

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 538**

21 Número de solicitud: 201531608

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

06.11.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.06.2017

Fecha de la concesión:

15.03.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

22.03.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070781

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE GIRONA (60.0%)
Plaça Sant Domènec, 3 Edifici les Àligues
17071 GIRONA (Girona) ES y
FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA DE GIRONA DR. JOSEP TRUETA
(40.0%)**

72 Inventor/es:

**PERACULA MIRÓ, Rosa ;
DE LLORENS DURAN, Rafael ;
LLOP ESCORIHUELA, Esther ;
BARRABÉS VERA, Sílvia ;
COMET BATLLE, Josep ;
RAMÍREZ MALAGÓN, Manel ;
ALEIXANDRE CERAROLS, Rosa Núria ;
FERRER BATALLÉ, Montserrat ;
FAHEY, Radka y
RUDD, Pauline Mary**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

54 Título: **MÉTODO IN VITRO PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**

57 Resumen:

Método in vitro para el diagnóstico de cáncer de próstata.

La invención se refiere a un método para el diagnóstico diferencial in vitro de cáncer de próstata sensible y específico y que comprende purificar parcialmente el antígeno prostático específico de una muestra fluida aislada de un sujeto para luego determinar el porcentaje de ácido siálico α -2,3 del antígeno prostático específico y/o la proporción (ratio) de fucosilación interna del antígeno prostático específico. La invención se refiere en particular a un método altamente sensible y específico que permite distinguir muestras de pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo, de muestras de pacientes con enfermedades o trastornos benignos de la próstata y pacientes de cáncer de próstata de riesgo bajo o intermedio. El método resulta también útil para el pronóstico de este cáncer. También se refiere a kits para llevar a cabo dichos métodos de diagnóstico

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 615 538 B1

DESCRIPCIÓN

Método in vitro para el diagnóstico del cáncer de próstata.

- 5 La presente invención está relacionada con la medicina, y particularmente con el diagnóstico del cáncer. Específicamente se refiere a un método de diagnóstico del cáncer de próstata.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 El cáncer de próstata (CaP) presenta la mayor incidencia entre los carcinomas y es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres en los países occidentales. El diagnóstico del CaP se basa actualmente en el examen rectal digital (DRE) y en los niveles séricos del antígeno prostático específico (PSA). En los hombres que podrían desarrollar CaP los niveles de PSA son elevados durante años, incluso antes de que se diagnostique el cáncer. En realidad, el PSA es un buen
- 15 marcador pronóstico del riesgo de padecer un cáncer de próstata clínicamente relevante a largo plazo. La amplia disponibilidad de ensayos para detectar PSA revolucionó el cribado del CaP y resultó en una disminución del 29% en el riesgo de muertes por CaP. Sin embargo, la aplicación ubicua de la prueba de PSA también ha dado lugar a un exceso de falsos positivos que han sido sometidos a tratamiento (cirugía, radio y quimioterapia) cuando no era necesario, a la par que se
- 20 han llevado a cabo biopsias innecesarias y terapias agresivas para el cáncer catalogado como de bajo riesgo. Considerando que el enfoque clínico debe ser redirigido hacia los pacientes que son más propensos a tener tumores clínicamente significativos y que, por tanto, sí se beneficiarán del tratamiento, deben desarrollarse e implementarse pruebas más sensibles y específicas.
- 25 El PSA (del inglés prostate-specific antigen), es una glicoproteína serín proteasa secretada por las células epiteliales de la próstata. Es un miembro de la familia calicreína humana. Su secuencia proteica en humanos es de 237 aminoácidos, en su forma activa sin el péptido señal ni el propéptido, y es accesible en la base de datos UniProtKB, edición de 16 de septiembre de 2015, bajo el número de acceso P07288, cuya isoforma 1 es la versión 2 de la secuencia de fecha 1 de
- 30 julio de 1989. La detección de los niveles séricos de PSA se emplea actualmente para la detección y seguimiento de patologías de la próstata, debido a que sus niveles se elevan principalmente como resultado de la destrucción de la membrana basal de las células de la próstata afectadas por la patología. Prácticamente todas las células epiteliales de la próstata, ya sea normal, hiperplásica o cancerosa, sintetizan PSA. Las células neoplásicas producen niveles
- 35 de PSA menores y variables en comparación con las células epiteliales benignas, aunque ambas condiciones causan elevación total de PSA en la sangre. Por ello, los valores de PSA en suero no permiten diferenciar de manera específica entre los cambios en estos niveles causados por el cáncer (CaP), hiperplasia prostática benigna (BPH), prostatitis, o manipulaciones (ciclismo, DRE, cateterismo) de la próstata, ya que todas estas situaciones también pueden causar un incremento
- 40 de las concentraciones séricas de PSA. Los niveles séricos de PSA son, por tanto, poco específicos y provocan una alta tasa de falsos positivos, especialmente cuando los niveles de PSA sérico se sitúan en la llamada "zona gris" (de 4,0 a 10,0 ng / ml), por lo que varios autores han extendido este intervalo de concentración de 2-20 ng / ml o 1-27 ng / mL. A esto hay que añadirle que en cánceres de riesgo elevado los niveles séricos de PSA total pueden ser bajos. Por todo
- 45 ello, no existe tampoco un punto de corte (o valor control umbral de referencia) de PSA sérico para distinguir entre cánceres agresivos y cánceres indolentes. Para mejorar la especificidad de las pruebas en las que se miden los niveles séricos de PSA, en clínica se aplica la medición de la relación de PSA libre (fPSA) / PSA total, que es más baja en el cáncer de próstata, aunque sigue dando falsos positivos. El PSA libre (abreviado fPSA) se refiere a la glicoproteína libre, no unida a proteínas de suero. El PSA total (abreviado tPSA) incluye la glicoproteína en suero libre y también
- 50 la unida a proteínas séricas. Otras alternativas para mejorar la especificidad y sensibilidad de los ensayos son la densidad de PSA, velocidad de PSA, y las diferentes isoformas moleculares de PSA. Desgