xaa de la secuencia número 5 pueden ser cualquier resto de aminoácido, pero preferentemente son Cys. Los 13º, 14º y 16º Xaa son Asp/Thr, Ser/Ala y Gln/Lys, respectivamente.

La lectina mostrada por secuencia número 6 también es una nueva lectina que puede extraerse de *Naematoloma sublateralitium* (denominada en lo sucesivo NSL). La secuencia número 6 muestra una variante en la que se inserta una Asn en el péptido de la secuencia número 5. De esta manera, el 10º y 18º Xaa de la secuencia número 6 pueden ser cualquier resto de aminoácido, pero preferentemente son Cys. Los 14º, 15º y 17º Xaa son Asp/Thr, Ser/Ala y Gln/Lys, respectivamente.

Como las proteínas o péptidos mostrados por las secuencias número 2 a 6 son nuevas, la presente invención proporciona una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que es (a) una proteína o péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5 o (b) una proteína o péptido en la que se han delecionado, insertado o sustituido uno o una pluralidad de aminoácidos en la secuencia de

aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5 y que es funcionalmente equivalente a una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5. La expresión "funcionalmente equivalente" en el presente documento significa una afinidad que tiene una constante de asociación de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor con una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, preferentemente $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor, y más preferentemente $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o mayor. Un ejemplo de la variante mostrada en (b) es la proteína o péptido mostrado por la secuencia número 6.

La presente invención también proporciona un gen que codifica (a) una proteína o péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5 o (b) una proteína o péptido en la que se han delecionado, insertado o sustituido uno o una pluralidad de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5 y que es funcionalmente equivalente a una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5. La expresión "funcionalmente equivalente" tiene el mismo significado que se ha indicado anteriormente.

La homología entre las proteínas o péptidos mostrada por las secuencias número 2 a 6 es de al menos un 37 % (véase la Tabla 14). De esta manera, la presente invención también proporciona una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que es una proteína o péptido que tiene una homología de al menos un 37 % o mayor con una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 6 y que es funcionalmente equivalente a una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5. La expresión "funcionalmente equivalente" tiene el mismo significado que se ha indicado anteriormente.

La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede aislarse a partir de basidiomicetos y/o ascomicetos por una combinación apropiada de, por ejemplo, métodos de extracción, métodos de separación y métodos de purificación conocidos. Por ejemplo, un proceso puede usar un disolvente acuoso para obtener un extracto soluble en agua de basidiomiceto y/o ascomiceto. A partir de este extracto, se obtiene lectina para la que (vi) el peso molecular según la SDS-PAGE es de 4.000 a 40.000 y, preferentemente, de 4.000 a 20.000 y (v) la afinidad mostrada por la constante de asociación a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ es $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ o mayor, preferentemente $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor y, más preferentemente, $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o mayor (a 25 grados C).

El basidiomiceto preferentemente se selecciona entre al menos uno de *Strophariaceae*, *Tricholomataceae*, *Polyporaceae* y *Amanitaceae*. En particular, *Strophariaceae* tal como *Pholiota terrestris* (*Pholiota terrestris* Overholts), *Pholiota squarrosa* (*Pholiota squarrosa* (Fr.) Kummer), *Pholiota adiposa* (*Pholiota adiposa* (Fr.) Kummer), *Stropharia rugosoannulata* (*Stropharia rugosoannulata* Farlow in Muir.), *Naematoloma sublateralitium* (*Naematoloma sublateralitium* (Fr.) Karst o *Hypholoma sublateralitium* (Fr.) Quel), *Tricholomataceae* tal como *Lepista sordida* (*Lepista sordida* (Schum.: Fr.) Sing.), *Polyporaceae* tal como *Trichaptum elongatum* (*Trichaptum elongatum*), *Microporus affinis* (*Microporus vernicipes*), *Amanitaceae* tal como *Amanita muscaria* (*Amanita muscaria*). Entre estos basidiomicetos y/o ascomicetos, preferentemente se usa un carpóforo.

Un método para obtener un extracto de basidiomiceto, por ejemplo, no está limitado particularmente siempre que el método pueda hacer, por ejemplo, que el disolvente acuoso tenga contacto con el carpóforo del basidiomiceto. Desde el punto de vista de la eficacia de la extracción, se prefiere un método tal que, por ejemplo, se pulverice un carpóforo de basidiomiceto en un medio acuoso para obtener una suspensión. Un método de pulverización puede ser un método de pulverización general que usa, por ejemplo, un mezclador o un homogeneizador.

El disolvente acuoso puede ser una solución tampón o una mezcla de agua o solución tampón y disolvente orgánico, que puede mezclarse con agua, por ejemplo, y preferentemente es una solución tampón o una mezcla de un disolvente orgánico y solución tampón.

La solución tampón no está limitada particularmente y puede ser soluciones tampón conocidas entre las cuales se prefiere una solución tampón que tiene una capacidad de tamponamiento en el intervalo de pH 3 a 10 y es más preferida una solución tampón que tiene una capacidad de tamponamiento en el intervalo de pH 6 a 8. Específicamente, puede usarse tampón fosfato, tampón citrato, tampón de ácido acético y tampón Tris, por ejemplo, entre los cuales se prefiere el tampón fosfato desde el punto de vista de la eficacia de la extracción.

La solución tampón puede no tener una concentración de sal limitada particular. La concentración de sal preferentemente es de 1 a 100 mM y, más preferentemente, de 5 a 20 mM desde el punto de vista de la eficacia de la extracción y la capacidad de tamponamiento.

La solución tampón puede incluir adicionalmente una sal. Por ejemplo, se prefiere solución salina normal tamponada con ácido fosfórico obtenida por la adición de sal de la dieta a tampón fosfato, por ejemplo, como disolvente acuoso en la presente invención.

El disolvente orgánico puede ser cualquier disolvente orgánico que pueda mezclarse con agua sin ninguna limitación, entre los cuales se prefiere acetona, metanol, etanol, 2-propanol y acetonitrilo. Puede ser preferible mezclar el disolvente orgánico con agua o solución tampón con un contenido del 10 al 40 % en masa.

El proceso de extracción preferentemente incluye además un proceso para retirar de la mezcla de disolvente acuoso y carpóforo de basidiomiceto, por ejemplo, los materiales insolubles en el medio acuoso. El método para retirar materia insoluble puede ser separación por filtración o centrífuga, por ejemplo, pero se prefiere la separación centrífuga desde el punto de vista de la eficacia de la retirada.

5 El proceso de extracción, de una forma particularmente preferida, es un proceso para pulverizar un carpóforo de basidiomiceto, por ejemplo, en solución salina tamponada con fosfato para retirar los materiales insolubles por una separación centrífuga y obtener de esta manera un extracto de disolvente acuoso.

10 El método para fabricar una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede proporcionar una purificación eficaz adicional cuando se usa cualquiera de los siguientes medios de purificación.

(Método de purificación 1)

15 El extracto de disolvente acuoso obtenido por el proceso se somete a un método de precipitación con sulfato amónico para obtener de esta manera una fracción que contiene lectina. Después, la fracción de lectina resultante se purifica por cromatografía hidrófoba y cromatografía de fase inversa.

(Método de purificación 2)

20 El extracto de disolvente acuoso obtenido por el proceso se somete a cromatografía de afinidad usando un vehículo en el que se inmoviliza tiroglobulina en agarosa.

(Método de purificación 3)

25 El extracto de disolvente acuoso obtenido por el proceso se somete a un procedimiento de precipitación con sulfato amónico para obtener de esta manera una fracción que contiene lectina y la fracción que contiene lectina se dializa frente a agua destilada y se liofiliza. Posteriormente, la fracción de lectina en bruto se disuelve en solución de tampón Tris y posteriormente se somete a cromatografía de intercambio iónico. Después, la fracción de actividad resultante se concentra y posteriormente se separa por exclusión molecular.

30 El método de fabricación de la presente invención puede incluir una etapa de someter, a un proceso de diálisis, la fracción que incluye lectina obtenida mediante la purificación, y una etapa de someter, a liofilización, una solución de lectina obtenida a través del procedimiento de diálisis. Como resultado, la lectina puede aislarse fácilmente. La etapa de procedimiento de diálisis y la etapa de liofilización pueden realizarse por métodos conocidos que se usan de forma general.

35 Una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que es (a) una proteína o péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5, o (b) una proteína o péptido en el que se ha deletado, insertado o sustituido uno o una o pluralidad de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5 y que es funcionalmente equivalente a la proteína o péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 5, puede obtenerse no solo por la extracción a partir de plantas naturales, sino también por una expresión artificial en un hospedador diferente del natural o por síntesis química. La sustancia como se ha descrito anteriormente también está dentro del alcance técnico de la presente invención. La expresión en el hospedador y la síntesis química pueden realizarse por métodos conocidos que se usan de forma general.

40 La presente invención también proporciona un método para detectar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ usando la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede reconocer una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ más específicamente que en un caso convencional y puede unirse a la misma. De esta manera, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ preferentemente se usa para detectar específicamente un compuesto de cadena de azúcar que incluye una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, tal como un polisacárido, glicolípido o glicoproteína, por ejemplo.

50 La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ usada en el método de detección preferentemente usa una lectina marcada. La lectina marcada de la presente invención incluye al menos una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y un medio marcador y está marcada de forma que pueda detectarse la lectina marcada.

55 El medio marcador no está limitado de forma particular y puede ser un método de marcaje conocido, incluyendo, por ejemplo, marcaje con un radioisótopo o la unión de un compuesto marcador, por ejemplo.

60 El compuesto marcador no está limitado de forma particular y puede ser uno que se use generalmente para esta aplicación incluyendo, por ejemplo, un compuesto marcador directo o indirecto, enzima, o un compuesto fluorescente, por ejemplo. Los ejemplos específicos del compuesto marcador incluyen biotina, digoxigenina, peroxidasa de rábano picante, isotiocianato de fluoresceína, o CyDye, por ejemplo. Estos compuestos marcadores pueden unirse a la lectina por un método convencional.

La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ preferentemente es una lectina derivada de basidiomicetos, de una forma particularmente preferida PTL, SRL, NSL, LSL y AML y, más preferentemente, PTL y SRL. Como se muestra en los ejemplos, PTL y SRL son diferentes de las lectinas específicas de L-fucosa convencionales ya que PTL y SRL no se unen a una L-fucosa distinta de la L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar de alto contenido de manosa que no tiene L-fucosa. De esta manera, PTL y SRL son óptimos como lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ usada en el método de detección de la presente invención.

La detección de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede realizarse, por ejemplo, por cromatografía de lectina usando la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ inmovilizada. La cromatografía de lectina es cromatografía de afinidad que usa la propiedad de unión de lectina específicamente a una cadena de azúcar. Cuando la cromatografía de lectina se combina con HPLC (HPLAC), puede esperarse un análisis de alto rendimiento.

Un vehículo en el que se inmoviliza una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ generalmente incluye material de gel tal como agarosa, dextrano, celulosa, almidón o poliácridamida, por ejemplo. Estos materiales de gel pueden ser los disponibles en el mercado sin una limitación particular, incluyendo, por ejemplo, sepharose 4B y sepharose 6B (GE Healthcare Bioscience).

La columna usada en la cromatografía de lectina incluye aquella en la que la lectina se inmoviliza en una microplaca o un nanopocillo.

La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ inmovilizada tiene una concentración generalmente en el intervalo de 0,001 a 100 mg/ml y, preferentemente, de 0,01 a 20 mg/ml. Cuando el vehículo es gel de agarosa, el vehículo se activa por CNBr, por ejemplo, y posteriormente se acopla con lectina. La lectina también puede inmovilizarse en un gel usando un espaciador activado. Como alternativa, la lectina también puede inmovilizarse en gel usando un grupo formilo que posteriormente se reduce por NaCNBH₃. Como alternativa, también puede usarse un gel activado disponible en el mercado tal como NHS-sepharose (GE Healthcare Bioscience).

Una muestra de cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se aplica a una columna y después se hace fluir solución tampón en la misma con el objetivo de limpiar y equilibrar la columna. Un ejemplo de solución tampón tiene una concentración molar de 5 a 500 mM y, preferentemente, de 10 a 500 mM, tiene un pH de 4,0 a 10,0 y, preferentemente, de 6,0 a 9,0, tiene un contenido de NaCl de 0 a 0,5 M y, preferentemente, de 0,1 a 0,2 M, y tiene un contenido de CaCl₂, MgCl₂ o MnCl₂ de 0 a 10 mM y, preferentemente, de 0 a 5 mM.

Después de lavar los materiales no unidos con el tampón, la cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se eluye con solución tampón no desnaturizante neutra que puede hacer que la cadena de azúcar eluya eficazmente mediante un agente de desorción tal como cloruro sódico o azúcar de hapteno, por ejemplo. Esta solución tampón también puede ser igual que la solución tampón anterior. El agente de desorción tiene una concentración, preferentemente, de 1 a 500 mM y, de una forma particularmente preferida, de 10 a 200 mM.

Además del método anterior, la cadena de azúcar también puede detectarse por cromatografía, chip de lectina, ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), agregación, método de resonancia de plasmón superficial, tal como el sistema Biacore®, o electroforesis, por ejemplo, por un método bien conocido por los expertos en la materia.

La muestra que incluye la cadena de azúcar no está limitada particularmente. La muestra que incluye la cadena de azúcar puede incluir, por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, lágrimas, saliva, fluidos corporales, fluido de mama, orina, sobrenadante de cultivo celular y secreción de un animal transgénico.

Un ejemplo específico de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ como el objeto del método de detección es una cadena de azúcar sintetizada por una $\alpha 1 \rightarrow 6$ fucosiltransferasa (FUT8). La cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede estar en una α -fetoproteína, $\alpha 5 \beta 1$ -integrina, receptor de TGF β o receptor de EGF, por ejemplo. La cadena de azúcar que actúa sobre el método de detección preferentemente es un marcador tumoral.

Una detección precisa de una α -fetoproteína $\alpha 1 \rightarrow 6$ fucosilada es útil para el diagnóstico precoz del cáncer de hepatocitos que complica clínicamente la cirrosis, el seguimiento minucioso de cáncer de hepatocitos, la determinación precisa de un efecto terapéutico, la detección precoz de un tumor embrionario y como índice de regeneración hepática, por ejemplo, en la hepatitis fulminante. Es de esperar que la $\alpha 5 \beta 1$ -integrina a la que se transfiere la L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ también sirva como índice para el diagnóstico de cáncer hepático.

El objeto del método de detección de la presente invención incluye, además del cáncer de hepatocitos, el diagnóstico de tumores (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, cáncer de intestino grueso, cáncer colorrectal, cáncer de células renales, cáncer pancreático, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer de células no pequeñas, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de huesos, melanoma, glioblastomas, astrocitoma, meduloblastoma, linfoma agudo, linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, leucemia mieloide aguda, leucemia linfática crónica, enfermedad alérgica, trastorno autoinmunitario y enfermedad cardiovascular, tal como

enfisema.

La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ es una nueva lectina que es diferente de una lectina conocida convencionalmente en las propiedades fisicoquímicas y las propiedades bioquímicas, tales como, por ejemplo, la especificidad de unión a una cadena de azúcar. En particular, como la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ reconoce específicamente un enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$ de L-fucosa, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ puede usarse como agente de diagnóstico, reactivo de ensayo, agente de adsorción específico para el análisis de separación de carbohidratos y fármaco inmunorregulador, por ejemplo. De esta manera, la presente invención proporciona un agente de diagnóstico que incluye la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ como ingrediente activo y que se usa para detectar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ sintetizada por una L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ transferasa, y un kit de agente de diagnóstico que incluye el agente de diagnóstico. El agente de diagnóstico o kit de agente de diagnóstico se usa para diagnosticar, por ejemplo, el cáncer de hepatocitos.

La presente invención también proporciona un método para fraccionar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que incluye una etapa de usar la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ como medio de unión para una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ para fraccionar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ usada en el método de fraccionamiento de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ preferentemente es lectina de basidiomicetos, de una forma particularmente preferida PTL, SRL, NSL, LSL y AML y, más preferentemente, PTL y SRL.

El método de fraccionamiento de la presente invención es, por ejemplo, cromatografía de lectina que usa la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ inmovilizada. Los detalles de la misma son los mismos que se han descrito con respecto al método de detección. Cuando la cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se purifica, una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se une a un vehículo de columna que consiste en agarosa o celulosa a través de un grupo funcional y, de esta manera, después se aplica la muestra de cadena de azúcar. Después de que la muestra pase a través de la columna, se recoge una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ adsorbida. Cuando se purifica una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, se recoge la muestra de cadena de azúcar que no se adsorbe mientras que la muestra de cadena de azúcar pasa a través de la columna.

El objeto purificado por el fraccionamiento de la presente invención pueden ser los dos tipos: una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Un ejemplo específico de la misma es una cadena de azúcar unida de un anticuerpo y, preferentemente, es una cadena de azúcar de IgG humana.

La pureza de la cadena de azúcar fraccionada por el método de fraccionamiento (es decir, una relación de, en el caso de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con respecto a la cantidad total de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una relación de, en el caso de una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ con respecto a la cantidad total de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$) es generalmente del 90 al 100 %, preferentemente del 95 al 100 % y de una forma particularmente preferida del 99 al 100 %.

La presente invención también proporciona una preparación de anticuerpos que incluye, como principio activo, una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ o una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que tiene una pureza generalmente del 90 al 100 %, preferentemente del 95 al 100 % y de una forma particularmente preferida del 99 al 100 %. En particular, es de esperar que la preparación de anticuerpo que consiste en un anticuerpo del que se ha eliminado el anticuerpo al que se le transfiere L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, proporcione una actividad ADCC mejorada. Los candidatos de la misma incluyen: Rituxan (anticuerpo quimérico, linfoma NH), Herceptin (anticuerpo humanizado, cáncer de mama), Erbitux (anticuerpo quimérico, cáncer de intestino delgado, cáncer de cabeza y cuello), Zevalin (anticuerpo de ratón, linfoma NH), Campath (anticuerpo humanizado, leucemia linfática crónica de linfocitos B), Bexxar (anticuerpo de ratón, linfoma NH) y Avastin (anticuerpo humanizado, cáncer de intestino delgado metastásico) por ejemplo.

El fármaco de anticuerpo obtenido por el método de fraccionamiento de la presente invención puede usarse en el mismo método que el método convencional (con respecto a un vehículo aprobado farmacológicamente, agente auxiliar o agente aditivo, una vía de administración o una forma de administración, por ejemplo), con la excepción de que el fármaco de anticuerpo obtenido por el método de fraccionamiento de la presente invención puede usarse con un bajo régimen de dosificación y una baja dosificación porque este fármaco tiene una mayor actividad específica que el convencional.

La presente invención también proporciona una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ o una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que tiene una pureza del 90 al 100 %, fraccionada por el método de fraccionamiento, así como un fármaco que incluye como principio activo la cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ o una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que tiene una pureza del 90 al 100 %. La pureza significa, en el caso de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, la relación entre una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y la cantidad total de una

cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y, en el caso de una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, una relación entre una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y la cantidad total de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. El fármaco preferentemente es la preparación de anticuerpo.

La presente invención también proporciona un método de selección de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Este método incluye la etapa de hacer que un fluido que incluye una cadena de azúcar actúe sobre la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y recoger la cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ adsorbida por la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Este método de selección es útil para buscar un nuevo marcador tumoral que tenga una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. También es posible usar una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que pueda usarse para el método de detección de la presente invención para seleccionar fácilmente un marcador de enfermedad que incluya una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ usada en el método de selección preferentemente es lectina derivada de basidiomicetos, seleccionada de una forma particularmente preferida de al menos uno de *Strophariaceae*, *Tricholomataceae*, *Polyporaceae* y *Amanitaceae* y, más preferentemente, es PTL, SRL, NSL, LSL y/o AML, entre las cuales las más preferidas son PTL y SRL.

La presente invención también proporciona un método para seleccionar una lectina específica de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Este método usa, por ejemplo, la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ inmovilizada. Un fluido que incluye una pluralidad de cadenas de azúcar se deja actuar sobre una lectina inmovilizada. Después, el perfil de ensayo de una cadena de azúcar adsorbida en la lectina inmovilizada (por ejemplo, electroforesis en gel) se compara con el perfil de control de la cadena de azúcar adsorbida por la lectina cuando el fluido actúa sobre una PTL o SRL inmovilizada. De esta manera, dicha lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se extrae de tal forma que tenga el mismo perfil que el del control. Como no se requiere identificar una cadena de azúcar adsorbida en cada lectina de muestra, puede seleccionarse una lectina diana por una operación muy sencilla. La lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ extraída de esta manera puede usarse como control para el siguiente método de selección. También es posible otro método que usa ADNc que codifica parcial o totalmente la secuencia de aminoácidos mostrada por la secuencia número 1 como cebador para repicar el ADNc de una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ a partir de la lectina de muestra.

La cadena de azúcar incluye al menos una de las cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ mostradas en la Fig. 1 y la Fig. 2 y, preferentemente, incluye al menos una de las cadenas de azúcar que no son de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ a las que se transfiere una L-fucosa distinta de un enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$ y al menos una cadena de azúcar que no tiene L-fucosa (por ejemplo, cadena de azúcar con alto contenido de manosa). Mediante su adición, puede confirmarse que no se encuentra afinidad con una cadena de azúcar distinta de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

El perfil de la cadena de azúcar adsorbida puede medirse por un método bien conocido por los expertos en la materia, tal como diversas cromatografías, análisis de masas, electroforesis en gel, chip de lectina, ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), resonancia de plasmón superficial tal como el sistema Biacore®, por ejemplo, o electroforesis, por ejemplo.

Ejemplo

La siguiente sección describirá con más detalle la presente invención a modo de ejemplo y ejemplos comparativos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

[Ejemplos 1 y 2] (Fabricación, medición de propiedades y caracterización de PTL y SRL) (1) Fabricación de PTL (Ejemplo 1)

Basándose en el proceso de purificación mostrado en la Fig. 3, se purificó lectina de *Pholiota terrestris* (PTL) a partir del hongo *Pholiota terrestris*.

(Extracción)

Todos los procedimientos se realizaron a 4 °C. Se extrajo polvo liofilizado de *Pholiota terrestris* con 50 ml de tampón Tris 10 mM (pH 7,2) a 4 °C durante 2 horas. El líquido resultante se centrifugó (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). Después, el sobrenadante se sometió a filtración con gasa para obtener de esta manera el primer extracto. Este residuo de la extracción se volvió a extraer con 50 ml de tampón Tris 10 mM (pH 7,2) a 4 °C durante una noche. Después de centrifugar este líquido (15.000 rpm, 20 min, 4 grados C), el sobrenadante se sometió a una filtración con gasa para obtener de esta manera el segundo extracto. Después, estos extractos se filtraron colectivamente por un papel de filtro para obtener de esta manera extracto de *Pholiota terrestris*.

(Cromatografía de intercambio iónico)

El extracto (87 ml) se aplicó a una columna de DEAE-sepharose (GE Healthcare Bioscience) equilibrada con tampón Tris 10 mM (pH 7,2). Después de lavar la columna con el tampón, la fracción unida se desorbió con NaCl 0,1 M en el
5 tampón. Después, las fracciones que mostraron actividad de hemaglutinación (mostrado por $\longleftrightarrow$ de la Fig. 4) se dializaron exhaustivamente frente a agua destilada y se liofilizaron.

(Cromatografía de afinidad)

10 El dializado liofilizado se redisolvió en solución salina tamponada con fosfato 10 mM (pH 7,4, denominada simplemente en lo sucesivo PBS). Después, la solución del extracto se aplicó a una columna de agarosa con tiroglobulina inmovilizada, equilibrada con el mismo tampón. Después de lavar la columna con PBS, la fracción unida se desorbió con amoníaco 0,2 M. Después se recogieron las fracciones que mostraron actividad de hemaglutinación (mostrado por $\longleftrightarrow$ de la Fig. 5), se ultrafiltraron y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera 1,07 mg de PTL.

15 (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE se realizó por un aparato de electroforesis de Phastsystem (GE Healthcare Bioscience) y un gel de Gradient8-25 (GE Healthcare Bioscience). Tanto la solución de muestra como el marcador de peso molecular se usaron en una cantidad de 1 μ l. La electroforesis se realizó basándose en el protocolo del producto y un método convencional. La Fig. 6 muestra el resultado de la SDS-PAGE de PTL. En la Fig. 6, la calle M, calles 1 y 2 corresponden a lo siguiente. Calle M: marcador de peso molecular (APRO), calle 1: PTL, 2-mercaptoetanol (-), calle 2: PTL, 2-mercaptoetanol (+), Gel: Gradiente8-25, Muestra: 1 μ l/calle, Tinte: Azul Brillante de Coomassie (CBB)

25 Tras la SDS-PAGE con gel al 8-25 %, se confirmó que el componente principal era PTL.

(2) Fabricación de SRL (Ejemplo 2)

Basándose en el proceso de purificación mostrado en la Fig. 7, se purificó lectina de *Stropharia rugosoannulata* (SRL) a partir del hongo *Stropharia rugosoannulata*.

(Extracción)

35 Todos los procedimientos se realizaron a 4 °C. Se extrajo polvo liofilizado de *Stropharia rugosoannulata* (400 g) con 1,6 l de PBS a 4 grados C durante 2 horas. El líquido resultante se centrifugó (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). Después, el sobrenadante se sometió a una filtración con gasa para obtener de esta manera el primer extracto. Este residuo de extracción se volvió a extraer con 0,8 l de PBS a 4 grados C durante una noche. El líquido se centrifugó (10.000 rpm, 20 min, 4 grados C). Después, el sobrenadante se sometió a una filtración con gasa para obtener de esta manera el segundo extracto. Estos extractos se mezclaron para obtener de esta manera líquido de extracción de
40 *Stropharia rugosoannulata*.

(Precipitación con sulfato amónico)

Se añadió (NH₄)₂SO₄ sólido (1,3 kg) al sobrenadante resultante (2,4 l) para obtener una saturación del 80 %. Después de dejar en reposo a 4 °C durante una noche, se recogieron los precipitados por centrifugación (10.000 rpm, 20 min, 4 °C) y se dializaron exhaustivamente frente a agua destilada y se liofilizaron, recogiendo de esta manera la fracción de precipitación con sulfato amónico al 80 % de *Stropharia rugosoannulata*.

(Cromatografía hidrófoba)

50 La fracción de precipitación con sulfato amónico al 80 % de *Stropharia rugosoannulata* se aplicó a Butyl-TOYOPEARL 650 M (TOSOH CORPORATION) equilibrada con una concentración 2 M de sulfato amónico-PBS para realizar la purificación por cromatografía hidrófoba. En esta cromatografía, se recogieron fracciones de elución de agua destilada, se ultrafiltraron y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera la fracción bruta de lectina de
55 *Stropharia rugosoannulata* (mostrado por $\longleftrightarrow$ de la Fig. 8).

(Cromatografía de fase inversa)

60 La fracción bruta de lectina de *Stropharia rugosoannulata* se aplicó a 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 de TFA al 0,05 %/acetonitrilo (70/30) (mostrado por $\longleftrightarrow$ de la Fig. 9). Después, se retiró el disolvente por evaporación a temperatura ambiente y el polvo seco resultante se recogió, obteniéndose de esta manera 7,5 mg de SRL.

65 La SDS-PAGE (PhastGel, Gradient8-25) se realizó en un Phastsystem (GE Healthcare Bio-Sciences). Tanto la solución de muestra como el marcador de peso molecular se usaron en una cantidad de 1 μ l. Después, la

electroforesis se realizó basándose en el protocolo de producto y un método convencional. La Fig. 10 muestra el resultado de la SDS-PAGE de SRL. En la Fig. 10, la calle M, calle 1 y calle 2 corresponden a lo siguiente. Calle M: marcador de peso molecular (APRO), calle 1: SRL, 2-mercaptoetanol (+), calle 2: SRL, 2-mercaptoetanol (-), Gel: Gradient8-25, Muestra: 1 µl/calle, Tinte: plata

Tras la SDS-PAGE usando gel al 8-25 %, se confirmó que el componente principal era SRL.

(3) Propiedades de PTL y SRL

(Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF)

Se disolvieron por separado PTL del Ejemplo 1 y SRL del Ejemplo 2 en una cantidad de 10 µg, respectivamente, en TA (una mezcla para la que la relación en volumen entre TFA al 0,1 % y acetonitrilo es 2:1). Después, se mezclaron una matriz saturada disuelta en TA y soluciones de lectina en TA en una relación de volumen de 4:1 y la mezcla resultante se dejó caer gota a gota en una cantidad de 1,0 µl sobre una placa diana, preparándose de esta manera una muestra. Se usó un aparato de análisis de espectrometría de masas de Autoflex (Bruker Daltonics K.K.) para medir los pesos moleculares de la PTL y la SRL en modo LP. El resultado demostró que el peso molecular era de aproximadamente 4.500 (Fig. 11 y Fig. 12).

(Análisis de la secuencia de aminoácidos)

Con respecto a la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2, las secuencias de aminoácidos de las mismas se analizaron por el Sistema Secuenciador de Péptidos y Proteínas PPSQ-21 (SHIMADZU CORPORATION). Los resultados se muestran en las secuencias número 2 y 3, respectivamente. Cualquiera de las secuencias era nueva.

La PTL y la SRL se sometieron a un ensayo de la actividad de hemaglutinación para eritrocitos de conejo, caballo, cerdo, oveja y humanos (A, B, O) y eritrocitos de conejo tratados con actinasa E. El resultado se muestra como actividad de hemaglutinación en la Tabla 1.

[Tabla 1]

		PTL		SRL	
		Unidad: título (1,0 mg/ml)	Unidad: concentración de hemaglutinación mínima (µg/ml)	Unidad: título (1,0 mg/ml)	Unidad: concentración de hemaglutinación mínima (µg/ml)
Conejo		64	5,21	64	5,21
Caballo		NT	NT	128	2,61
Cerdo		16	20,8	32	10,4
Oveja		<1	>333	<1	>333
Humano	A	<1	>333	<1	>333
	B	<1	>333	<1	>333
	O	<1	>333	<1	>333
Conejo tratado con actinasa E		2560	0,13	512	0,651

NT: No ensayado

Como puede verse por el resultado anterior del análisis de la estructura de aminoácidos y el ensayo de actividad de hemaglutinación, la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 eran una nueva lectina.

(4) Evaluación de la especificidad de unión a azúcar de PTL y SRL

Diversos monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos mostrados en la Tabla 2 y glicoproteínas mostradas en la Tabla 3 se sometieron a un ensayo de inhibición de hemaglutinación para evaluar la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 con respecto a la especificidad de unión a azúcar.

En una placa de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos, se prepararon series de doble dilución de 10 µl de soluciones de monosacárido, oligosacárido, polisacárido y glicoproteína. Después, la solución de lectina ajustada de antemano para tener un título 4 se añadió en una cantidad de 10 µl a los pocillos respectivos. Después, la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante una hora para la sensibilización. Después, se añadieron 10 µl de suspensión de glóbulos rojos al 4 % a los pocillos respectivos y la placa se sometió adicionalmente a reposo a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, se juzgó visualmente el factor de dilución de la solución de muestra a la que se inhibía completamente la hemaglutinación. Se asumió que la menor concentración que mostraba la inhibición era la concentración de inhibición mínima. Cuanto menor es la concentración de inhibición mínima, mayor es la especificidad por lectina. El resultado se muestra en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

Con fines comparativos, la especificidad de unión a azúcar se evaluó usando las siguientes lectinas disponibles en el mercado: Ejemplo Comparativo 1: AAL (SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION-J-OIL MILLS, Inc.), Ejemplo Comparativo 2: AOL (TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. - Gekkeikan Sake Company, Ltd.), Ejemplo Comparativo 3: LCA (SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION - J-OIL MILLS, Inc.) y Ejemplo Comparativo 4: PSA (SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION - J-OIL MILLS, Inc.). El resultado se muestra en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

[Tabla 2]

	Ejemplo 1 PTL (mM)	Ejemplo 2 SRL (mM)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (mM)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (mM)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (mM)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (mM)
Glucosa	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Galactosa	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Manosa	>100	>100	50	100	50	50
L-fucosa	>100	>100	0,391	0,391	>100	>100
Xilosa	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Ramnosa	>100	>100	>100	100	>100	>100
N-acetilglucosamina	>100	>100	>100	>100	>100	>100
N-acetilgalactosamina	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Metil α-manósido	>100	>100	>100	>100	50	50
Maltosa	>100	>100	>100	>100	100	>100
Fructosa	>100	>100	25	25	>100	>100
Sacarosa	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Melibiosa	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Rafinosa	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Ácido N-acetilneuramínico	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Ácido N-glicolilneuramínico	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Lactosa	>6	>6	>6	>6	>6	>6
Lactosa seriada	>6	>6	>6	>6	>6	>6

[Tabla 3]

	Ejemplo 1 PTL ($\mu\text{l/ml}$)	Ejemplo 2 SRL ($\mu\text{l/ml}$)	Ejemplo Comparativo 1 AAL ($\mu\text{l/ml}$)	Ejemplo Comparativo 2 AOL ($\mu\text{l/ml}$)	Ejemplo Comparativo 3 LCA ($\mu\text{l/ml}$)	Ejemplo Comparativo 4 PSA ($\mu\text{l/ml}$)
Albúmina de suero sanguíneo bovino	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Mucina (cerdo)	>250	>250	15,6	62,5	>250	>250
Asialomucina (cerdo)	>250	>250	31,3	62,5	>250	>250
Fetuína	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Asialofetuína	>250	>250	>250	>250	250	>250
glicoproteína ácida $\alpha 1$	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Transferrina	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Tiroglobulina	250	250	125	>250	62,5	62,5
Mucina (bovina)	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Caseína	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Lactoferrina	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ribonucleasa	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Globulina inmune humana G	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Globulina inmune humana A	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Como puede verse por la Tabla 2 y la Tabla 3, la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 se unieron solo a tiroglobulina que tenía L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Por otra parte, la AAL del Ejemplo Comparativo 1 se unió no solo a la tiroglobulina, sino también a azúcares tales como L-fucosa y fructosa, así como a glicoproteínas tales como mucina que tienen L-fucosa en una cadena de azúcar unida a O. La AOL del Ejemplo Comparativo 2 se unió a azúcares tales como L-fucosa y fructosa y se unió a una glicoproteína tal como mucina que tenía L-fucosa en una cadena de azúcar unida a O. La LCA del Ejemplo Comparativo 3 y la PSA del Ejemplo Comparativo 4 se unieron no solo a tiroglobulina, sino también a azúcares tales como manosa y metil α -manósido. Puede decirse que la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 son lectinas específicas de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que no se unen a L-fucosa y manosa y que se unen solo a una L-fucosa con enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$.

(5) Medición de las constantes de asociación de PTL y SRL a la cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$

Las constantes de asociación de la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ se midieron por el siguiente procedimiento.

(Preparación de oligosacárido)

Se usaron cadenas de azúcar piridilaminadas (PA) mostradas en la Fig. 1 y la Fig. 2 para el análisis de cromatografía de afinidad frontal (FAC). Se adquirieron azúcares PA de TAKARA BIO INC., SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION y Masuda Chemical Industries co., LTD. También se obtuvo azúcar PA por piridilaminación, por GlycoTAG® (TAKARA BIO INC.), una cadena de azúcar no marcada o una cadena de azúcar obtenida sometiendo una cadena de azúcar a digestión enzimática, por ejemplo.

(Preparación de columna de lectina)

Se disolvió lectina en una solución tampón de NaHCO_3 0,2 M (pH 8,3) que incluía NaCl 0,5 M y se acopló a sepharose activada con NHS (GE Healthcare Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, la sepharose con lectina inmovilizada se suspendió en tampón Tris 10 mM (pH 7,4, TBS) que incluía NaCl al 0,8 % y la

materia resultante se introdujo en una columna en miniatura ($\phi 2 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$, $31,4 \mu\text{l}$).

(Cromatografía de afinidad frontal)

- 5 Se realizó una cromatografía de afinidad frontal usando un aparato de análisis automático FAC (FAC-1, SHIMADZU CORPORATION). En particular, la columna de lectina preparada anteriormente se insertó en un soporte de acero inoxidable y el soporte se conectó a un aparato FAC-1. El caudal y la temperatura de la columna se mantuvieron a $0,125 \text{ ml/min}$ y 25°C , respectivamente. Después, la columna en miniatura se equilibró por TBS, y se introdujo un volumen excesivo (de $0,5 \text{ ml}$ a 4 ml) de una cadena de azúcar PA ($3,75 \text{ nM}$ o $7,5 \text{ nM}$) en la columna usando un
- 10 aparato de muestreo automático.

- La concentración fluorescente del eluato del azúcar PA (longitud de onda de excitación de 310 nm y longitud de onda de fluorescencia de 380 nm) se supervisó para medir la fuerza de interacción [una diferencia del eluato del extremo frontal y el oligosacárido convencional (PA ramnosa): $V-V_0$]. Basándose en la fuerza de interacción y la
- 15 cantidad de ligando eficaz, se calculó la constante de asociación K_a . El resultado se muestra en las Tablas 4 a 9.

- Con fines comparativos, también se calcularon las constantes de asociación basándose en el mismo procedimiento que el anterior con respecto a la AAL (Ejemplo Comparativo 1), AOL (Ejemplo Comparativo 2), LCA (Ejemplo Comparativo 3) y PSA (Ejemplo Comparativo 4) que, según se dice, son lectinas específicas de la core-fucosa. El
- 20 resultado se muestra en las Tablas 4 a 7.

[Tabla 4]

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M^{-1})	Ejemplo 2 SRL (M^{-1})	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M^{-1})	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M^{-1})	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M^{-1})	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M^{-1})
Cadena de azúcar que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	015	$5,0 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$9,1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
	201	$4,6 \times 10^5$	$6,4 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
	202	$4,0 \times 10^5$	$6,1 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$
	203	$3,3 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
	401	$3,5 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$
	402	$2,0 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
	403	$3,4 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$9,9 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$
	404	$3,9 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
	405	$3,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$4,7 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
	406	$2,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
	407	$2,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^3$
	410	$2,2 \times 10^5$	$3,9 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$<1,0 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^3$
	413	$2,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$	$<1,0 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^3$

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M ⁻¹)	Ejemplo 2 SRL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M ⁻¹)
	418	2,2x10 ⁵	4,3x10 ³	<1,0x10 ³	6,3x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	601	2,4x10 ⁵	1,0x10 ⁴	6,1x10 ⁴	1,4x10 ⁵	3,0x10 ⁴	3,1x10 ⁴
	602	1,2x10 ⁵	3,2x10 ⁴	5,2x10 ⁴	1,4x10 ⁵	2,4x10 ⁴	2,9x10 ⁴

[Tabla 5]

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M ⁻¹)	Ejemplo 2 SRL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M ⁻¹)
Cadena de azúcar que tiene L-fucosa distinta de L-fucosa α1→6	419	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	420	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	718	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	6,5x10 ⁴	1,7x10 ⁵	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	719	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	720	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	721	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	722	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	5,6x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	723	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	3,5x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	726	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	727	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,3x10 ⁵	7,6x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	728	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,2x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	729	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	730	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	731	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	739	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	909	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	3,1x10 ⁵	4,4x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

ES 2 605 980 T3

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M ⁻¹)	Ejemplo 2 SRL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M ⁻¹)
	910	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	9,0x10 ⁴	5,6x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	931	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	9,9x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	932	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	933	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	2,1x10 ⁵	3,1x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

[Tabla 6]

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M ⁻¹)	Ejemplo 2 SRL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M ⁻¹)
Cadena de azúcar que no tiene L-fucosa	001	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	002	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	003	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	7,2x10 ³	7,8x10 ³
	004	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	005	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	7,3x10 ³	<1,0x10 ³	7,4x10 ³
	006	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,4x10 ⁴	7,1x10 ³
	007	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	7,8x10 ³
	008	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	6,9x10 ⁴	1,8x10 ⁴	1,0x10 ⁴
	009	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,8x10 ⁴	7,9x10 ³
	010	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,3x10 ⁴	<1,0x10 ³
	011	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,4x10 ⁴	<1,0x10 ³
	012	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	2,5x10 ⁴	1,7x10 ⁴
	013	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,7x10 ⁴	<1,0x10 ³
	014	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,7x10 ⁴	8,6x10 ³
	101	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	103	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M ⁻¹)	Ejemplo 2 SRL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M ⁻¹)
	104	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	105	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	107	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	108	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	301	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	1,8x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	304	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	2,0x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	305	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	307	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	2,4x10 ³
	308	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	2,0x10 ⁴	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	313	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	314	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	323	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	501	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	502	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	503	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	504	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

[Tabla 7]

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M ⁻¹)	Ejemplo 2 SRL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M ⁻¹)
Cadena de azúcar que no tiene L-fucosa	701	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	702	<1,0*10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	703	<1,0*10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	704	<1,0*10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

ES 2 605 980 T3

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M ⁻¹)	Ejemplo 2 SRL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M ⁻¹)
	705	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	706	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	707	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	708	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	709	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	710	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	711	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	712	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	713	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	715	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	716	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	717	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	724	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	725	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	728	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	732	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	733	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	734	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	735	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	736	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	737	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	738	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	901	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	902	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	903	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 1 PTL (M ⁻¹)	Ejemplo 2 SRL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 1 AAL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 2 AOL (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 3 LCA (M ⁻¹)	Ejemplo Comparativo 4 PSA (M ⁻¹)
	905	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	906	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	907	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

Como puede verse en las Tablas 4 a 7, la AAL del Ejemplo Comparativo 1 y la AOL del Ejemplo Comparativo 2 se unen a cadenas de azúcar de L-fucosa no basadas en $\alpha 1 \rightarrow 6$ glicolípido (cadenas de azúcar n.º 718, 722, 723, 727, 909, 910 y 933) así como cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (cadenas de azúcar n.º 15, 201-203 y 401-418). La LCA del Ejemplo Comparativo 3 y la PSA del Ejemplo Comparativo 4 se unen a un conjunto de cadenas de azúcar que no tienen cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ (cadenas de azúcar n.º 003, 005-014). Por otra parte, la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 se unen firmemente a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y no se unen a una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no tiene L-fucosa en absoluto. Además, la PTL del Ejemplo 1 tiene una mayor constante de asociación que la de una lectina convencional (constante de asociación de $K_a = 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ o mayor). Además, la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 también se unen fuertemente a los N-glicanos triantennares core-fucosilados (cadenas de azúcar n.º 407-413) y N-glicano tetraantenar (cadena de azúcar n.º 418). Incluso en los casos en los que se ha añadido ácido siálico (cadenas de azúcar n.º 601 y 602), puede verse que la constante de asociación de la cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ no se ha reducido.

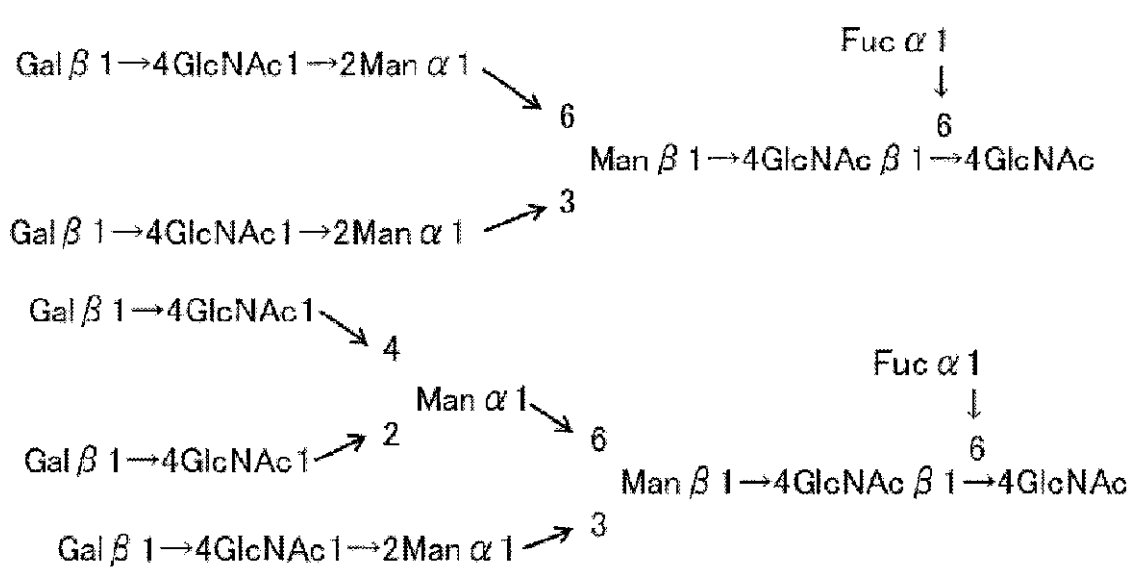
(6) Detección de glicoproteína usando PTL y SRL

(i) Preparación de glicoproteína

Se prepararon glicoproteínas (1) a (9) que tenían las siguientes estructuras de cadena de azúcar principales y (10) albúmina de suero bovino que no tiene azúcar.

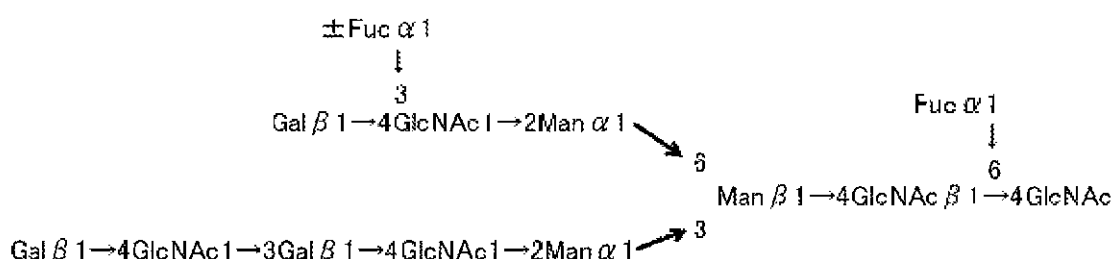
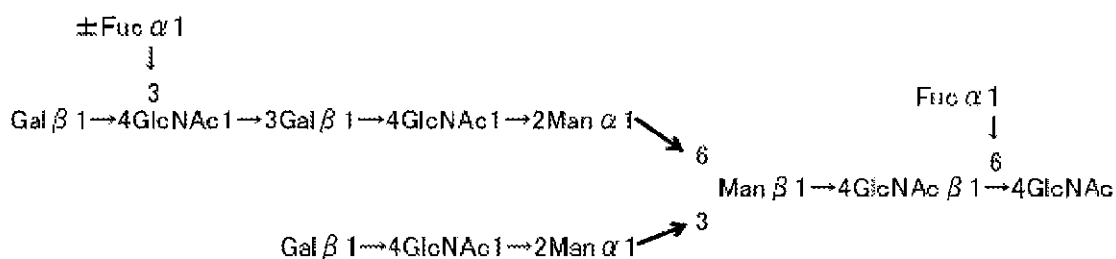
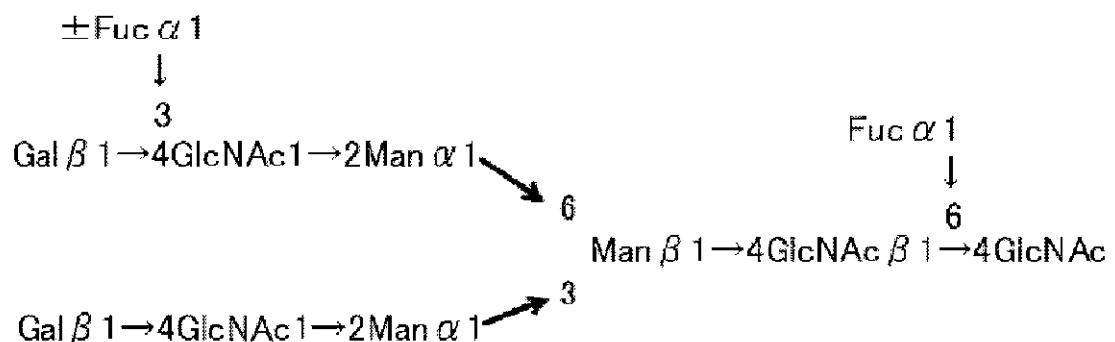
(1) Como glicoproteína que tiene N-glicanos de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, tiroglobulina (de cerdo) que tiene la siguiente fórmula:

[Fórmula química 3]



(2) Como glicoproteína que tiene N-glicanos de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, lactoferrina (bovina) que tiene la siguiente fórmula:

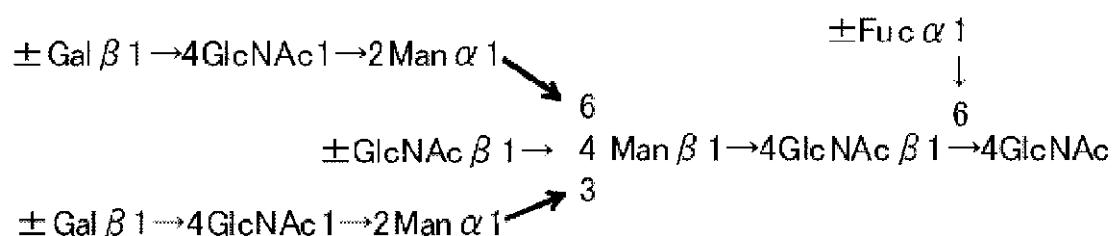
[Fórmula química 4]



5

(3) Como glicoproteína que tiene N-glicanos de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, inmunoglobulina G (humana) que tiene la siguiente fórmula:

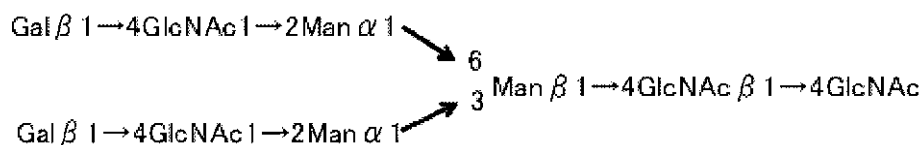
[Fórmula química 5]



(4) Como glicoproteína que no tiene N-glicanos de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, transferrina (humana) que tiene la siguiente fórmula:

[Fórmula química 6]

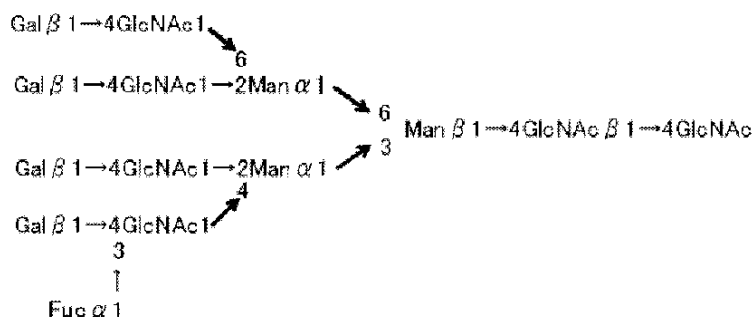
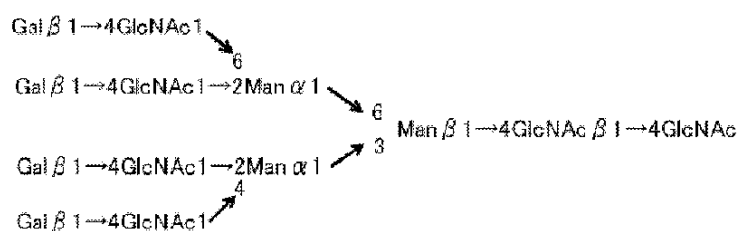
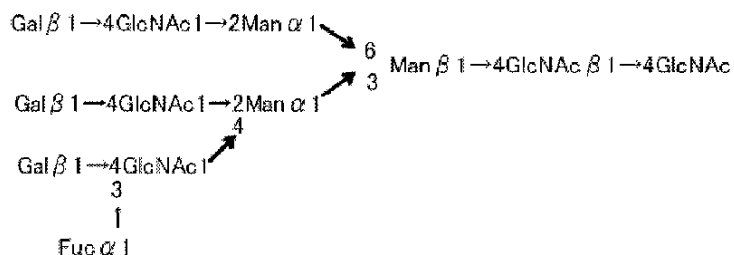
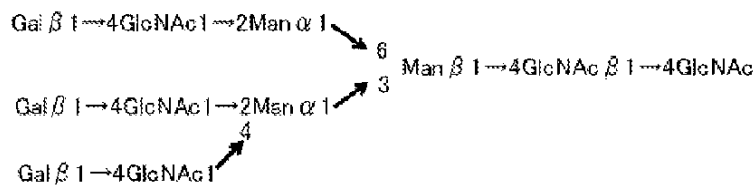
5



(5) Como glicoproteína que no tiene N-glicanos de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, glicoproteína ácida $\alpha 1$ (humana) que tiene la siguiente fórmula:

[Fórmula química 7]

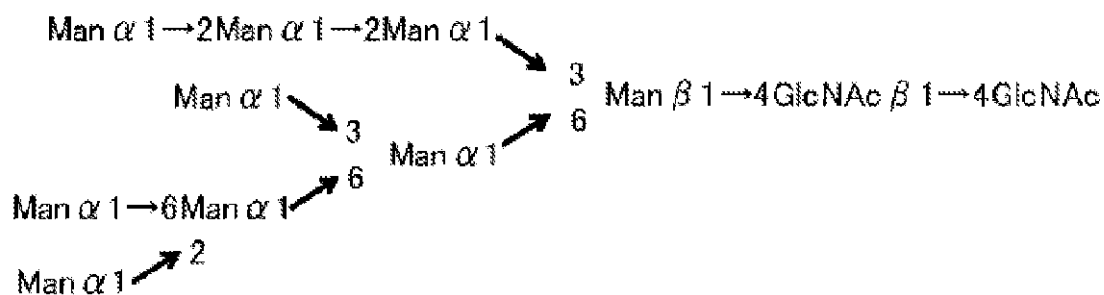
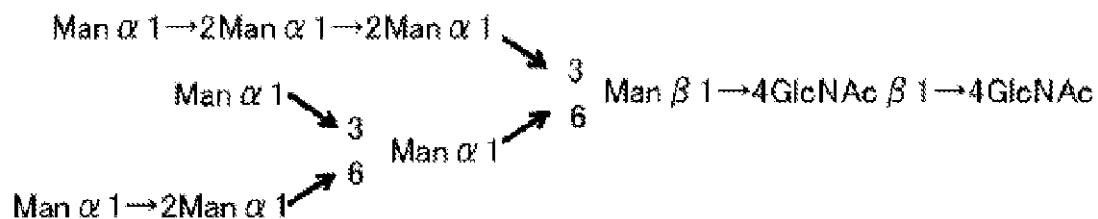
10



(6) Como glicoproteína que tiene un alto contenido de cadenas de azúcar de tipo manosa, invertasa (de levadura) que tiene la siguiente fórmula:

[Fórmula química 8]

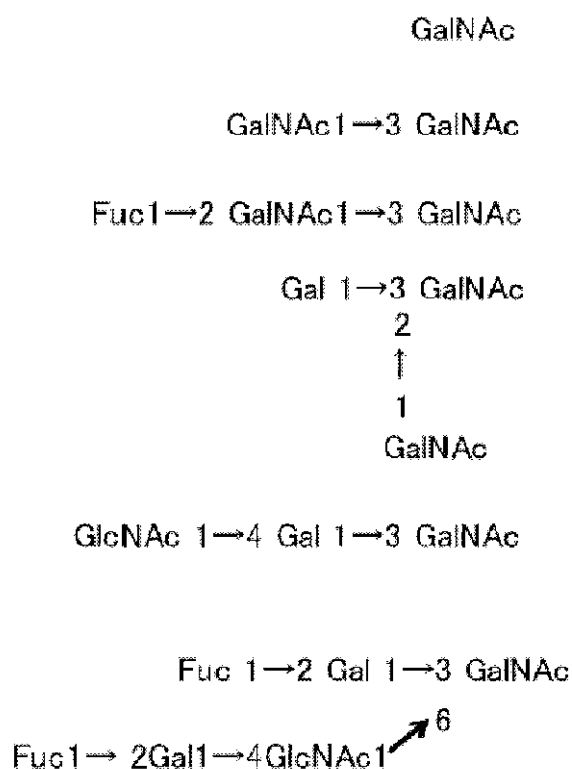
5



(7) Como glicoproteína que tiene cadenas de azúcar unidas a O de L-fucosa, mucina (de cerdo) que tiene la siguiente fórmula:

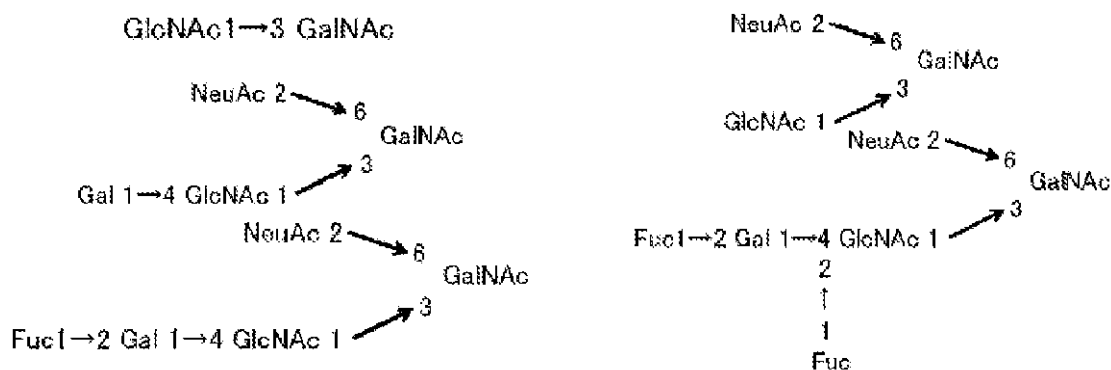
[Fórmula química 9]

10



(8) Como glicoproteína que tiene cadenas de azúcar unidas a O de L-fucosa, mucina (bovina) que tiene la siguiente fórmula:

[Fórmula química 10]



(ii) Detección de glicoproteínas por transferencia de western

Se sometieron a marcaje con biotina la PTL del Ejemplo 1, la SRL del Ejemplo 2, la AAL del Ejemplo Comparativo 1, la AOL del Ejemplo Comparativo 2 y la LCA del Ejemplo Comparativo 3. [0150]

(Biotinilación de lectina)

Se midió la lectina y se disolvió en solución de hidrogeno carbonato sódico 0,1 M (5 mg/ml). Después, se disolvió un reactivo de biotinilación en dimetil sulfóxido y la solución resultante se añadió a una solución de lectina para producir la reacción entre ellas. Después, se destiló el reactivo y se liofilizó, obteniéndose de esta manera lectina marcada con biotina.

(SDS-PAGE y transferencia de glicoproteína)

La solución obtenida disolviendo la muestra de glicoproteína en solución salina tamponada con fosfato 10 mM (pH 7,4, PBS) a 2 mg/ml se dispensó en un microtubo por una unidad de 18 µl. Se añadieron 6 µl de líquido de proceso de SDS (Sample Buffer Solution (2ME-); Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 1,25 µl de 2-mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a cada fluido dispensado y la mezcla resultante se llevó a ebullición durante 5 minutos. Esto se demostró por gel de poliacrilamida y se transfirió a membranas de PVDF (Immobilon IPVH 304 F0, Millipore K.K.).

(Tinción por lectina marcada con biotina)

La película se sumergió en solución de tampón Tris 10 mM que incluía NaCl al 0,8 % al que se había añadido BSA al 1 % (pH 7,4, BSA al 1 % + TBS) y se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Después, la película se limpió tres veces con solución de tampón Tris 10 mM (pH 7,4, TBS) que incluía NaCl al 0,8 %. Después, la película se sumergió en solución de lectina marcada con biotina (2 µg/ml) y se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Después, la película se limpió tres veces por TBS. Después, la película se sumergió en la solución de estreptavidina marcada con HRP a 1 µg/ml (Vector Laboratories) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, la película se limpió tres veces por TBS y se usó un juego de inmunotinción POD (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para realizar el ensayo de tinción. El ensayo de tinción sirve para detectar glicoproteínas por transferencia de Western usando lectina marcada con biotina. Las Fig. 13 a Fig. 17 son fotografías que muestran las siguientes glicoproteínas teñidas por PTL (Fig. 13), SRL (Fig. 14), AAL (Fig. 15), AOL (Fig. 16) o LCA (Fig. 17).

En la Fig. 13 a Fig. 17, las calles 0 a 6 corresponden a lo siguiente. Calle 1: tiroglobulina, calle 2: lactoferrina, calle 3: inmunoglobulina inmunitaria, calle 4: transferrina, calle 5: glicoproteína ácida α1, calle 6: invertasa, calle 0: albúmina de suero bovino (control).

Para un control, también se realizó tinción con CBB para teñir la proteína. La fotografía de tinción de la misma se muestra en la Fig. 18. En la Fig. 18, las calles M y 1 a 6 corresponden a lo siguiente. Calle M: marcador de peso molecular, calle 1: tiroglobulina, calle 2: lactoferrina, calle 3: inmunoglobulina G, calle 4: transferrina, calle 5: glicoproteína ácida α1, calle 6: invertasa, calle 0: albúmina de suero bovino.

[Tabla 8]

Glicoproteína	Características	Ejemplo 1 PTL	Ejemplo 2 SRL	Ejemplo Comparativo 1 AAL	Ejemplo Comparativo 2 AOL	Ejemplo Comparativo 3 LCA
(1) Tiroglobulina (cerdo)	N-glicano que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	O	O	O	O	O
(2) Lactoferrina (bovina)	N-glicano que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	O	O	O	O	O
(3) Inmunoglobulina G (humana)	N-glicano que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	O	O	O	O	O
(4) Transferrina (humana)	N-glicano que no incluye L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	x	x	x	x	x
(5) glicoproteína ácida $\alpha 1$ (humana)	N-glicano que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 3$	x	x	x	x	x
(6) Invertasa (levadura)	Cadena de azúcar de tipo de alto contenido en manosa	x	x	x	x	O
(0) Albúmina de suero sanguíneo (bovina)	Sin cadena de azúcar	x	x	x	x	x

O Detectado

5 x No detectado

Como puede verse por los resultados de la Tabla 8 y la Fig. 13 a Fig. 18, en el caso de LCA del Ejemplo Comparativo 3, se detecta no solo la glicoproteína que tiene cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, sino también glicoproteína que tiene un alto contenido de manosa (invertasa). A diferencia de esto, en el caso de la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2, solo se detecta glicoproteína que tiene cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no es de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y no se detectan en absoluto cadenas de azúcar que no tienen L-fucosa.

(iii) Detección de glicoproteínas por ELISA

Se usaron PTL del Ejemplo 1, SRL del Ejemplo 2, AAL del Ejemplo Comparativo 1, AOL del Ejemplo Comparativo 2 y LCA del Ejemplo Comparativo 3 que estaban marcadas con biotina para la detección de glicoproteínas por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

La glicoproteína y la albúmina como proteínas que no incluían una cadena de azúcar como control se disolvieron en solución tampón de ácido carbónico 0,1 M (pH 9,5) a 1 mg/ml. Después, la solución resultante se añadió a una placa de microtitulación (Nunc 439454) y se incubó a 4 grados C durante una noche. Después, la solución resultante se limpió por Tween/PBS al 0,05 % tres veces. Posteriormente, se añadió BSA/PBS al 1 % a los pocillos y la solución se incubó a 37 °C durante una hora. Entonces, después de limpiar la solución por Tween al 0,05 %/PBS tres veces, se añadió lectina marcada con biotina diluida de manera apropiada por BSA al 1 %/Tween al 0,05 %/PBS a los pocillos y la solución se incubó a 37 °C durante una hora. Después de limpiar la solución por Tween al 0,05 %/PBS tres veces, se añadió a los pocillos solución de estreptavidina marcada con HRP diluida por BSA al 1 %/Tween al 0,05 %/PBS y la solución se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de limpiar la solución por Tween al 0,05 %/PBS tres veces, se añadió sistema de sustrato de peroxidasa TMB (KPL) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos mientras se bloqueaba la luz.

La reacción se detuvo por ácido fosfórico 1 M. Después, se usó un lector de microplacas (MPR-A4i, TOSOH CORPORATION) para medir la absorbancia a 450 nm. Basándose en este valor, se calculó el valor de reacción ([absorbancia a 450 nm de un pocillo para el cual la glicoproteína estaba en fase sólida con respecto a la placa y se hizo reaccionar] - [absorbancia a 450 nm de un pocillo para el cual la glicoproteína no estaba en fase sólida en la placa y se hizo reaccionar]). A continuación, para cada lectina, se calculó la fuerza de interacción (valor relativo) para cada glicoproteína basándose en la suposición de que el valor de la glicoproteína (tiroglobulina) era del 100 %. El resultado del cálculo se muestra en la Tabla 9 y en la Fig. 19 a Fig. 23.

[Tabla 9]

	Cadenas de azúcar	Ejemplo 1 PTL	Ejemplo 2 SRL	Ejemplo Comparativo 1 AAL	Ejemplo Comparativo 2 AOL	Ejemplo Comparativo 3 LCA
(1) Tiroglobulina (cerdo)	N-glicano que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
(2) Lactoferrina (humano)	Cadena de N-glicano que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	⊙	O	O	O	O
(3) Inmunoglobulina G (humana)	N-glicano que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	⊙	O	Δ	Δ	O
(4) Transferrina (humana)	N-glicano que no incluye L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	x	x	x	x	x
(5) glicoproteína ácida $\alpha 1$ (humana)	N-glicano que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 3$	x	x	Δ	Δ	x
(6) Invertasa (levadura)	Glicano del tipo de alto contenido de manosa	x	x	x	x	x
(7) Mucina (cerdo)	O-glicano que incluye L-fucosa	x	x	⊙	⊙	x
(8) Mucina (bovina)	O-glicano que incluye L-fucosa	x	x	⊙	⊙	x
(O) Albúmina de suero sanguíneo (bovina)	Sin cadena de azúcar	x	x	x	x	x



Valores relativos de 120 a 80



Valores relativos de 80 a 50



Valores relativos de 50 a 10



Valores relativos de 10 o menos

Como puede verse por la Tabla 9 y la Fig. 19 a la Fig. 23, en el caso de AAL del Ejemplo Comparativo 1 y AOL del Ejemplo Comparativo 2, se detectaron de forma indeseable no solo glicoproteínas que tenían cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, sino también cadenas de azúcar unidas a O (mucina). A diferencia de esto, en el caso de la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2, solo se detecta glicoproteína que tiene cadenas de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y ninguna de las cadenas de azúcar que no son de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no tiene L-fucosa. Además, las lectinas de los Ejemplos Comparativos 1 a 3 tienen una fuerza de interacción con lactoferrina e inmunoglobulina G (IgG) que es inferior a la de la tiroglobulina. A diferencia de esto, las lectinas de los Ejemplos 1 y 2 proporcionaron la misma fuerza de interacción con lactoferrina e inmunoglobulina que la de la tiroglobulina.

(iv) Detección de cadena de azúcar de marcador tumoral por ELISA

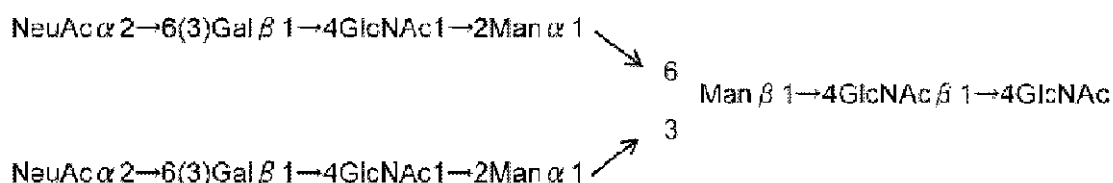
La α -fetoproteína (denominada en lo sucesivo “AFP”) es una glicoproteína incluida en suero sanguíneo que tiene una cadena de azúcar unida a N. Prácticamente no existe AFP en el suero sanguíneo de un adulto sano. Por otra parte, el suero sanguíneo de un paciente que tiene una enfermedad hepática benigna tiene una mayor cadena de azúcar de tipo α -fetoproteína L1 (AFP-L1). Además, se detecta cadena de azúcar de tipo α -fetoproteína L3 (AFP-L3) en un paciente con cáncer hepático. Convencionalmente, la diferencia en la cadena de azúcar se ha medido por LCA y el resultado de la medición se ha usado para el diagnóstico de una enfermedad hepática.

[Fórmula química 12]

α-Fetoproteína tipo L1 (AFP-L1)

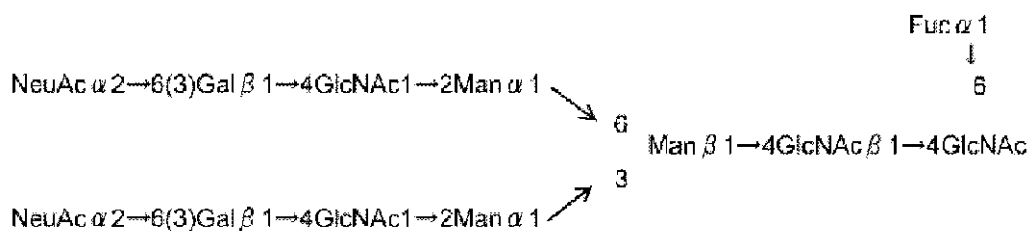
Cirrosis, hepatitis crónica

(también existe en la sangre del cordón umbilical)



α-fetoproteína tipo L3 (AFP-L3)

Cáncer hepático



Se usaron la PTL del Ejemplo 1, la SRL del Ejemplo 2, la AAL del Ejemplo Comparativo 1, la AOL del Ejemplo Comparativo 2 y la LCA del Ejemplo Comparativo 3 que estaban marcadas con biotina para evaluar la propiedad de unión de la α -fetoproteína por ELISA.

Se usó solución tampón de ácido carbónico 0,1 M (pH 9,5) para diluir la α -fetoproteína (derivada de suero de sangre de cordón umbilical humano, principalmente cadena de azúcar de tipo L1) y α -fetoproteína-L3 (preparada a partir del sobrenadante de cultivo de células de cáncer hepático humano) para conseguir 0,01 μ g/ml. Después, la solución resultante se añadió a una placa de microtitulación (Nunc) y se incubó a 4 °C durante una noche. Después, la solución se limpió por Tween al 0,05 %/PBS tres veces, se añadió BSA al 1 %/PBS a los pocillos y la solución se incubó a 37 °C durante una hora. Después, la solución se lavó por Tween al 0,05 %/PBS tres veces, a los pocillos se les añadieron la solución de lectina marcada con biotina diluida de forma apropiada por BSA al 1 %/Tween al 0,05%/PBS y la solución se incubó a 37 °C durante una hora. Después de limpiar la solución por Tween al 0,05 %/PBS tres veces, se añadió solución de estreptavidina marcada con HRP diluida por BSA al 1 %/Tween al 0,05 %/PBS y la solución se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de limpiar la solución por Tween al 0,05 %/PBS tres veces, se añadió el sistema sustrato TMB peroxidasa (KPL) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos mientras se bloqueaba la luz. La reacción se detuvo por ácido fosfórico 1 M. Después, se usó un lector de microplacas (MPR-A4i, TOSOH CORPORATION) para medir la absorbancia a 450 nm.

Se midió la absorbancia a 450 nm de la placa sobre la cual se había hecho reaccionar α -fetoproteína y α -fetoproteína-L3. Basándose en este valor, se calculó el valor de reacción (absorbancia a 450 nm de un pocillo para el cual la glicoproteína estaba en fase sólida con respecto a la placa y reaccionó) - [absorbancia a 450 nm de un pocillo para el que la glicoproteína no estaba en fase sólida con respecto a la placa y reaccionó]). A continuación, se calculó la interacción para cada lectina. A continuación, el resultado de los cálculos de los valores de reacción se muestra en la Tabla 10 y en la Fig. 24 a Fig. 28.

[Tabla 10]

	Ejemplo 1 PTL	Ejemplo 2 SRL	Ejemplo Comparativo 1 AAL	Ejemplo Comparativo 2 AOL	Ejemplo Comparativo 3 LCA
α -fetoproteína	0,039	0,031	-0,049	0,011	0,010
α -fetoproteína-L3	1,548	1,625	0,795	0,898	0,455

Como puede verse en la Tabla 10, la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 pueden detectar un cambio de la cadena de azúcar del marcador tumoral (cadena de azúcar de α -fetoproteína de tipo L1 y cadena de azúcar de tipo L3) a un nivel igual o mayor que la detección por LCA del Ejemplo Comparativo 3. De esta manera, la PTL del Ejemplo 1 y la SRL del Ejemplo 2 pueden usarse para un agente de diagnóstico o un kit de agente de diagnóstico mediante la detección de cambios de la cadena de azúcar del marcador tumoral. Además, la lectina de la presente invención tiene posibilidad de tener una alta especificidad, ya que puede detectarse un compuesto diana de cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de entre un grupo de compuestos de cadena de azúcar que incluye cadenas de azúcar distintas de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ en un método más preciso que otras lectinas.

[Ejemplos 3 y 4] (Fabricación y medición de propiedades de NSL y LSL)

(1) Fabricación de NSL (Ejemplo 3)

Basándose en el proceso de purificación mostrado en la Fig. 29, se purificaron lectinas de *Naematoloma sublateralitium* (NSL) a partir de *Naematoloma sublateralitium*.

(Extracción)

Se extrajo polvo de *Naematoloma sublateralitium* liofilizado (40 g) con 0,8 l de PBS a 4 °C durante 2 horas. Este líquido se centrifugó (10.000 rpm, 20 min, 4 °C). Después, el sobrenadante se sometió a una filtración con gasa para obtener de esta manera el primer líquido de extracción. Este residuo de extracción se volvió a extraer con 0,4 l de PBS a 4 °C durante una noche. Después de la operación de centrifugación (10.000 rpm, 20 min, 4 grados C), el sobrenadante se sometió a filtración con gasa para obtener de esta manera el segundo líquido de extracción. Estos extractos se combinaron para obtener extractos de *Naematoloma sublateralitium*.

(Precipitación con sulfato amónico)

Se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido (0,8 kg) al sobrenadante resultante (1,5 l) para obtener una saturación del 80 %. Después de dejar en reposo a 4 °C durante una noche, los precipitados se recogieron por centrifugación (10.000 rpm, 20 min, 4 °C) y se dializaron extensivamente frente a agua destilada y se liofilizaron, recogiendo de esta manera la fracción de precipitación con sulfato amónico al 80 % de *Naematoloma sublateralitium*.

(Cromatografía hidrófoba)

La fracción de precipitación con sulfato amónico al 80 % de *Naematoloma sublateralitium* se aplicó a Butyl-TOYOPEARL 650 M (TOSOH CORPORATION) equilibrado con una concentración 2 M de sulfato amónico-PBS para realizar la purificación por cromatografía hidrófoba. En esta cromatografía, se recogieron fracciones de elución de agua destilada, se ultrafiltraron y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera la fracción bruta de lectina de *Naematoloma sublateralitium* (mostrada por $\longleftrightarrow$ de la Fig. 30).

(Cromatografía de fase inversa)

La fracción bruta de lectina de *Naematoloma sublateralitium* obtenida a través del proceso anterior se aplicó a 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 de TFA al 0,05 %/acetonitrilo (70/30) (mostrada por $\longleftrightarrow$ de la Fig. 31). Después, el disolvente se retiró por evaporación a temperatura ambiente proporcionando de esta manera un polvo seco. Después, el polvo seco se recogió proporcionando de esta manera NSL.

Se realizó SDS-PAGE (PhastGel, Gradient10-15) en un Phastsystem (GE Healthcare Bio-Sciences). La solución de muestra y el marcador de peso molecular se usaron en una cantidad de 1 μ l. La electroforesis se realizó basándose en el protocolo del producto y un método convencional. La Fig. 32 muestra el resultado de SDS-PAGE de la NSL en la que la calle 1 y la calle 2 corresponden a lo siguiente. Calle M: marcador de peso molecular, calle 1: NSL, 2-mercaptoetanol (+), calle 2: NSL, 2-mercaptoetanol (-), Gel: Gradient10-15 (GE Healthcare Bioscience) y muestra: 1 μ l/calle, tinción: plata.

Tras la SDS-PAGE usando gel al 10-15 %, se confirmó que el componente principal era NSL.

(2) Fabricación de LSL (Ejemplo 4)

Basándose en el proceso de purificación mostrado en la Fig. 33, se purificó lectina de *Lepista sordida* (LSL) a partir del hongo *Lepista sordida*.

(Extracción)

A polvo de *Lepista sordida* liofilizado (40 g) obtenido por liofilización de aproximadamente 400 g de *Lepista sordida* se le añadieron 0,8 l de PBS y la extracción se realizó a 4 °C durante 2 horas. Después de centrifugar este líquido (10.000 rpm, 20 min, 4 °C), el sobrenadante se sometió a filtración con gasa para obtener de esta manera el primer líquido de extracción. Este residuo de extracción se volvió a extraer con 0,4 l de PBS a 4 °C durante una noche. Después de centrifugar este líquido (10.000 rpm, 20 min, 4 grados C), el sobrenadante se sometió a filtración con gasa para obtener de esta manera el segundo líquido de extracción. Estos extractos se combinaron para proporcionar de esta manera extracto de *Lepista sordida*.

(Precipitación con sulfato amónico)

Se añadió (NH₄)₂SO₄ (0,8 kg) sólido al sobrenadante resultante (10,5 l) para obtener una saturación del 80 %. Después de dejar en reposo a 4 °C durante una noche, se recogieron los precipitados por centrifugación (10.000 rpm, 20 min, 4 grados C) y se dializaron exhaustivamente frente a agua destilada y se liofilizaron, recogiendo de esta manera la fracción de precipitación con sulfato amónico al 80 % de *Lepista sordida*.

Se añadieron 0,5 l del líquido de extracción con aproximadamente 0,8 kg de sulfato amónico para conseguir una concentración de sulfato amónico saturada al 80 % y el líquido resultante se agitó. Después, se confirmó la disolución completa del mismo. Posteriormente, el líquido se sometió a reposo a 7 grados C durante una noche. Después, esta solución se centrifugó (10.000 rpm, 20 min, 4 grados C) y a la precipitación se le añadió una pequeña cantidad de agua destilada. Después, la solución resultante se suspendió recogiendo de esta manera una fracción de precipitación con sulfato amónico al 80 % de *Lepista sordida*. La fracción de precipitación con sulfato amónico al 80 % de *Lepista sordida* recogida se sometió a una diálisis con agua pura por una película de diálisis (fracción de 6.000 a 8.000).

(Cromatografía hidrófoba)

La fracción de precipitación con sulfato amónico al 80 % de *Lepista sordida* se aplicó a Butyl-TOYOPEARL 650 M (TOSOH CORPORATION) equilibrada con una concentración 2 M de sulfato amónico-PBS para realizar la purificación por cromatografía hidrófoba.

En esta cromatografía, se recogieron las fracciones de elución de PBS, se ultrafiltraron y se liofilizaron, obteniéndose de esta manera la fracción bruta de lectina de *Lepista sordida* (mostrada por $\longleftrightarrow$ de la Fig. 34).

(Cromatografía de fase inversa)

La fracción bruta de lectina de *Lepista sordida* se aplicó a 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 de TFA al 0,05 %/acetonitrilo (70/30) (mostrada por $\longleftrightarrow$ de la Fig. 35). Después, el disolvente se retiró por evaporación a temperatura ambiente para proporcionar polvo en seco. Después, se recogió el polvo seco obteniéndose de esta manera LSL.

Se realizó SDS-PAGE (PhastGel, Gradient10-15) en un Phastsystem (GE Healthcare Bio-Sciences). La solución de muestra y el marcador de peso molecular se usaron en una cantidad de 1 µl. La electroforesis se realizó basándose en el protocolo del producto y un método convencional. La Fig. 36 muestra los resultados de SDS-PAGE de LSL en el que la calle M y la calle 1 corresponden a lo siguiente. Calle M: marcador de peso molecular, calle 1: LSL (cromatografía hidrófoba, fase inversa): 2-mercaptoetanol (+), Gel: Gradient10-15 (GE Healthcare Bioscience) y muestra: 1 µl/calle, tinte: plata.

Tras la SDS-PAGE usando gel al 10-15 %, se confirmó que el componente principal era LSL.

(3) Propiedades de NSL y LSL

(Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF)

La NSL del Ejemplo 3 y la LSL del Ejemplo ... en una cantidad de 10 µg, respectivamente, se disolvieron por separado en TA (una mezcla en la que la que el TFA al 0,1 % y el acetonitrilo tienen una relación de volumen de 2:1) por el mismo procedimiento que se ha indicado en el Ejemplo 1. Después, la mezcla obtenida por la matriz saturada disuelta en la solución de TA y en solución de TA con lectina a una relación de volumen de 4:1 se añadió gota a gota en una cantidad de 1,0 µl sobre una placa diana para preparar de esta manera una muestra. Se usó un aparato de

análisis de espectrometría de masas del Autoflex (Bruker Daltonics K.K.) para medir los pesos moleculares de NSL y LSL en el modo LP. El resultado mostró que el peso molecular era de aproximadamente 4.500 (Fig. 37 y Fig. 38).

(Análisis de la secuencia de aminoácidos)

5 La secuencia de aminoácidos de NSL del Ejemplo 3 se analizó por el Protein Peptide Sequencer PPSQ-21 System (SHIMADZU CORPORATION). La NSL del Ejemplo 3 era un híbrido de las secuencias de aminoácidos mostradas en las secuencias número 5 y 6. Estas dos secuencias eran nuevas.

10 De forma similar, la secuencia de aminoácidos de LSL del Ejemplo 4 se analizó por el Protein Peptide Sequencer PPSQ-21 System (SHIMADZU CORPORATION). El resultado se mostró en la secuencia número 4. Esta secuencia también era nueva.

(4) Evaluación de la especificidad de unión a azúcar de NSL y LSL

15 Con respecto a la NSL del Ejemplo 3 y la LSL del Ejemplo 4, se evaluaron las propiedades de unión específicas a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ en el mismo método que en el Ejemplo 1. Específicamente, se calcularon las constantes de asociación (K_a) de la NSL y la LSL. El resultado se muestra en las Tablas 11 a 13.

20 [Tabla 11]

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 3 NSL (M^{-1})	Ejemplo 4 LSL (M^{-1})
Cadena de azúcar que tiene L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$	015	$3,6 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$
	201	$3,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$
	202	$3,9 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$
	203	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$
	401	$5,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$
	402	$3,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
	403	$5,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$
	404	$4,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$
	405	$5,0 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$
	406	$2,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
	407	NT	NT
	410	$3,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
	413	NT	NT
	418	$3,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
	601	NT	NT
	602	$1,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$

NT: No ensayado

[Tabla 12]

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 3 NSL (M ⁻¹)	Ejemplo 4 LSL (M ⁻¹)
Cadena de azúcar que tiene L-fucosa distinta de L- fucosa α1→6	419	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	420	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	718	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	719	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	720	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	721	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	722	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	723	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	726	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	727	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	728	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	729	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	730	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	731	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	739	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	909	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	910	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	931	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	932	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	933	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

[Tabla 13]

5

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 3 NSL (M ⁻¹)	Ejemplo 4 LSL (M ⁻¹)	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 3 NSL (M ⁻¹)	Ejemplo 4 LSL (M ⁻¹)
Cadena de azúcar que no tiene L- fucosa	001	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	701	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	002	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	702	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	003	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	703	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	004	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	704	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³
	005	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³	705	<1,0x10 ³	<1,0x10 ³

	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 3 NSL (M ⁻¹)	Ejemplo 4 LSL (M ⁻¹)	Cadena de azúcar n.º	Ejemplo 3 NSL (M ⁻¹)	Ejemplo 4 LSL (M ⁻¹)
	006	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	706	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	007	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	707	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	008	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	708	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	009	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	709	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	010	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	710	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	011	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	711	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	012	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	712	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	013	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	713	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	014	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	715	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	101	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	716	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	103	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	717	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	104	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	724	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	105	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	725	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	107	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	728	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	108	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	732	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	301	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	733	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	304	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	734	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	305	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	735	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	307	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	736	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	308	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	737	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	313	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	738	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	314	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	901	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	323	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	902	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	501	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	903	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	502	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	905	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	503	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³	907	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³
	504	<1,0x10 ⁻³	<1,0x10 ⁻³			

En el caso de la NSL del Ejemplo 3 y la LSL del Ejemplo 4, solo se detectó una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y una cadena de azúcar que no era de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ y no se detectó en absoluto una cadena de azúcar que no tenía L-fucosa. Además, la NSL del Ejemplo 3 y la LSL del Ejemplo 4 también se unieron fuertemente a tri- y tetraantenas de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$. Además, incluso cuando se añadió ácido siálico, no se redujo la constante de asociación a una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$.

Finalmente, la Tabla 14 mostró el resultado del cálculo de homología entre las proteínas o péptidos mostrados en las secuencias número 2 a 6. Como puede verse a partir de este resultado, puede obtenerse una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ cuando se obtiene una homología de al menos el 37 % con la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias 2 a 6.

[Tabla 14]

	Secuencia 2	Secuencia 3	Secuencia 4	Secuencia 5	Secuencia 6
Secuencia 2	100 %	61 a 74 %	52 a 73 %	69 a 79 %	65 a 70 %
Secuencia 3	-	100 %	46 a 64 %	58 a 72 %	43 a 64 %
Secuencia 4	-	-	100 %	46 a 64 %	37 a 55 %
Secuencia 5	-	-	-	100 %	87 a 92 %
Secuencia 6	-	-	-	-	100 %

Listado de secuencias

5 <110> J-OIL MILLS, INC.
Yuka, KOBAYASHI

<120> Lectina específica de fucosa alfa 1-6

<130> NP2102

10 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> parte común de la secuencia N.º 2 a N.º 5

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> X significa Asp/Asn/Glu/Thr.

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> X significa Thr/Ser/Ala.

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X significa Tyr/Phe.

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X significa Gln/Lys/Glu.

<400> 1

Cys Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
1 5

45 <210> 2
<211> 40
<212> PRT
<213> *Pholiota terrestris* Overholts

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20) .. (20)
<223> X significa Tyr/Ser.

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> X significa Phe/Tyr.

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> X significa Arg/Lys/Asn.

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> X significa Asp/Gly/Ser.

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> X significa Asn/Ala.

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39) .. (39)
 <223> X significa Thr/Gln.

<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 Trp
 20 25 30

Xaa Thr Xaa Val Phe His Xaa Gly
 35 40

30 <210> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> *Stropharia rugosoannulata* Farlow in Murr.

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4) .. (4)
 <223> X significa Pro/Gly.

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X significa Glu/Lys.

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9) .. (9)
 <223> X significa Val/Asp.

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.

55 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> X significa Asn/Asp/Glu.

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20) .. (20)
 <223> X significa His/Ser.

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> X significa Lys/His.

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29) .. (29)
 <223> X significa Val/Ile.

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> X significa Gly/Asn/Ser.

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> X significa Ala/Thr.

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39) .. (39)
 <223> X significa Arg/Thr.

40

<400> 3

Ala Pro Val Xaa Val Thr Xaa Leu Xaa Xaa Asp Gly Xaa Ser Tyr 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

45

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

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> X significa Ala/Gln.

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE

	<222> (4) .. (4)
	<223> X significa Pro/Lys.
5	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (7)..(7) <223> X significa Ala/Ser.
10	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (8)..(8) <223> X significa Met/Ile/Val.
15	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (9) .. (9) <223> X significa Tyr/Thr.
20	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (10)..(10) <223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.
25	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (13)..(13) <223> X significa Asp/Asn.
30	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (16)..(16) <223> X significa Lys/Glu.
35	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (17)..(17) <223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.
40	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (20) .. (20) <223> X significa Ala/Asn.
45	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (22)..(22) <223> X significa Val/Asp/Asn.
50	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (25)..(25) <223> X significa Asp/Asn.
55	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (27)..(27) <223> X significa Arg/His/Asn.
60	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (31)..(31) <223> X significa Gln/Arg.
65	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (34)..(34)

ES 2 605 980 T3

<223> X significa Thr/Val.

<400> 4

Xaa Pro 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

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

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

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X significa Asp/Thr.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X significa Ser/Ala.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X significa Gln/Lys.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente 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

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

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X significa Asp/Thr.

```
10      <220>  
      <221> MISC_FEATURE  
      <222> (15)..(15)  
      <223> X significa Ser/Ala.
```

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> X significa Gln/Lys.

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> X significa cualquier aminoácido, preferentemente Cys.

25 <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. Una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ que es una proteína o péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 6.
2. Un método para fabricar una lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, que comprende las etapas de:

someter un extracto en disolvente acuoso de basidiomiceto y/o ascomiceto a cualquiera de las siguientes cromatografías (i) cromatografía hidrófoba y cromatografía de fase inversa, (ii) cromatografía de afinidad o (iii) cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular para obtener fracciones activas que contienen lectina y

recoger a partir de las fracciones una o más fracciones activas que contengan lectina que es una proteína o péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las secuencias número 2 a 6.
3. El método de fabricación de la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los basidiomicetos se seleccionan de al menos una de las familias *Strophariaceae*, *Tricholomataceae*, *Amanitaceae* y *Polyporaceae*.
4. El método de fabricación de la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el basidiomiceto es al menos uno seleccionado entre *Pholiota terrestris*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota adiposa*, *Stropharia rugosoannulata*, *Naematoloma sublateralitium*, *Lepista sordida* y *Amanita Muscaria*.
5. El método de fabricación de la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 4, en el que se usan carpóforos del basidiomiceto y/o ascomiceto.
6. Un método para detectar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, que comprende la etapa de hacer que una cadena de azúcar contenida en una muestra obtenida a partir de un cuerpo humano actúe sobre la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de acuerdo con la reivindicación 1.
7. El método para detectar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la cadena de azúcar es un marcador tumoral.
8. Un método de fraccionamiento de una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, que comprende la etapa de hacer que una cadena de azúcar actúe sobre la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de acuerdo con la reivindicación 1.
9. El método para fraccionar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la cadena de azúcar está unida a un anticuerpo.
10. Un agente de diagnóstico o kit de agentes de diagnóstico para detectar una cadena de azúcar de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$, en el que el agente de diagnóstico incluye la lectina específica de L-fucosa $\alpha 1 \rightarrow 6$ de acuerdo con la reivindicación 1 como principio activo.

Figura 1

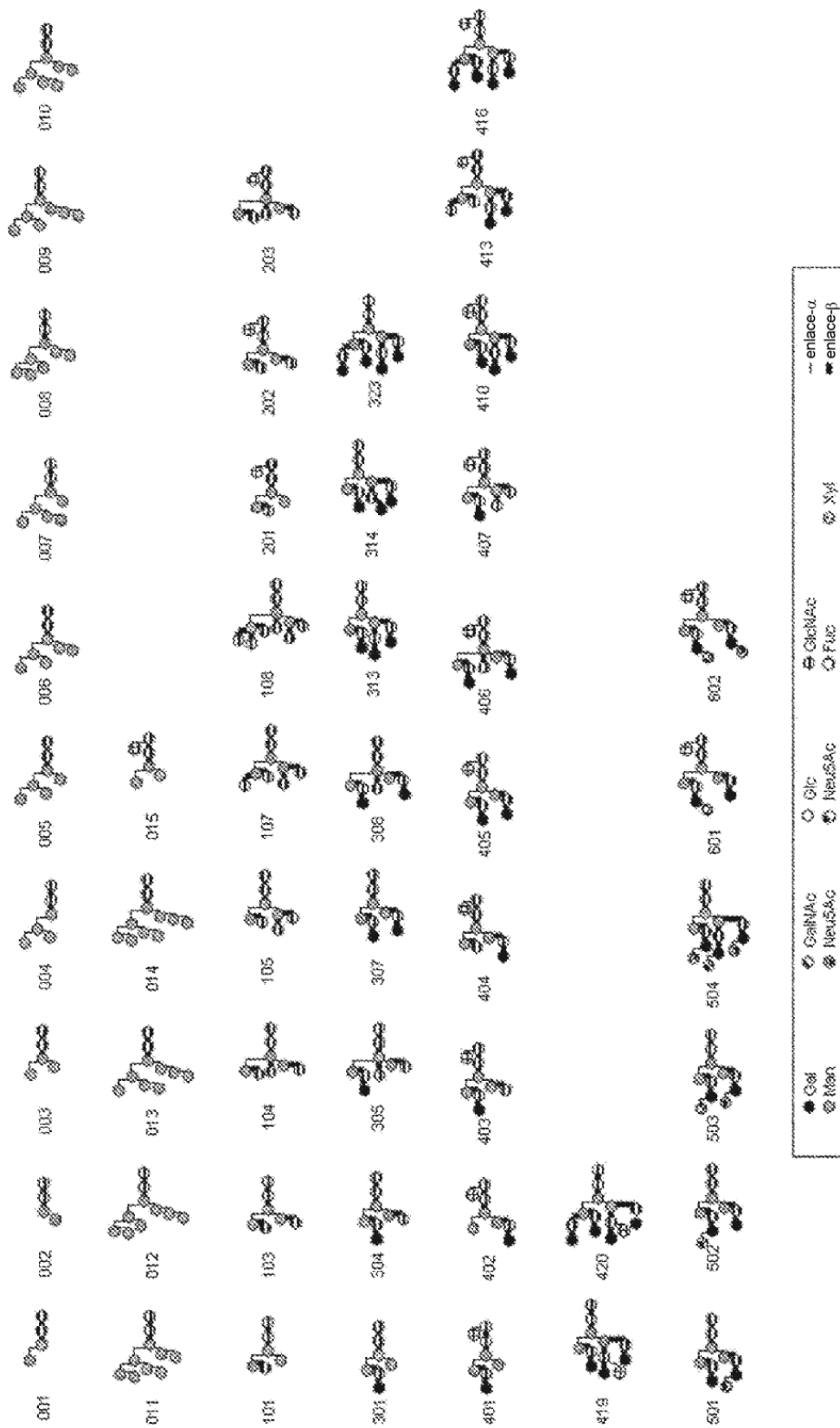


Figura 2

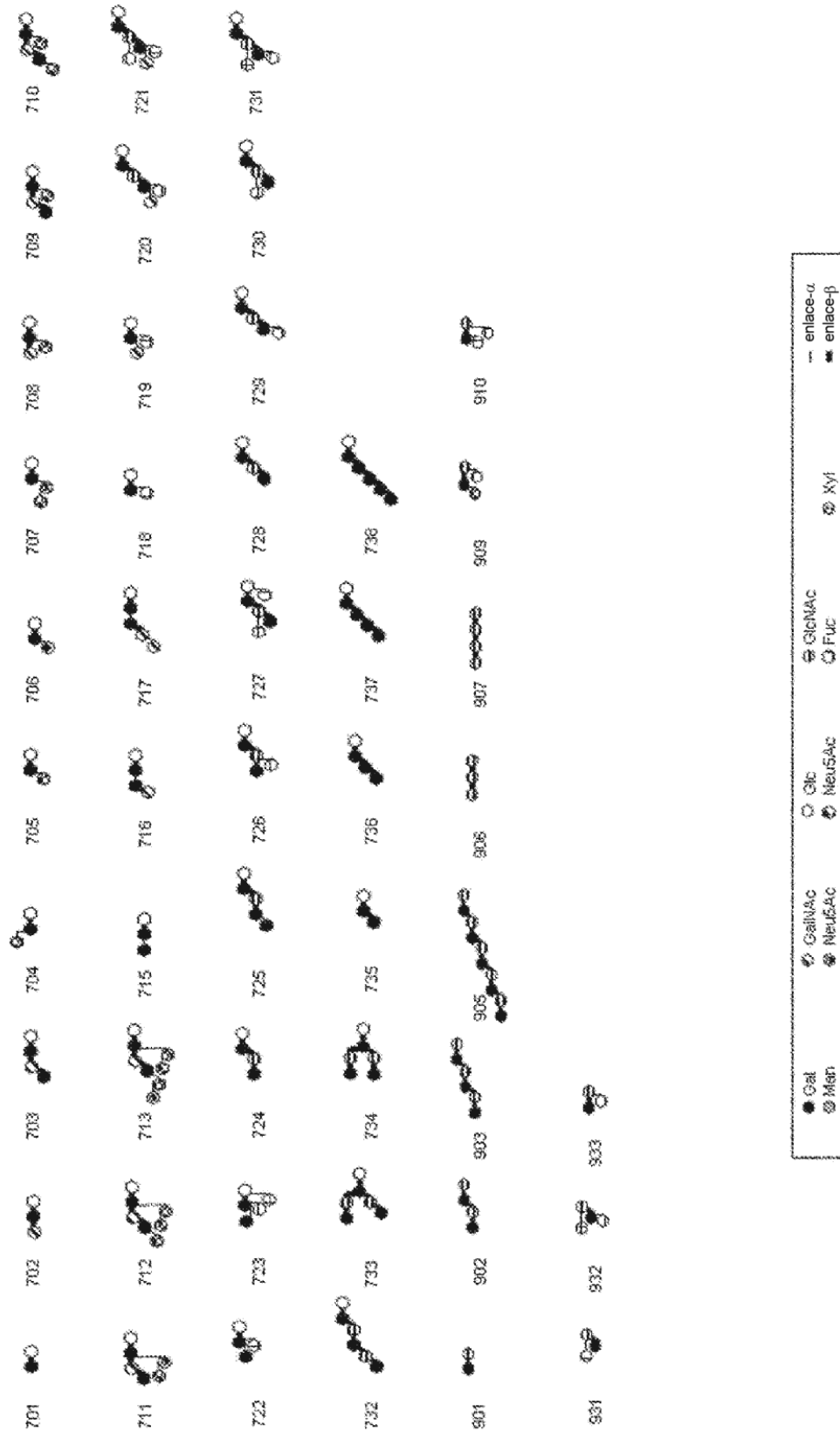


Figura 3

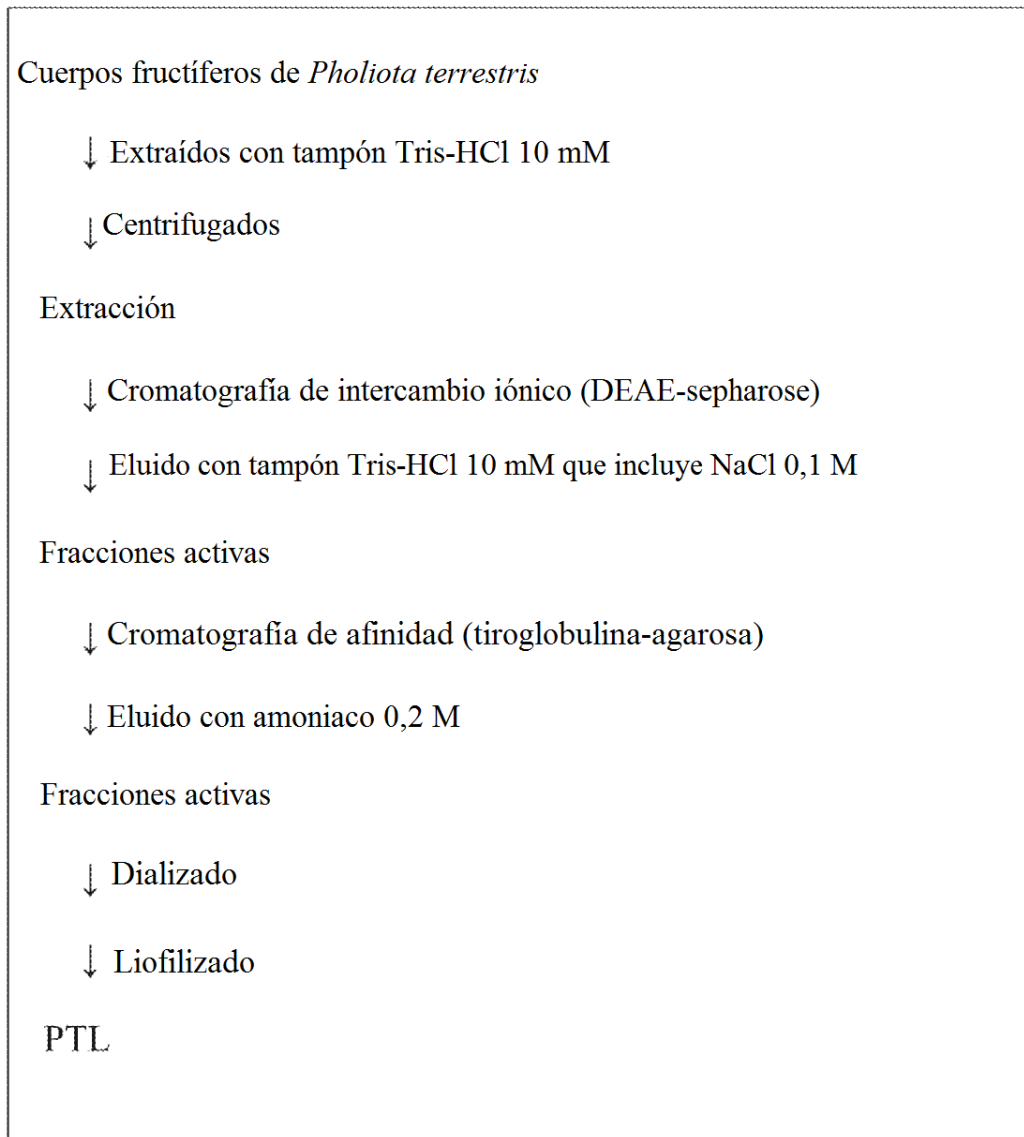


Figura 4

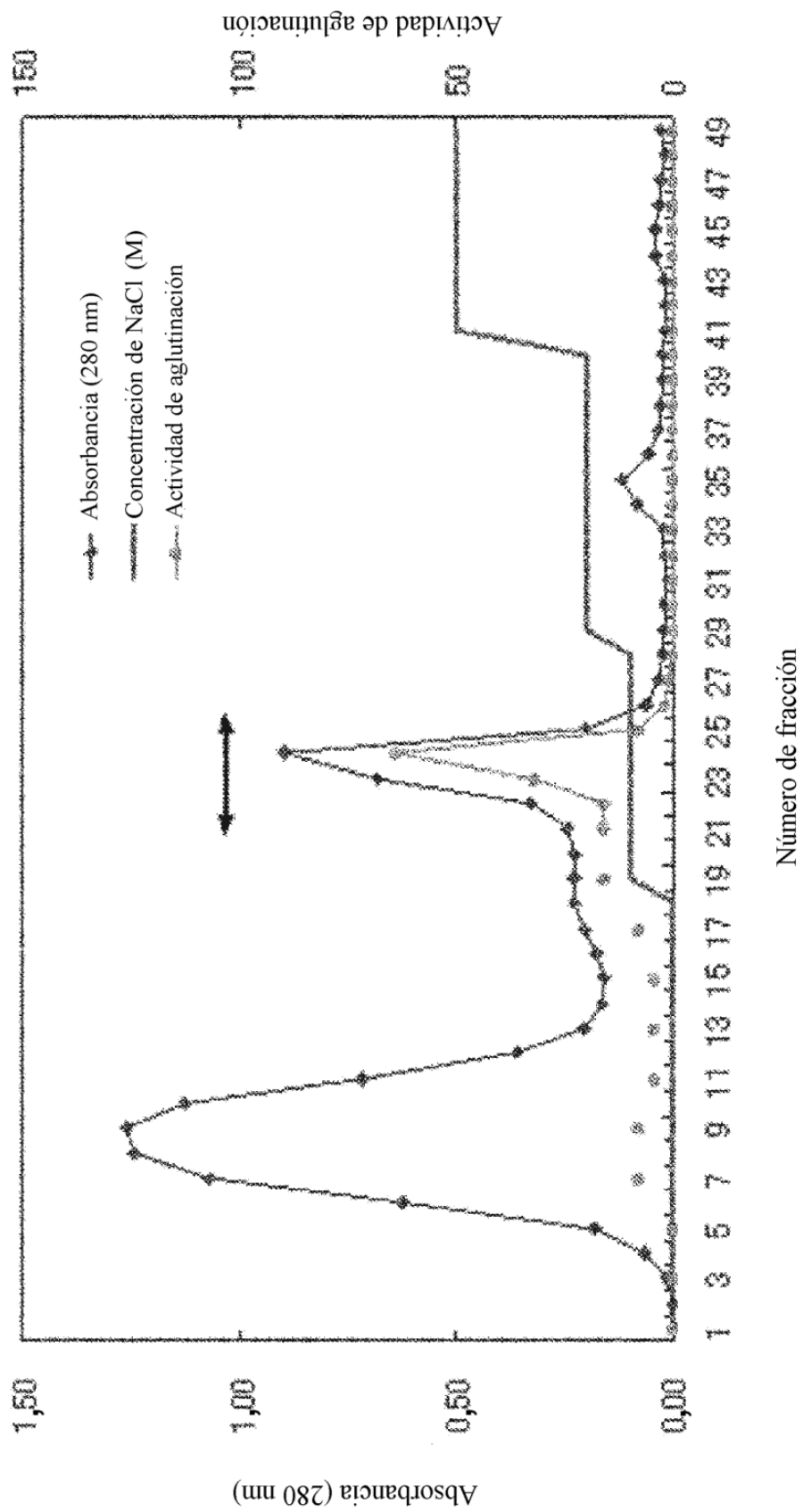


Figura 5

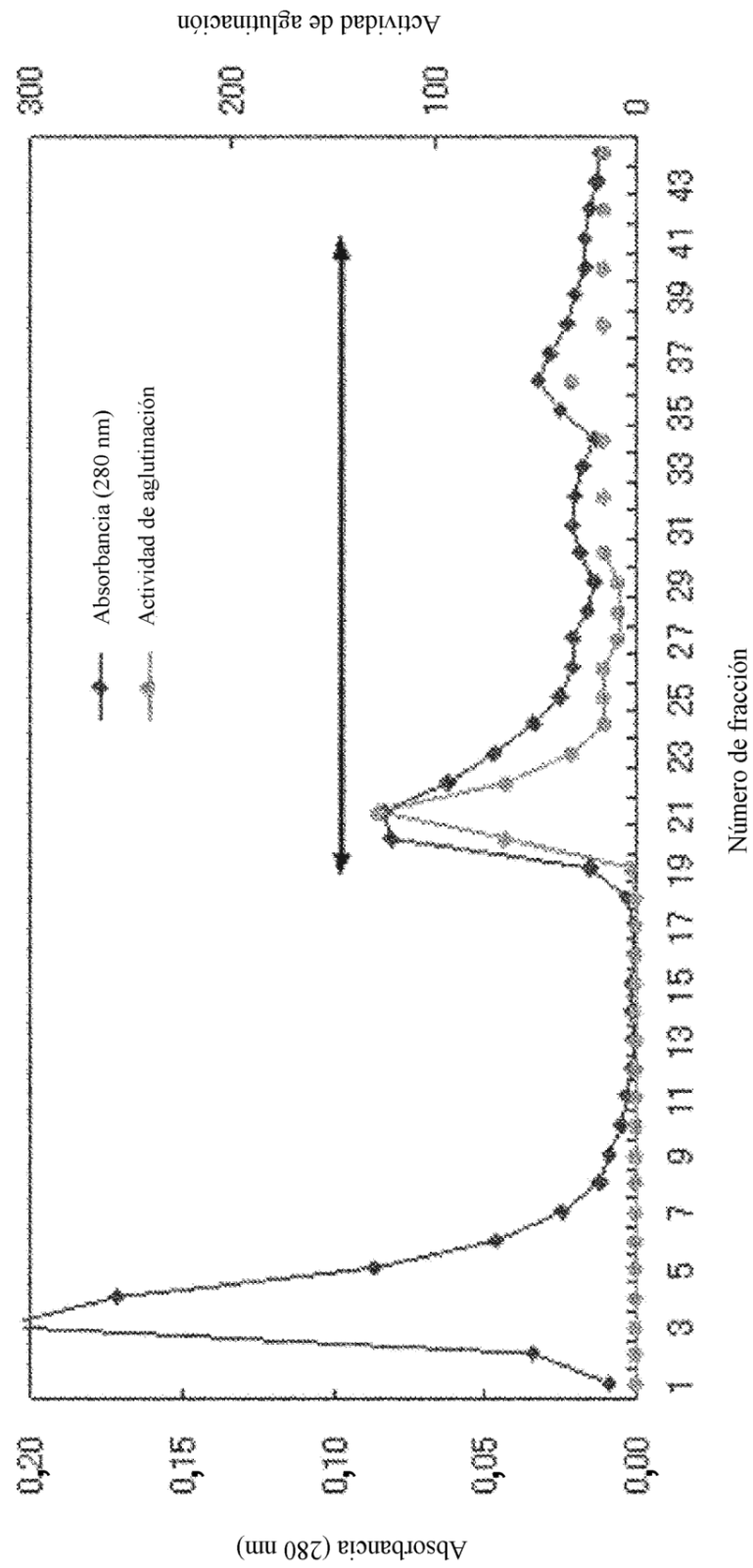


Figura 6

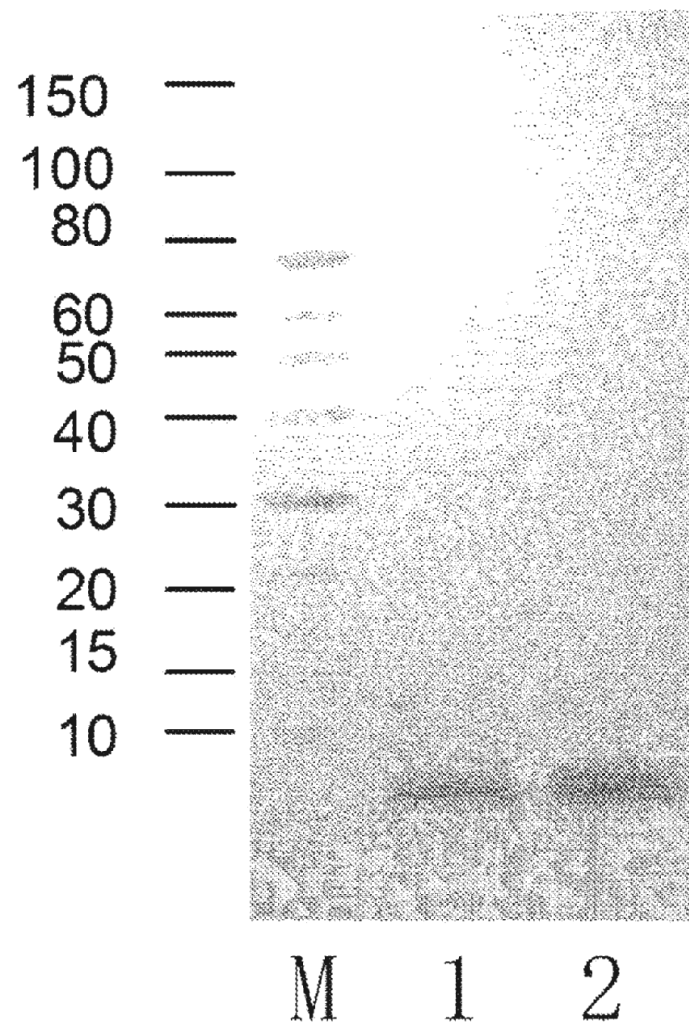


Figura 7

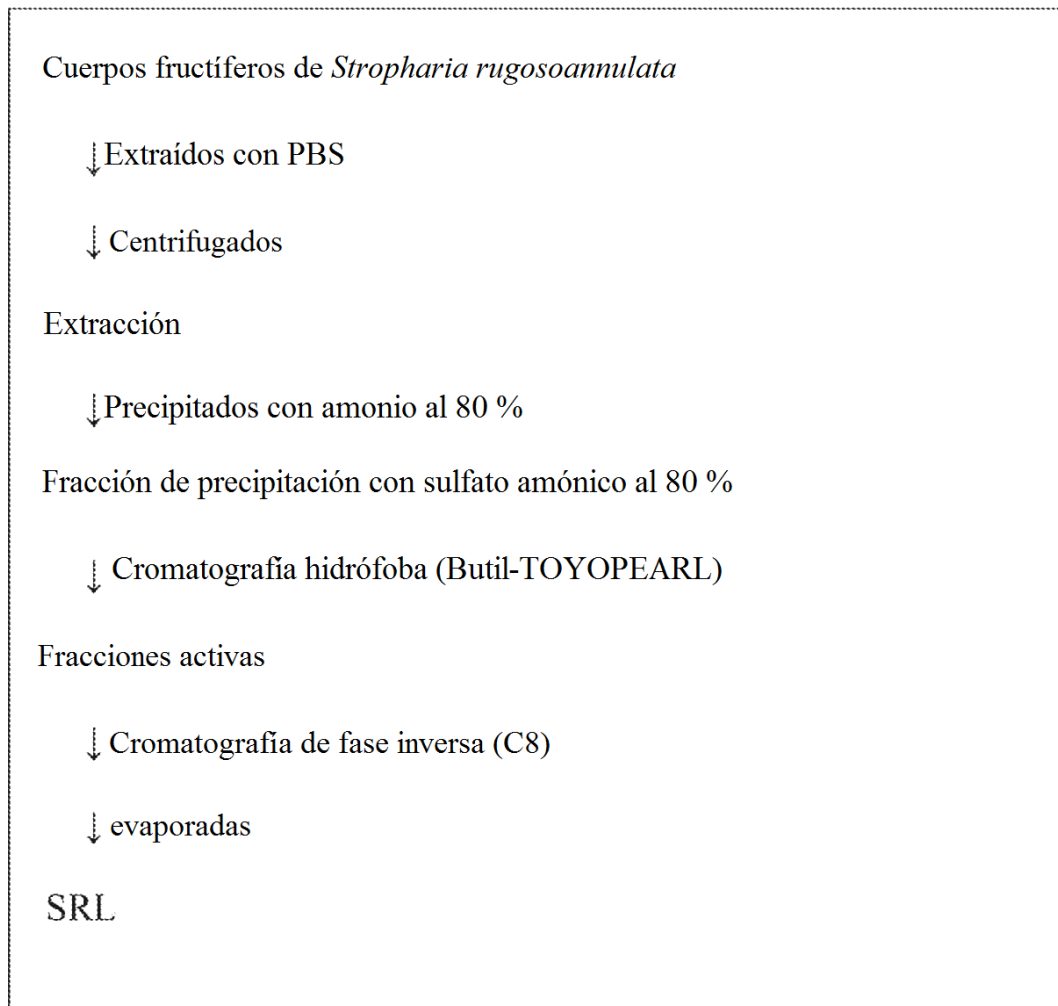


Figura 8

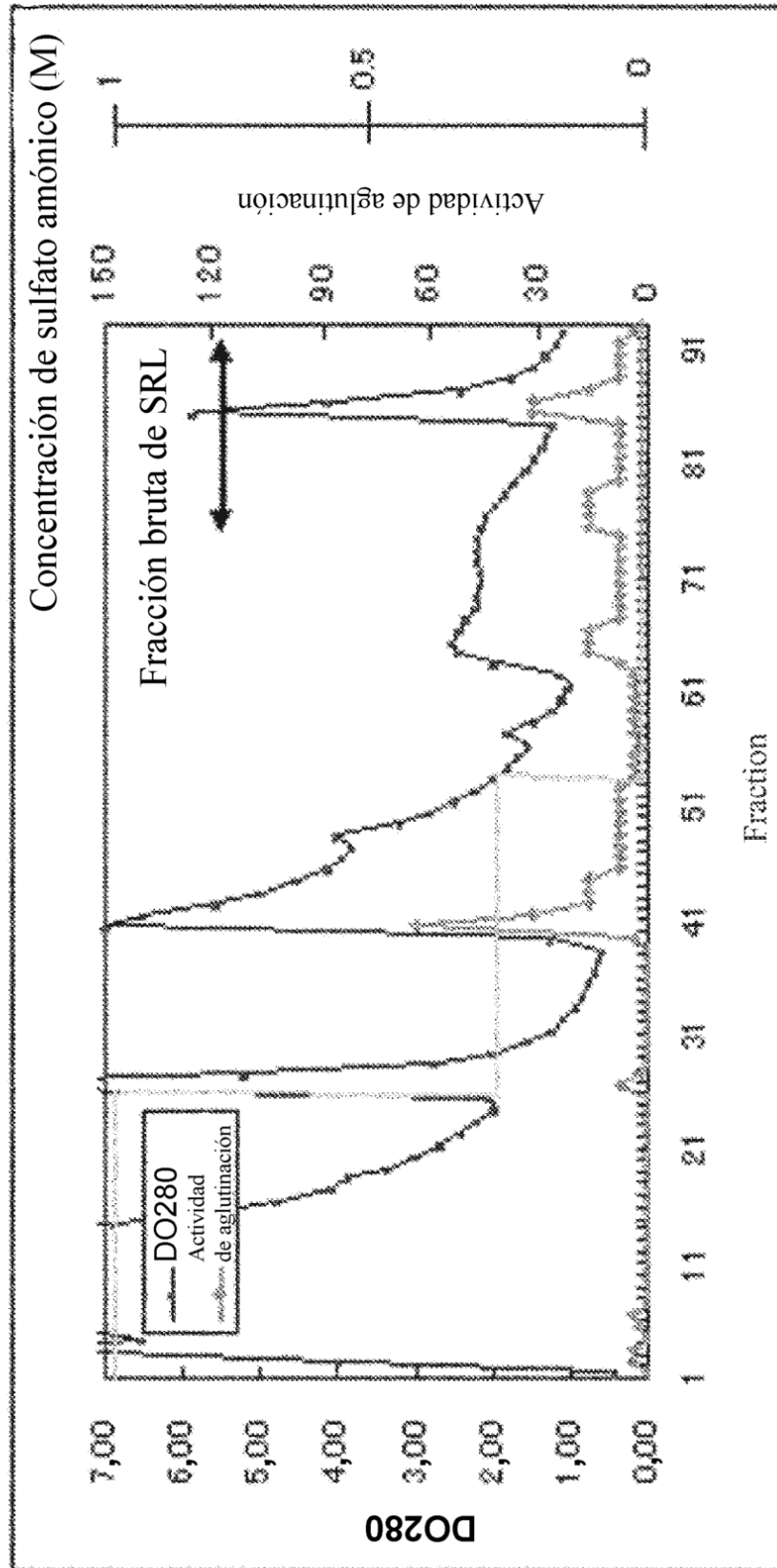


Figura 9

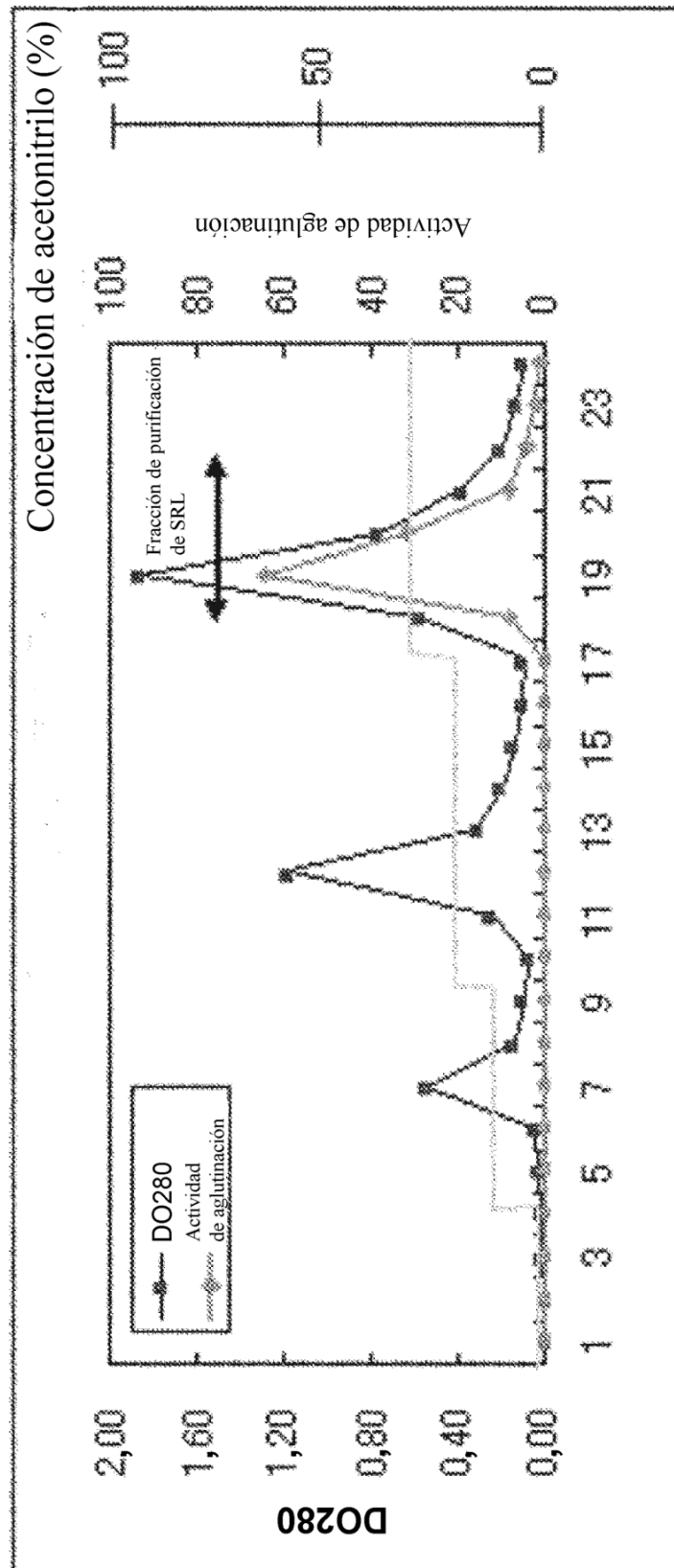


Figura 10

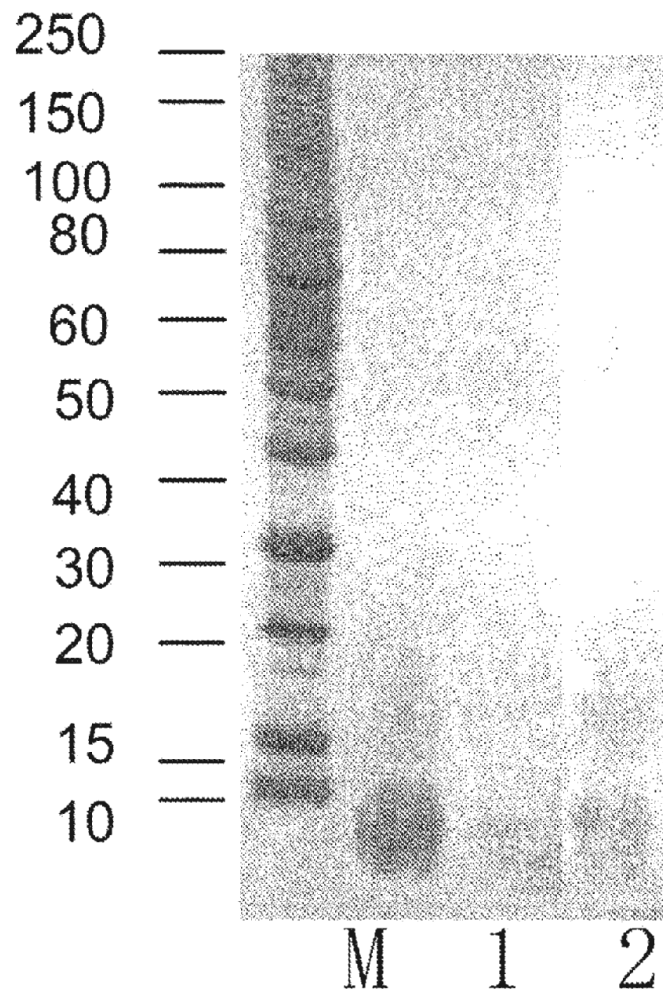


Figura 11

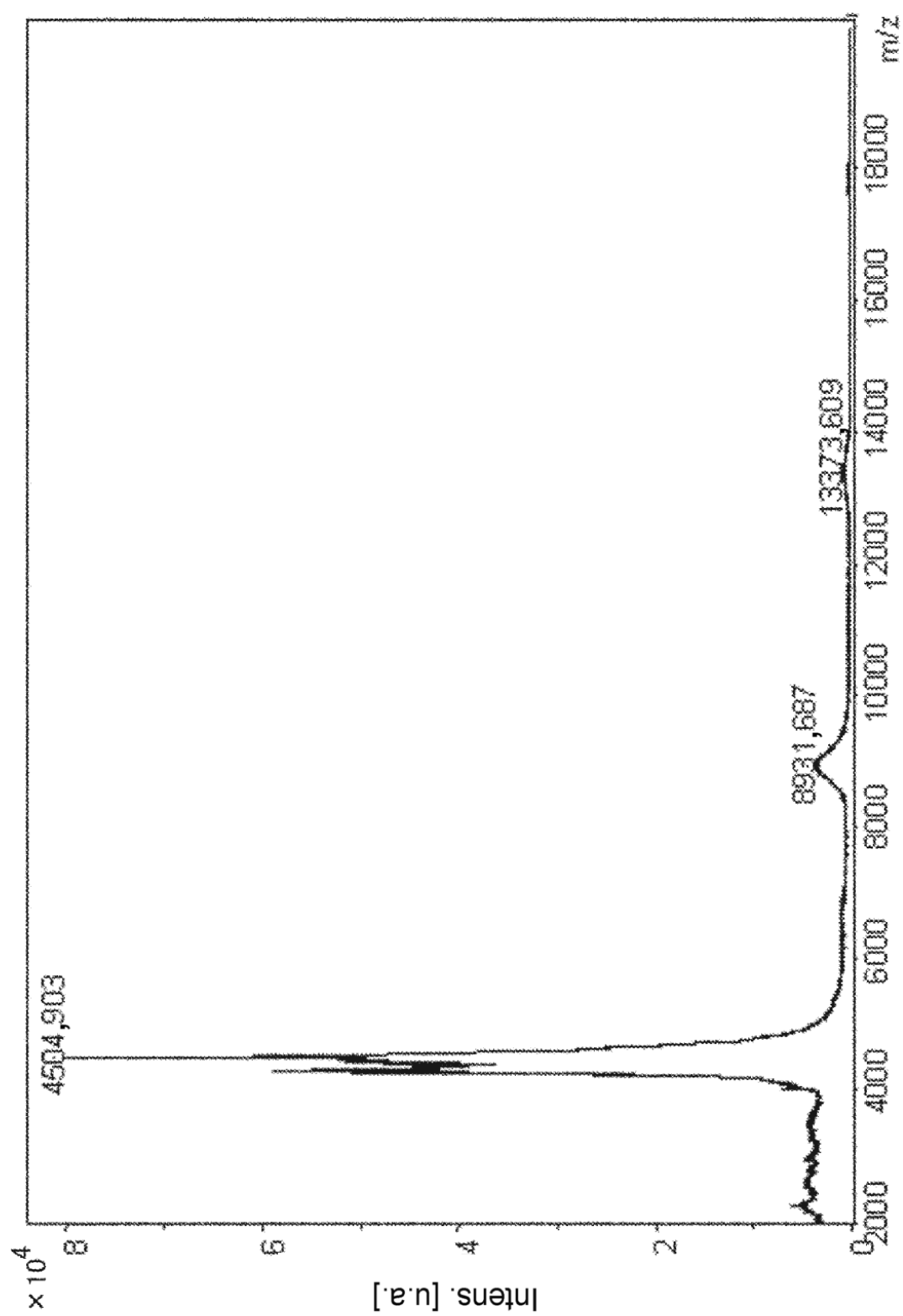


Figura 12

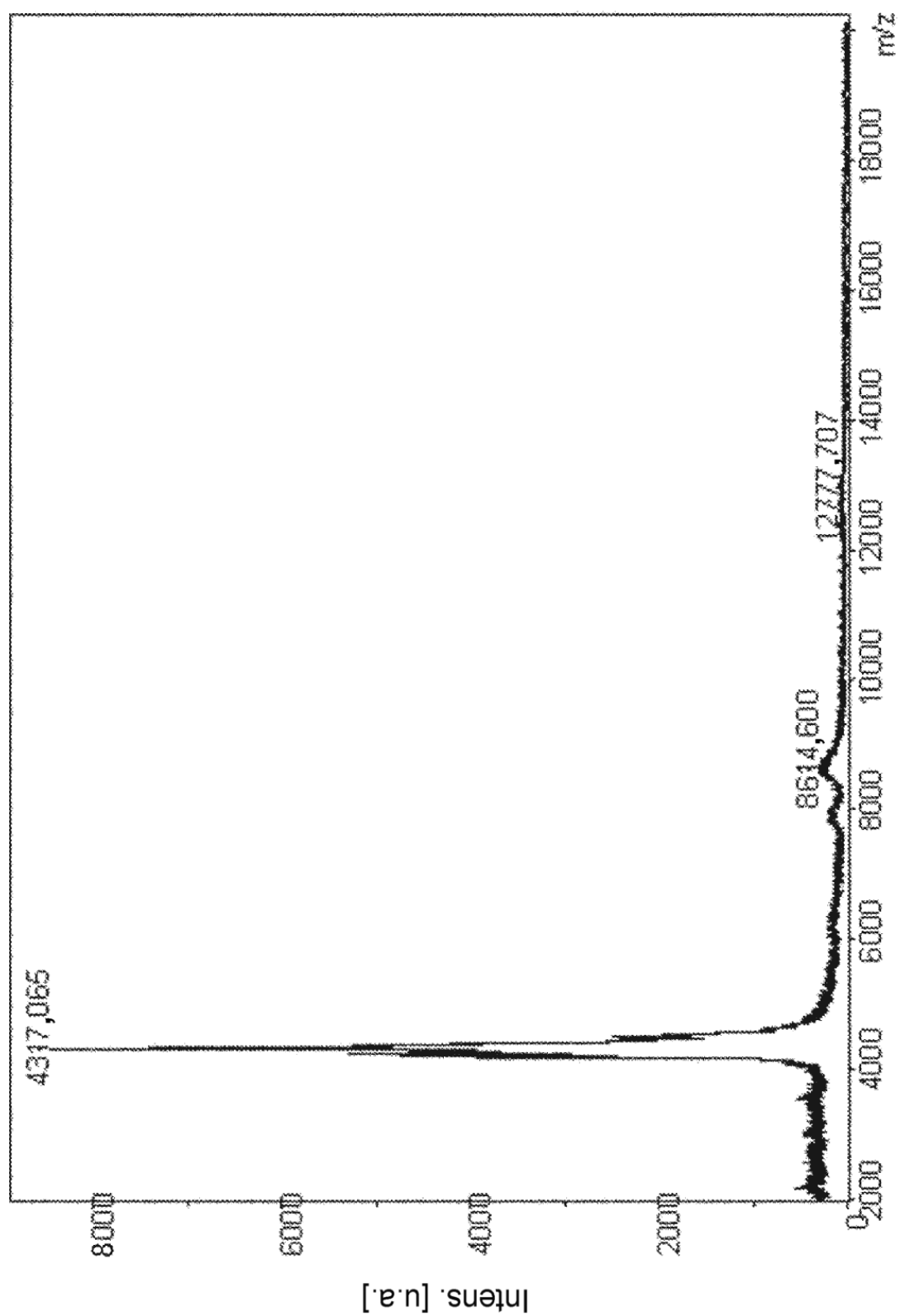
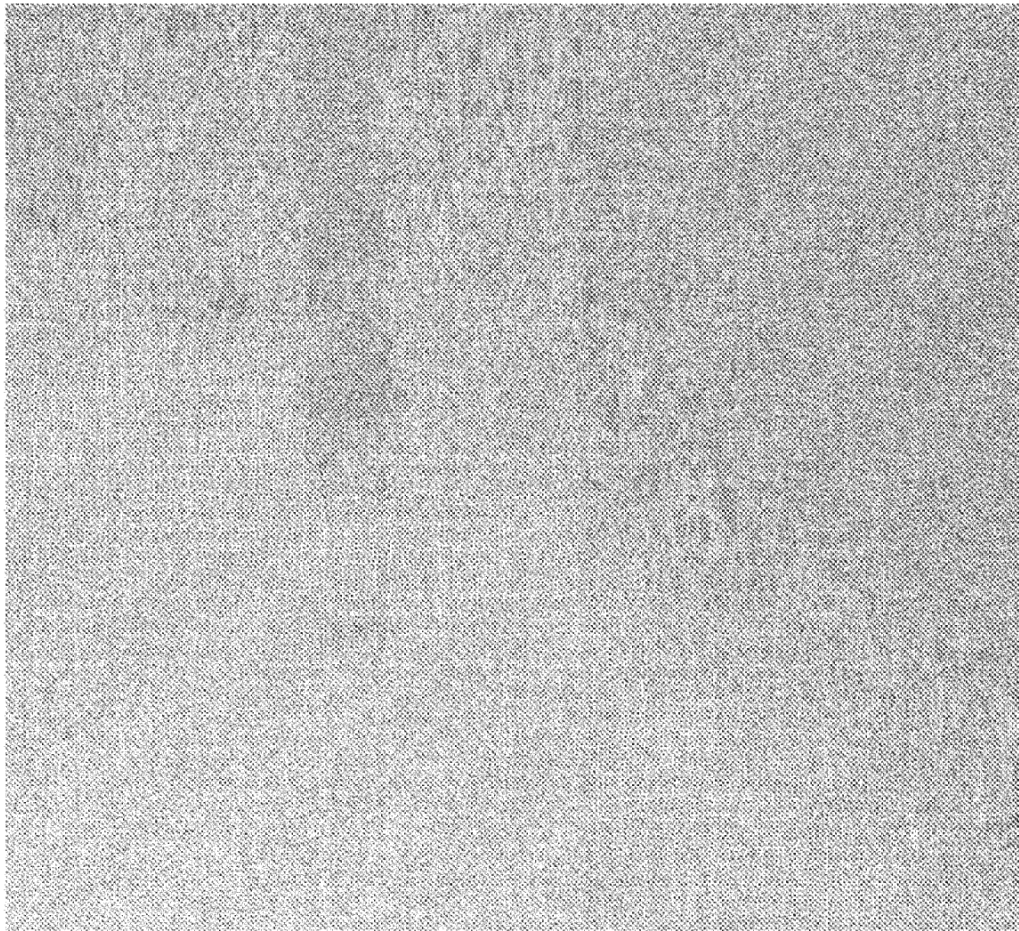


Figura 13



1 2 3 4 5 6 0

Figura 14



1 2 3 4 5 6 0

Figura 15

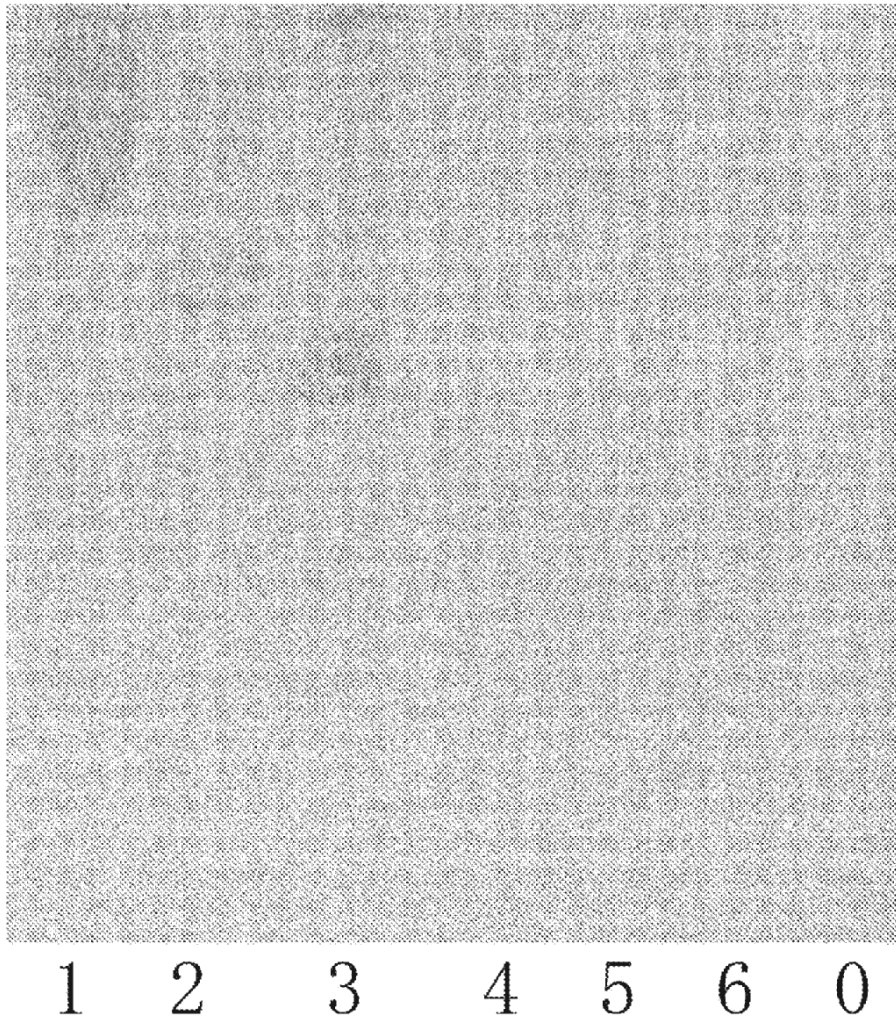
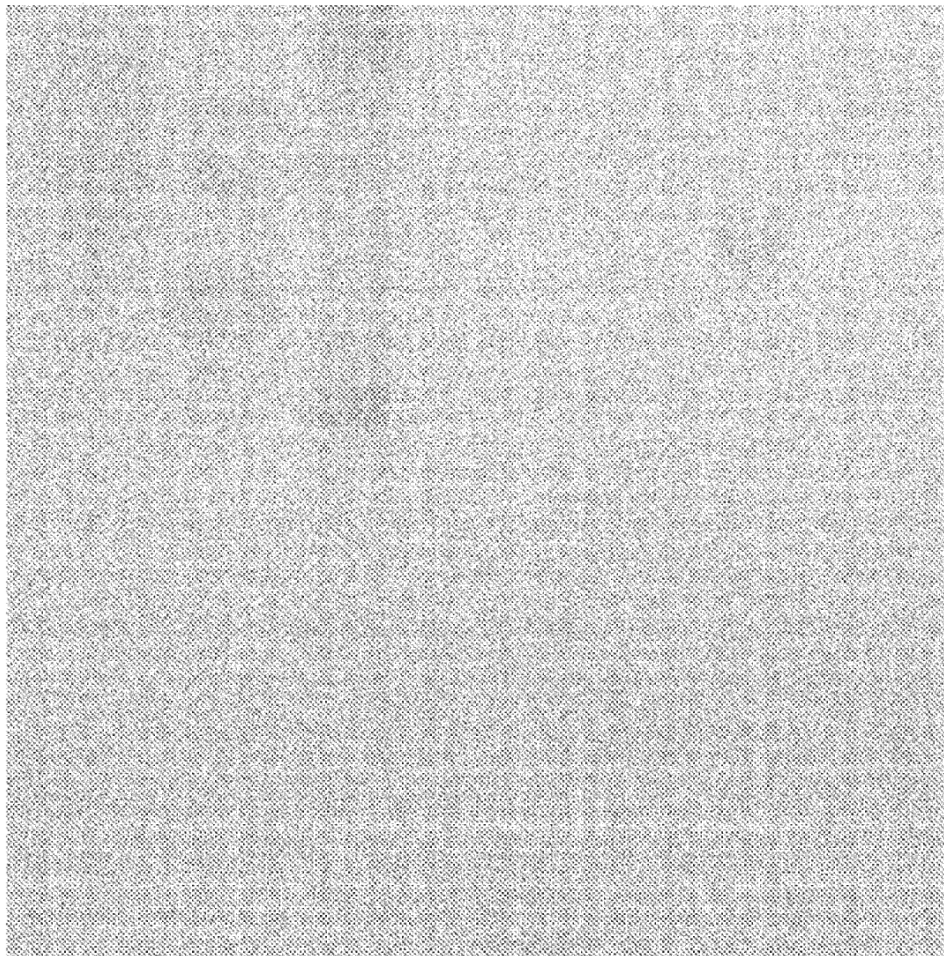
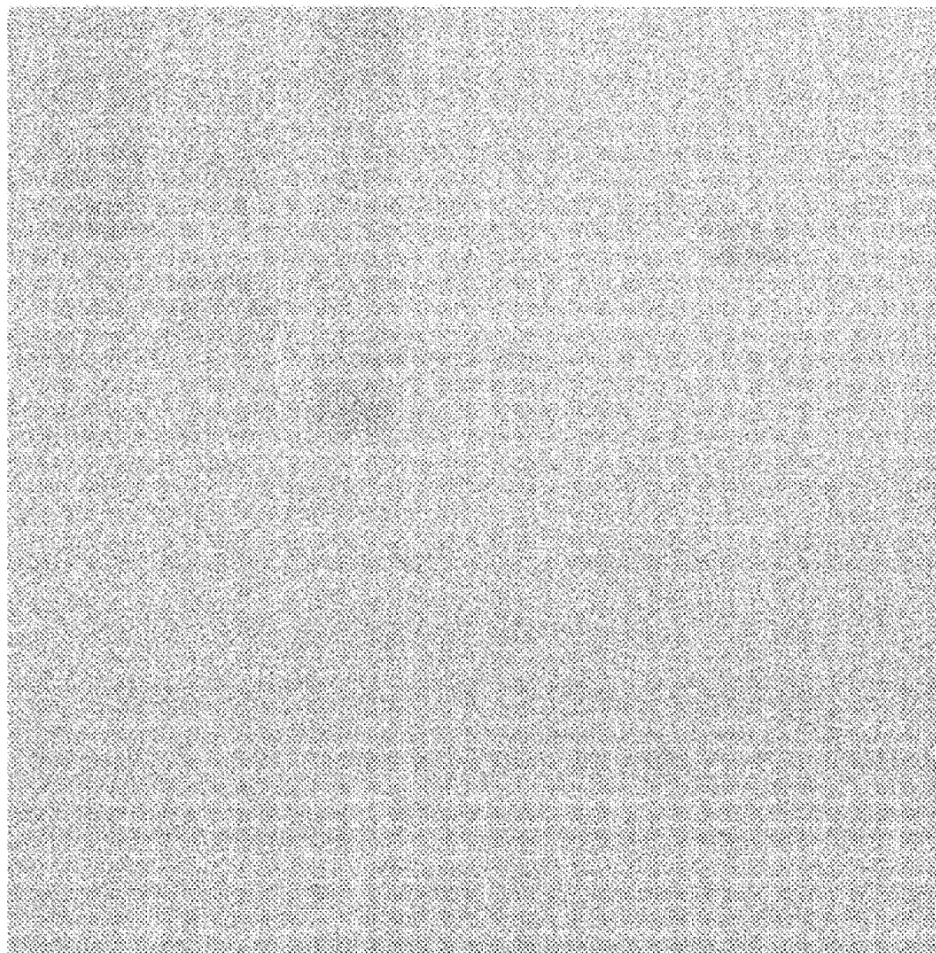


Figura 16



1 2 3 4 5 6 0

Figura 17



1 2 3 4 5 6 0

Figura 18

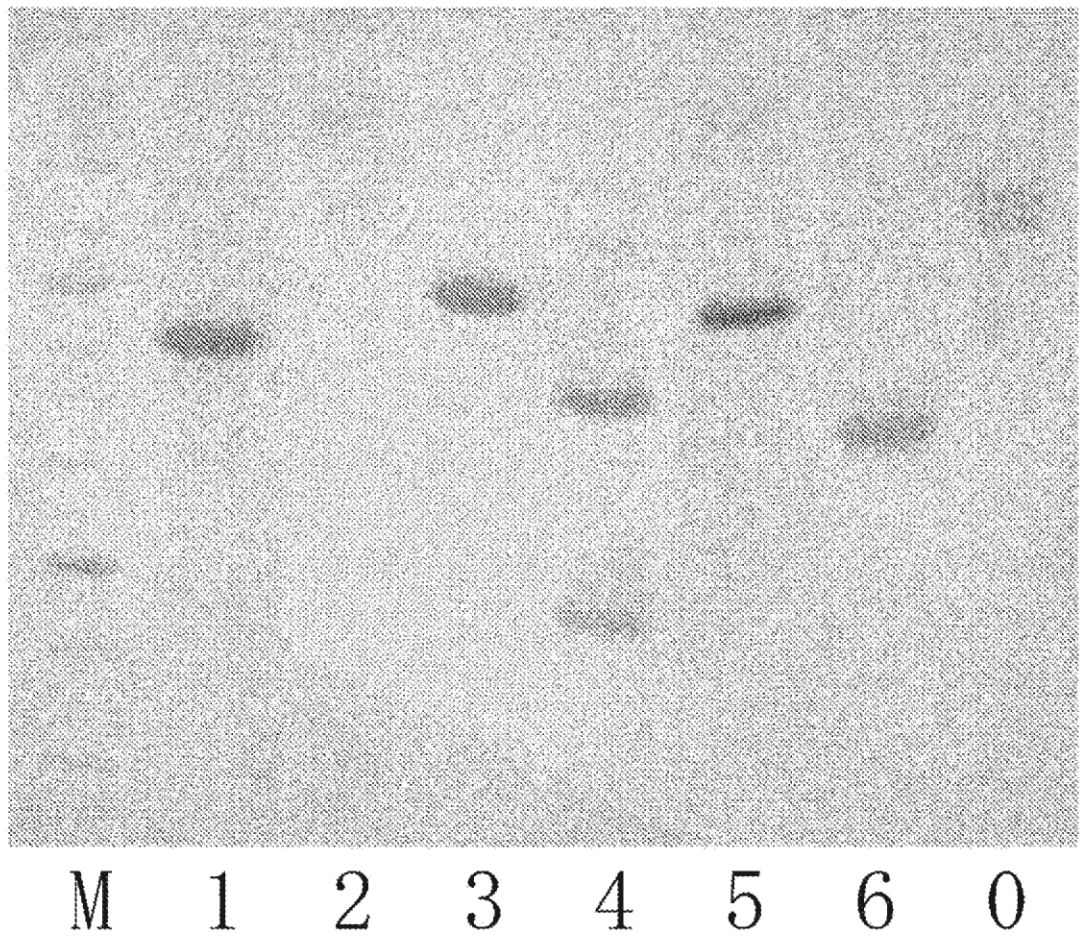


Figura 19

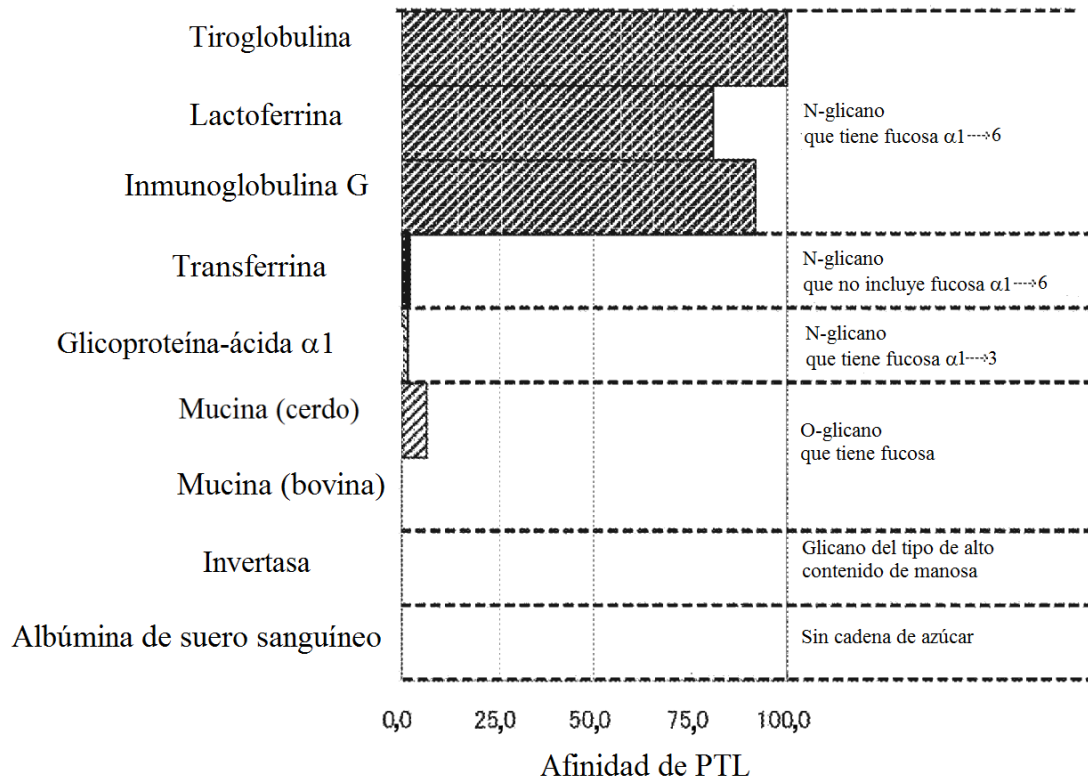


Figura 20

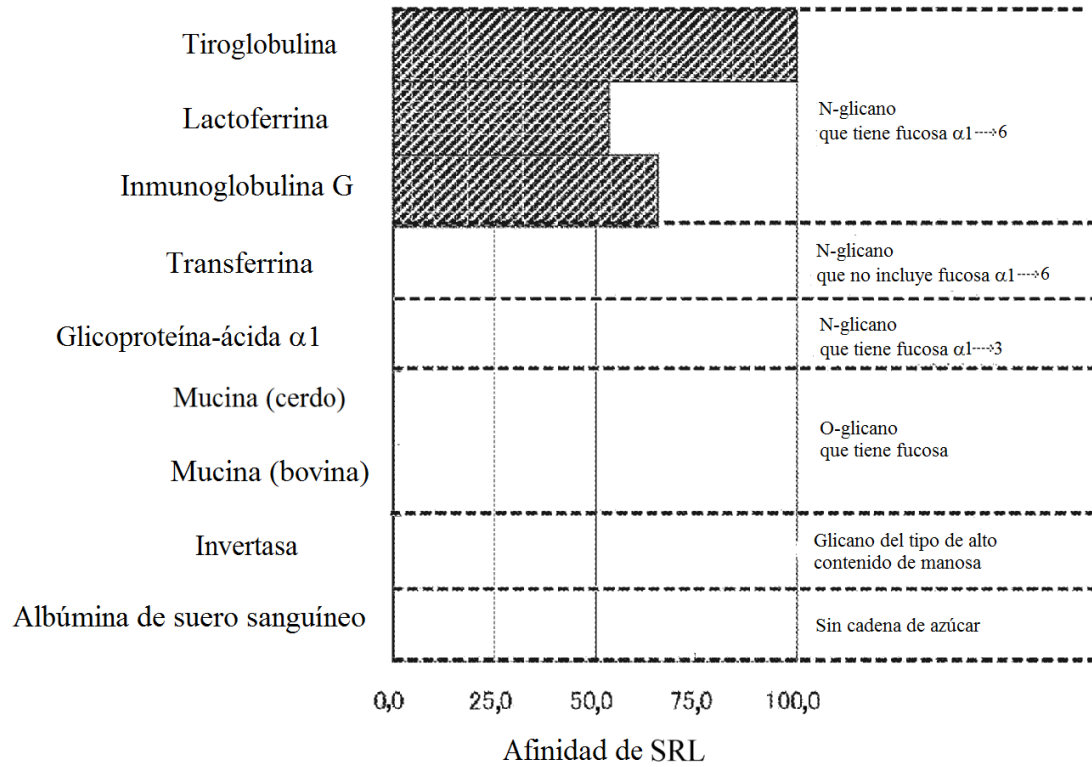


Figura 21

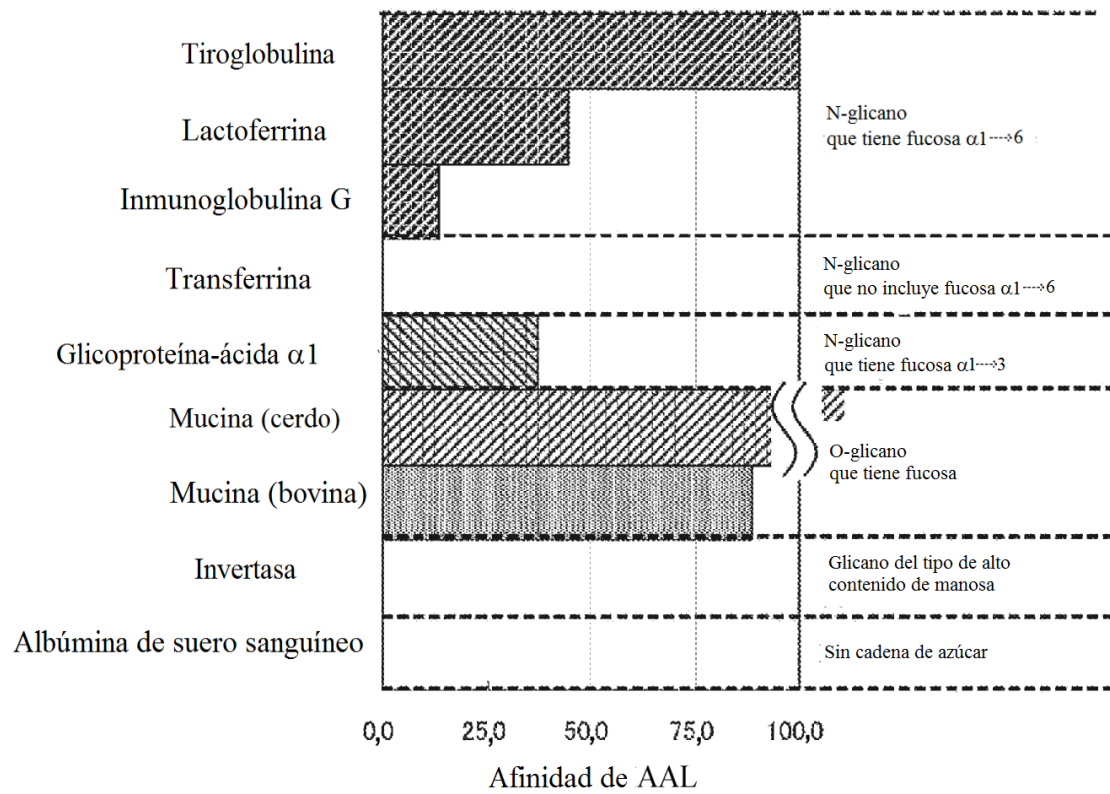


Figura 22

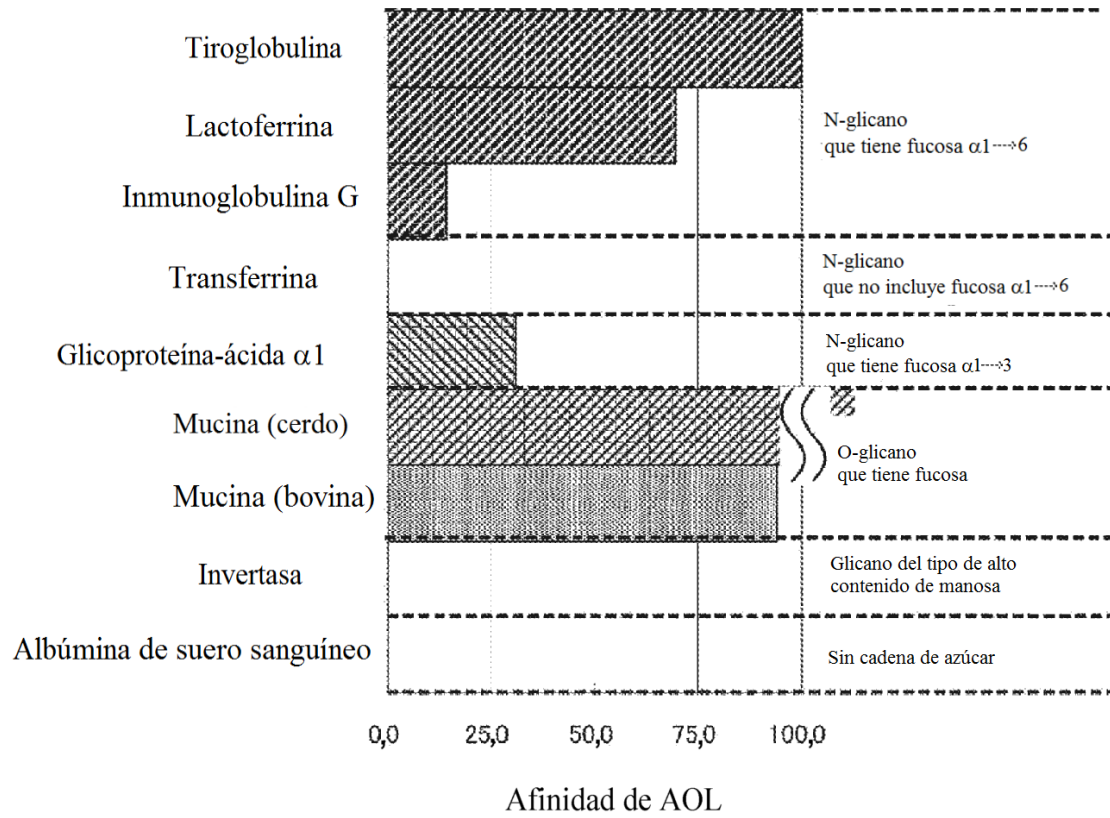


Figura 23

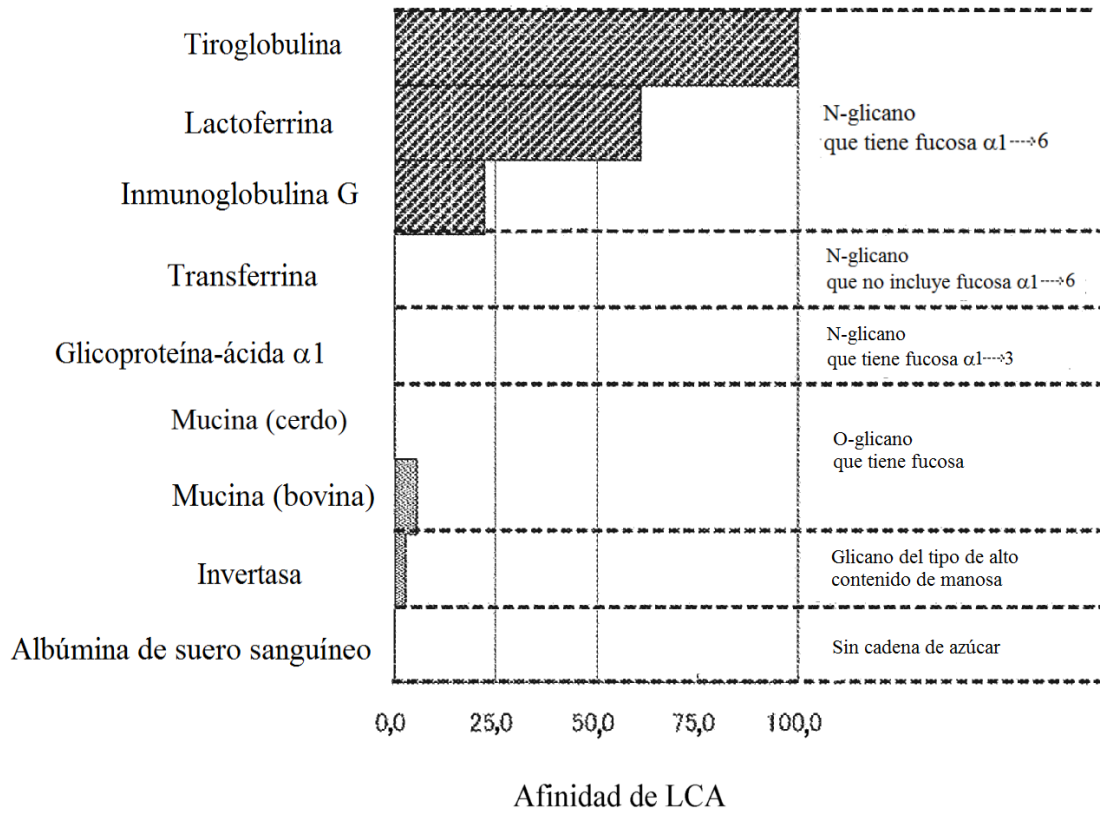


Figura 24

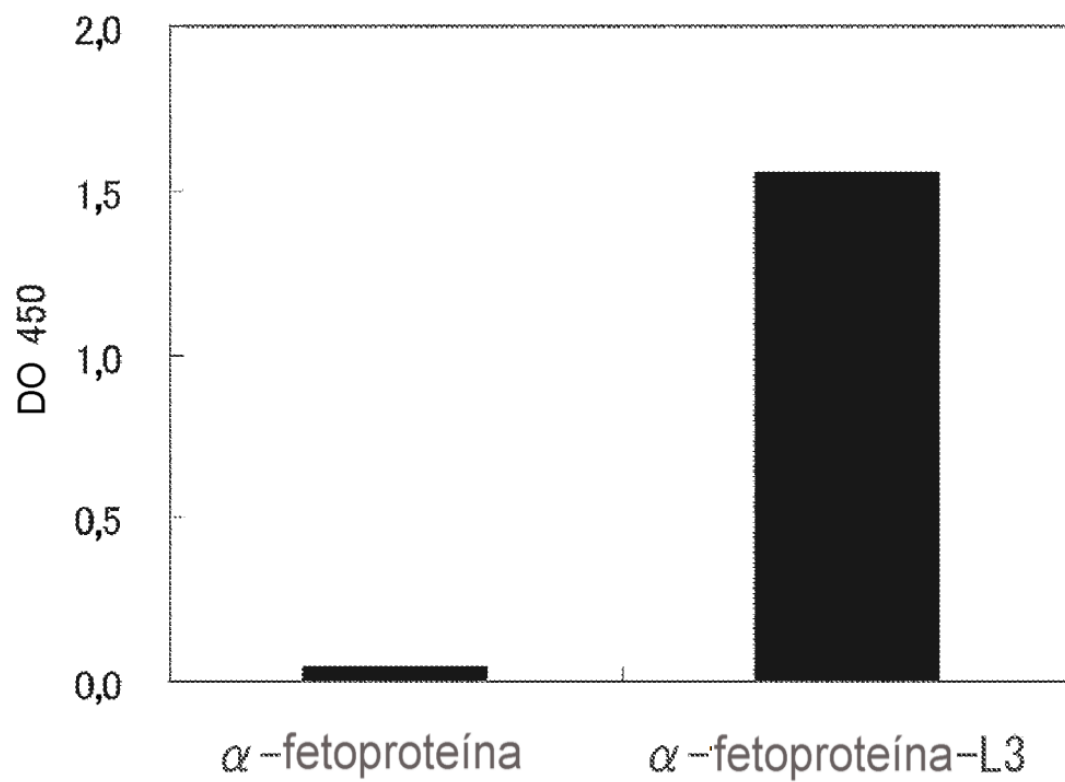


Figura 25

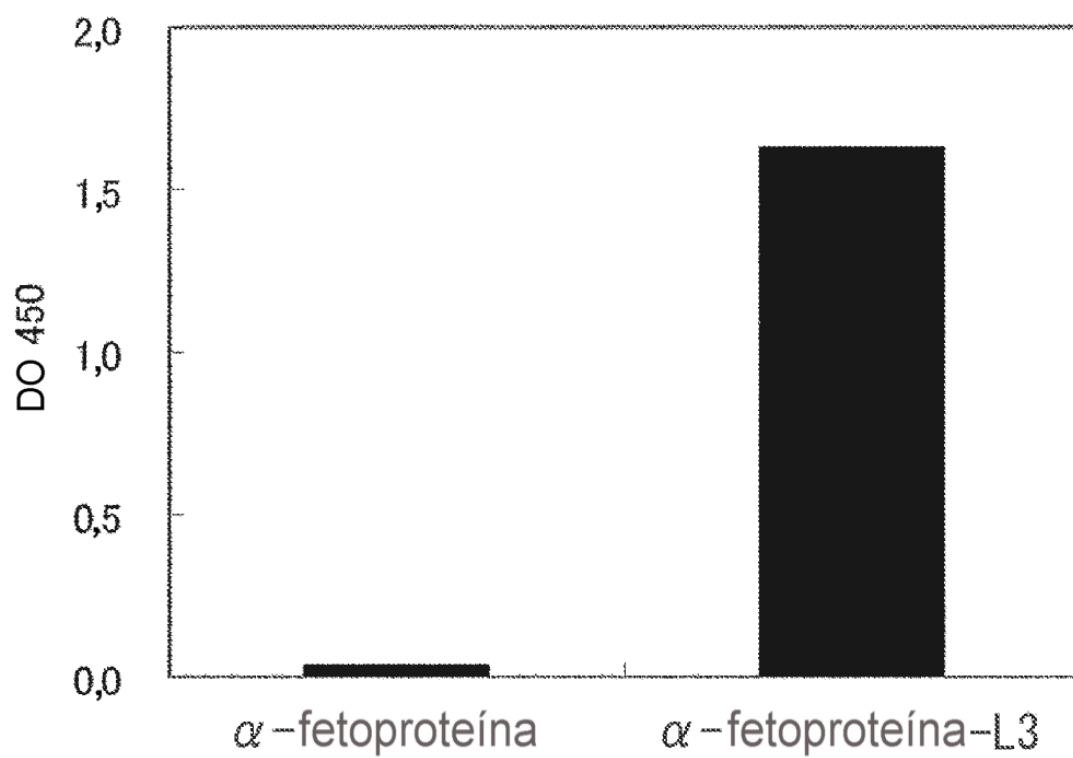


Figura 26

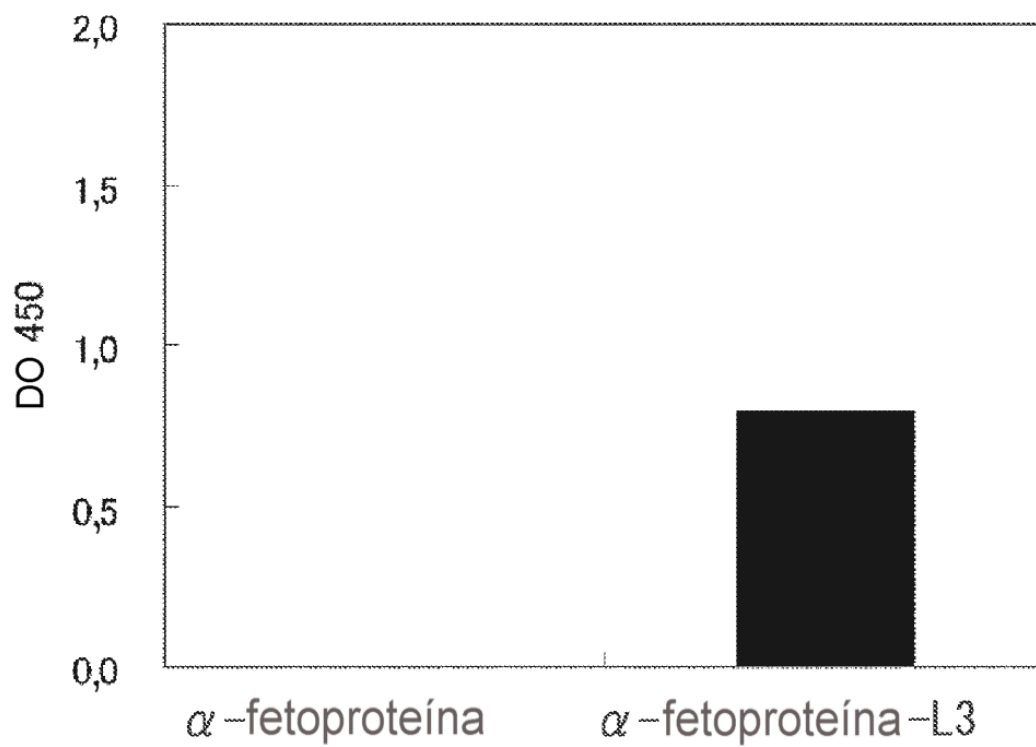


Figura 27

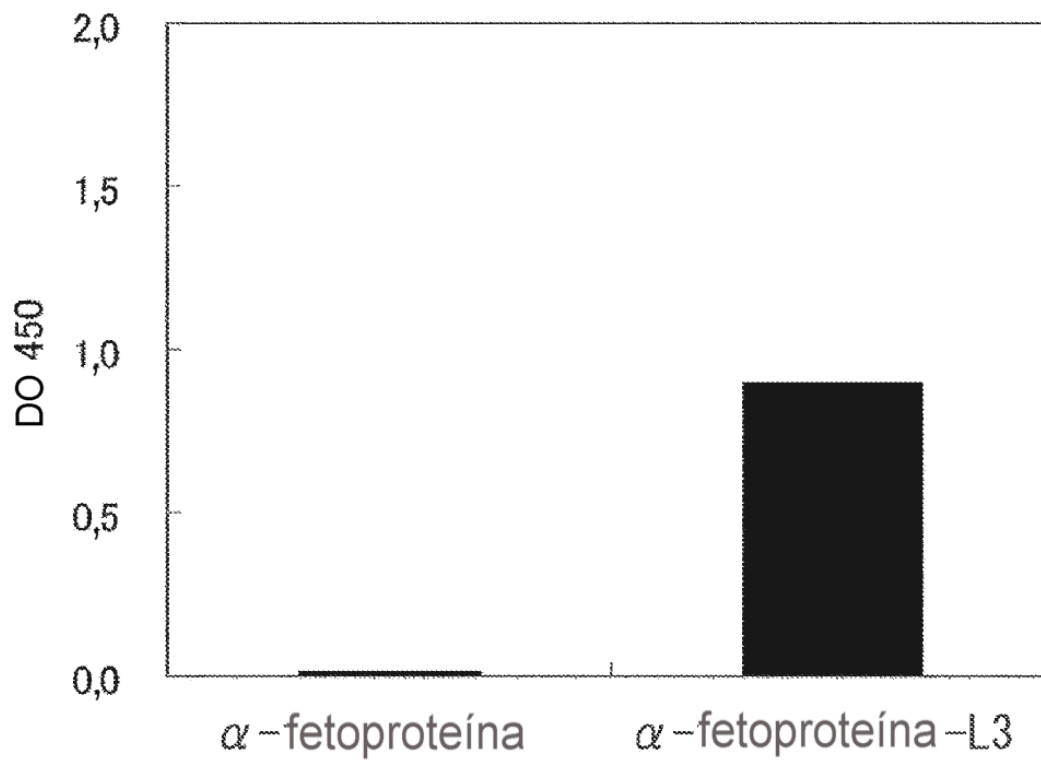


Figura 28

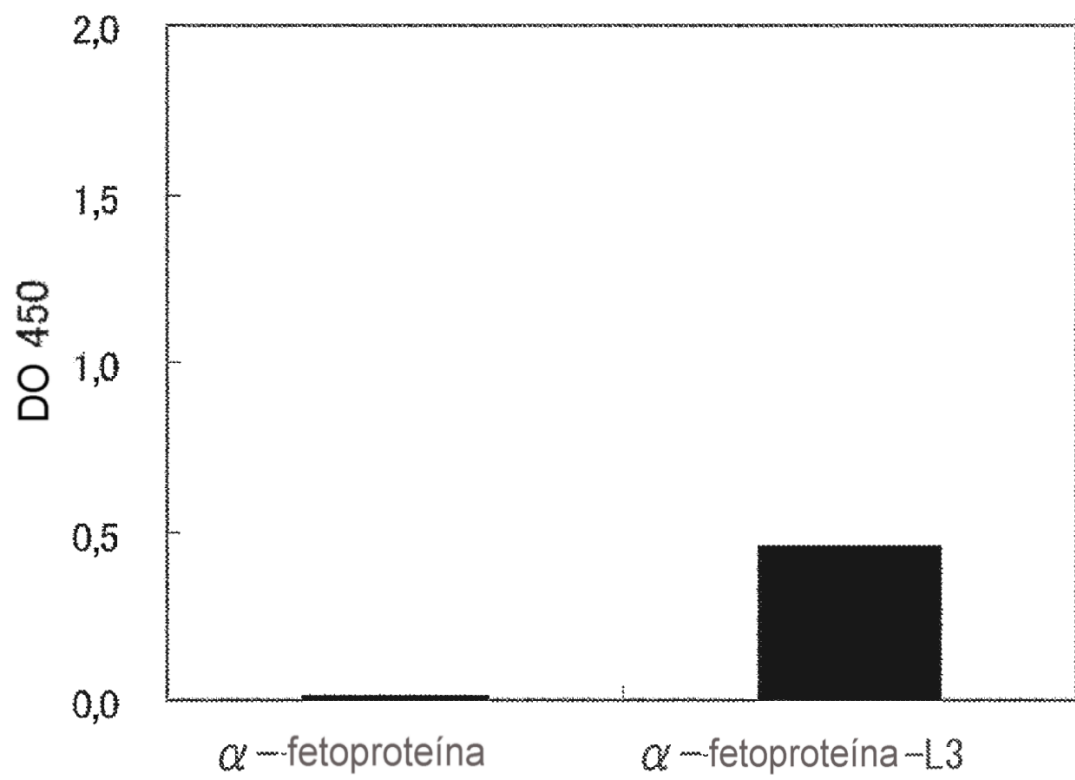


Figura 29

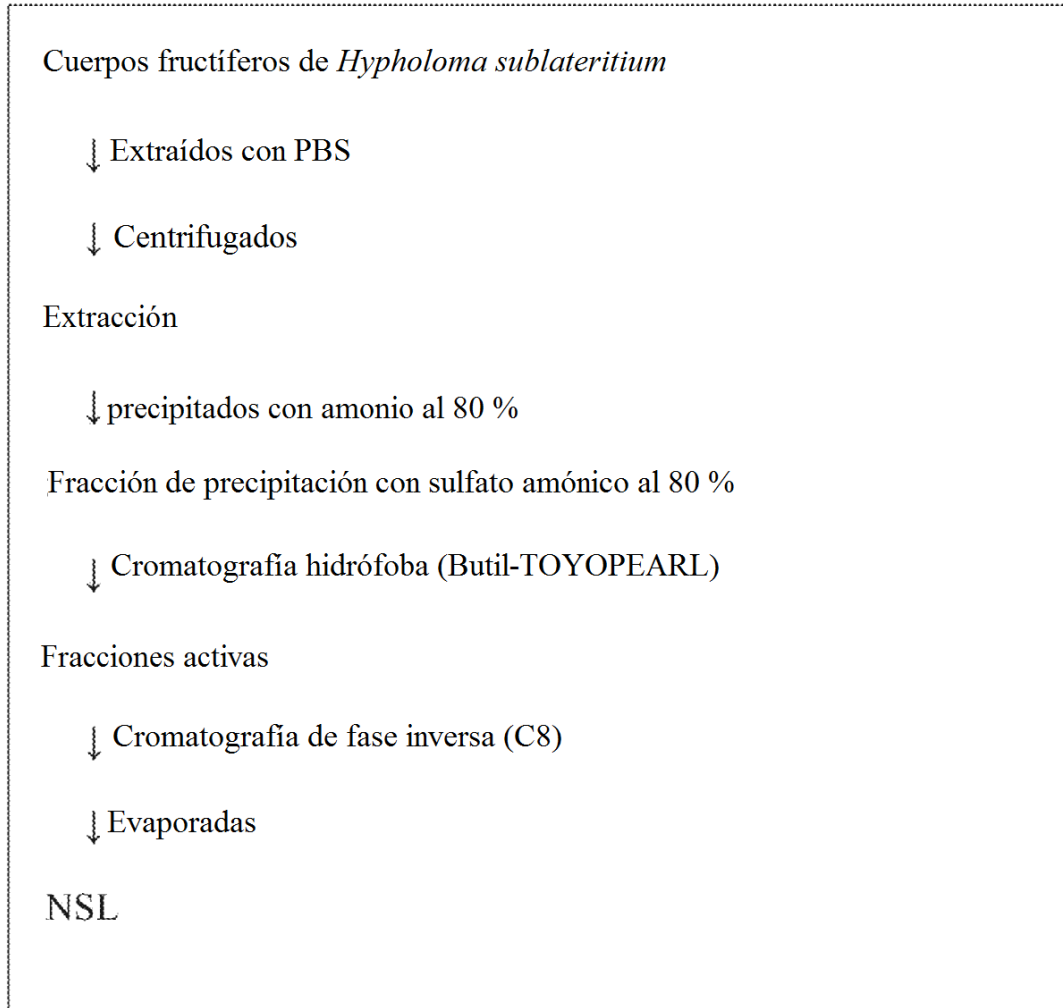


Figura 30

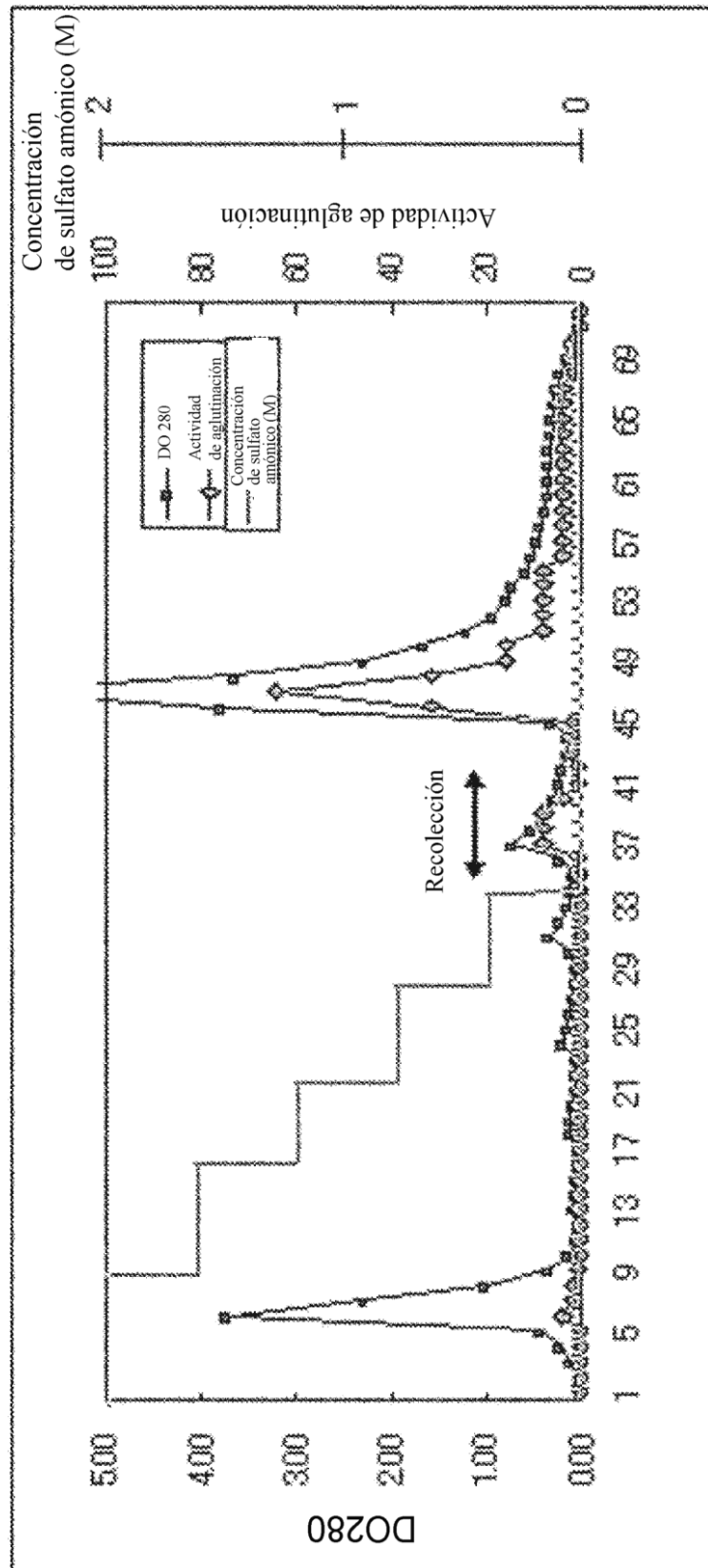


Figura 31

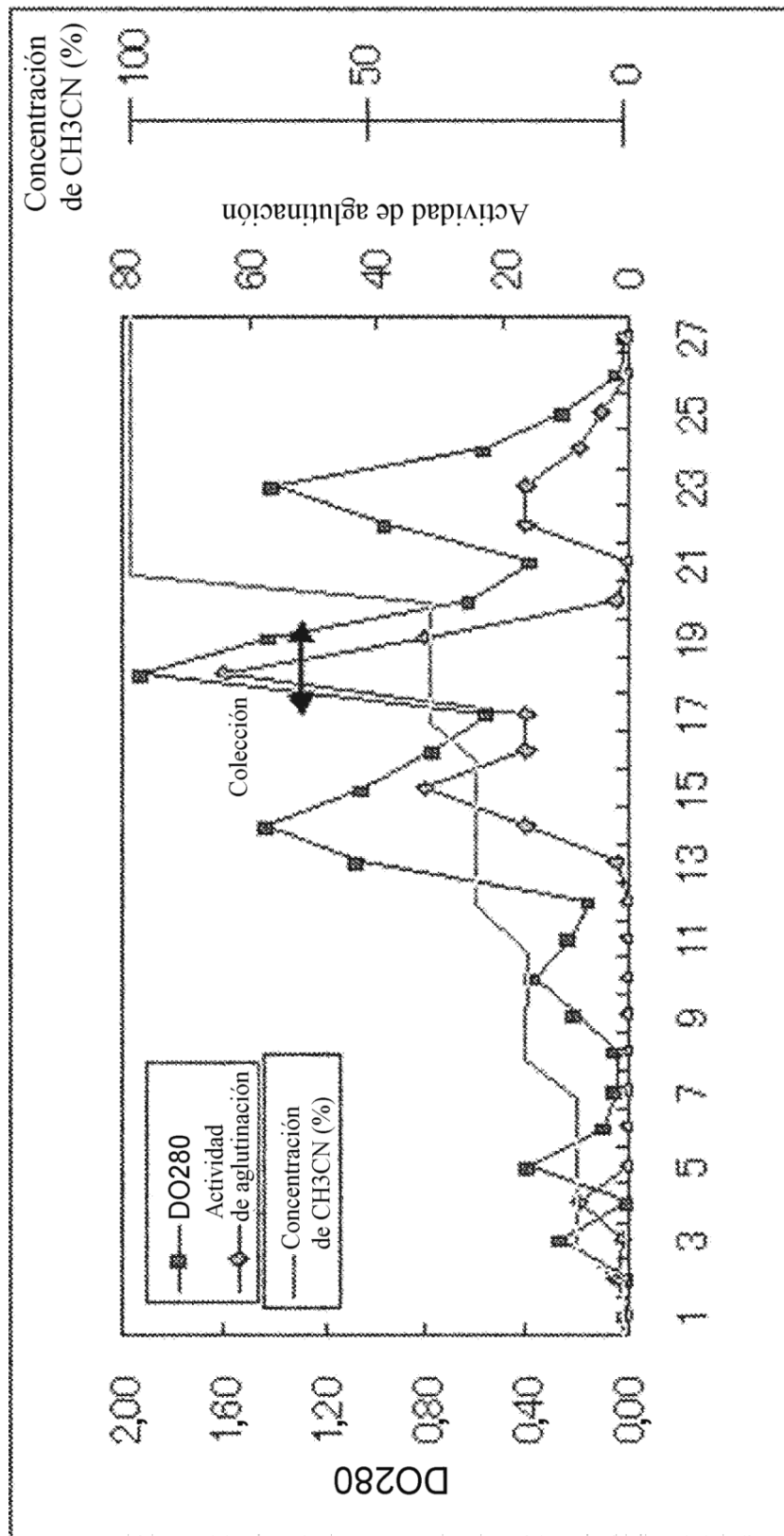


Figura 32

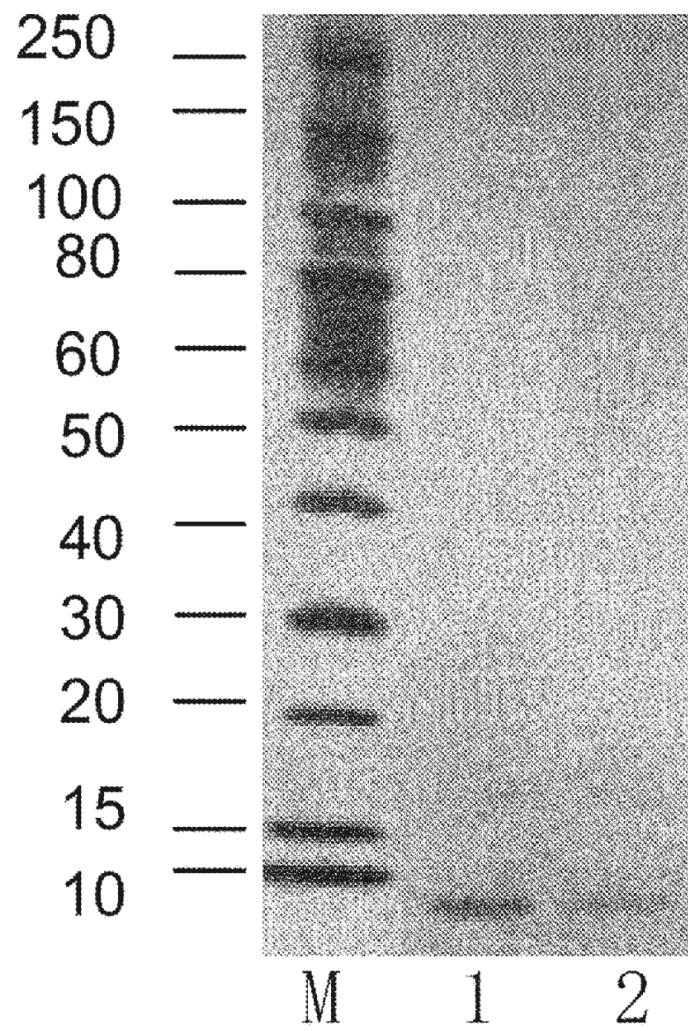


Figura 33

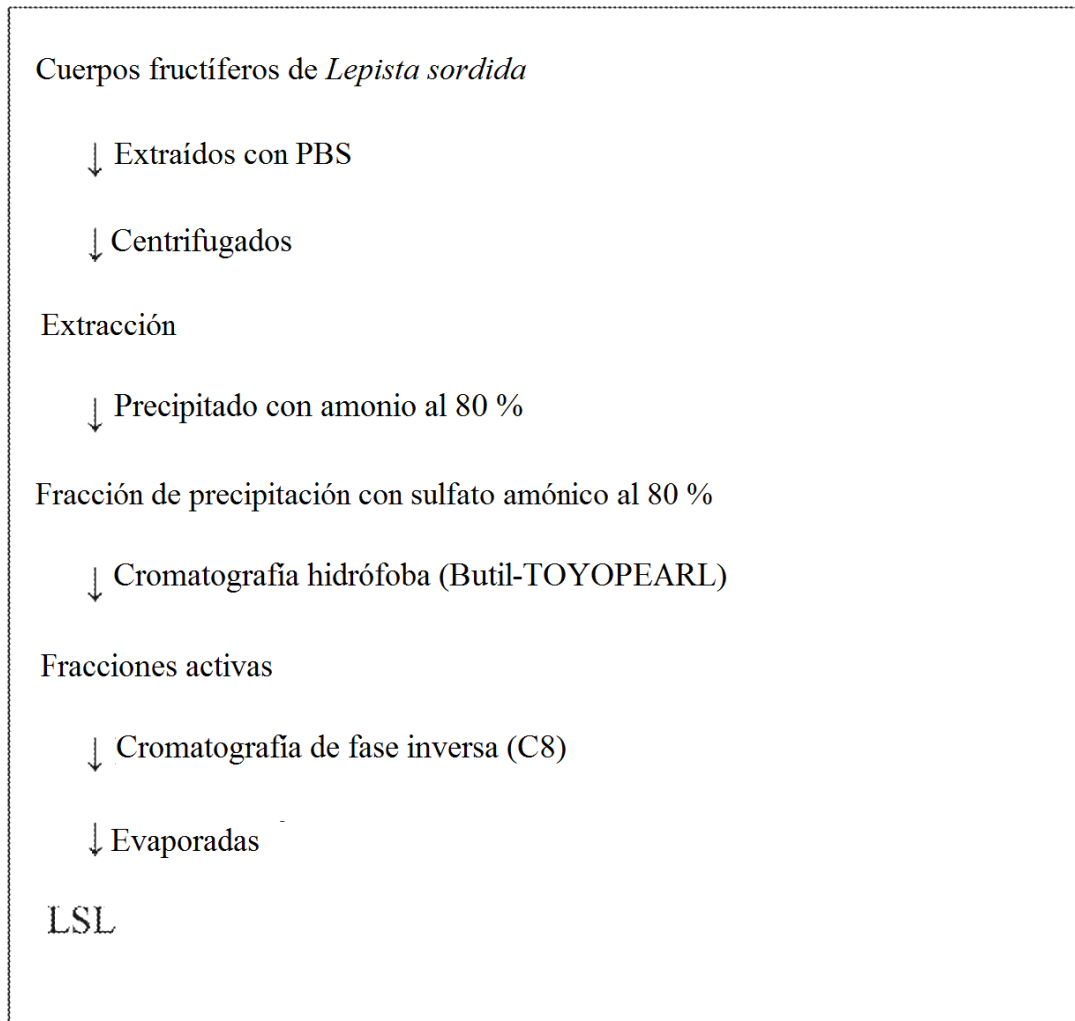


Figura 34

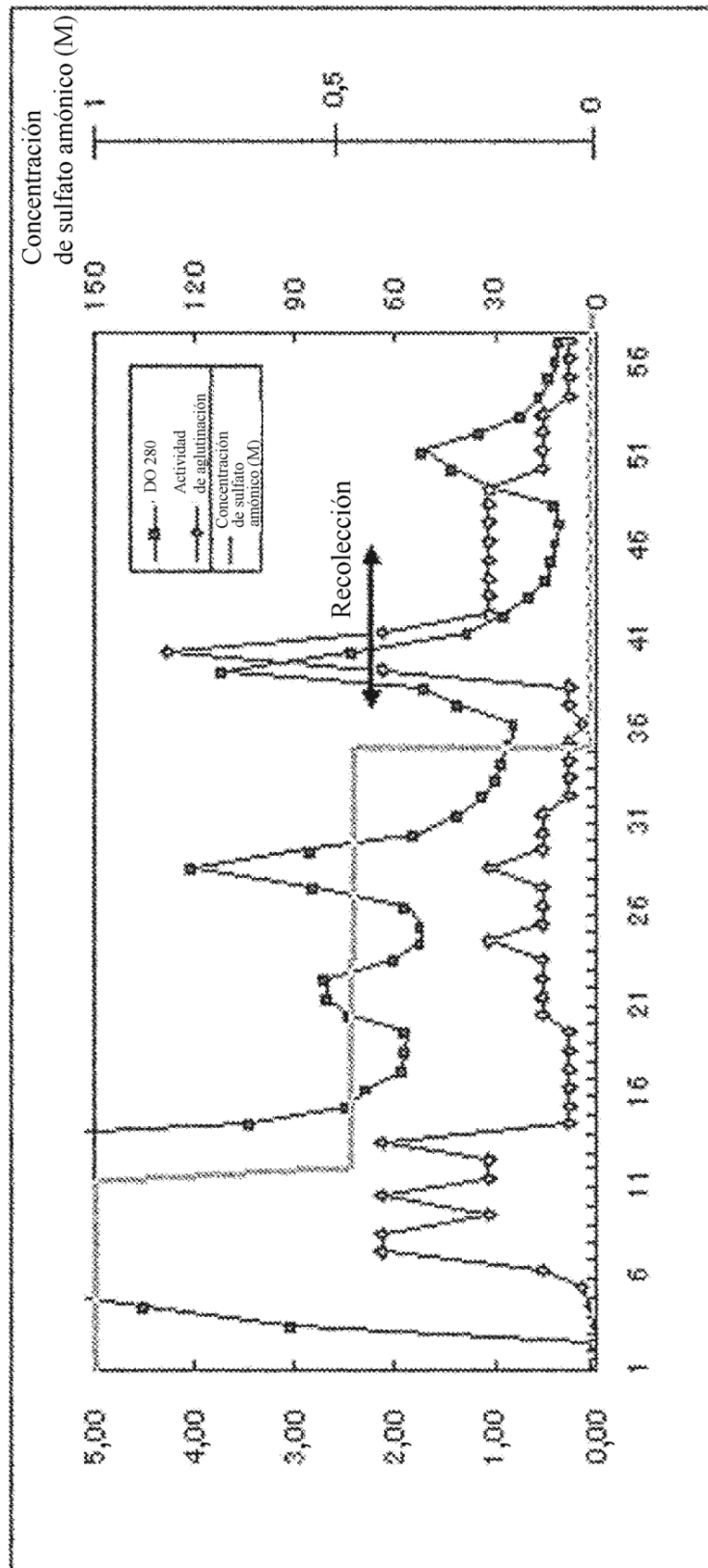


Figura 35

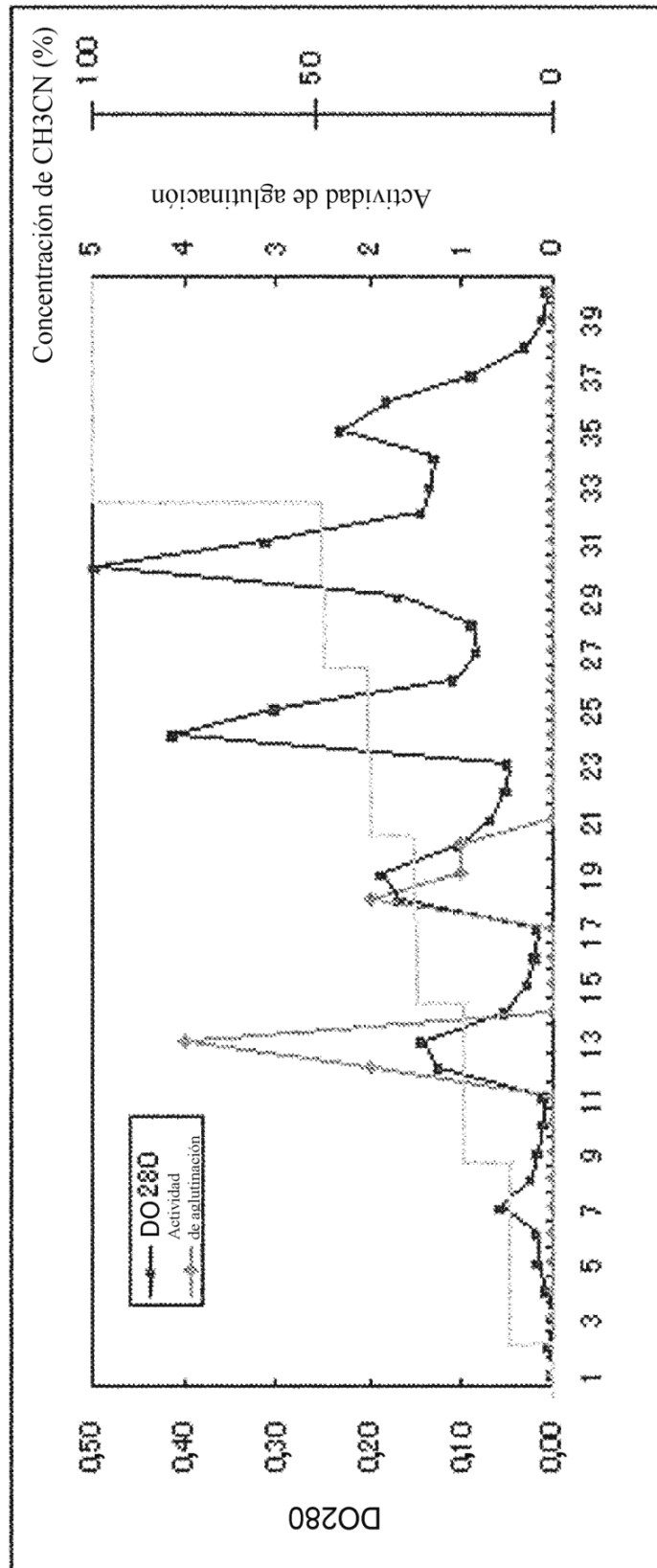


Figura 36

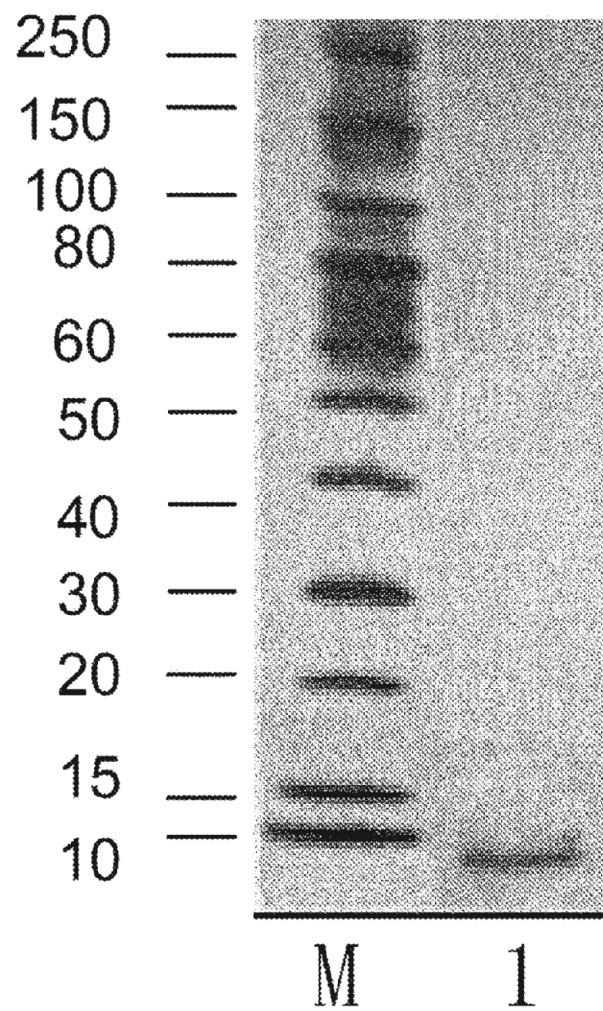


Figura 37

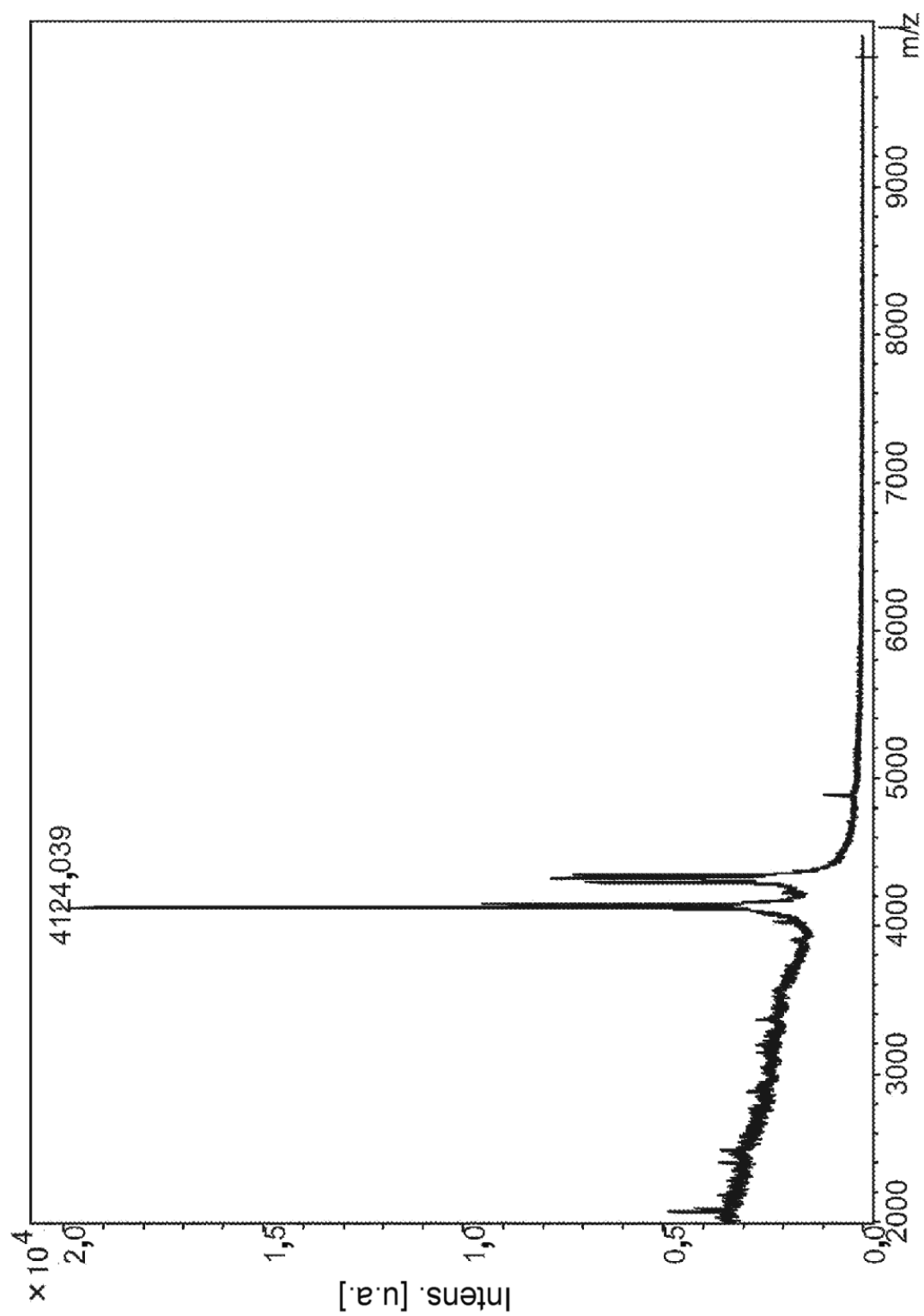


Figura 38

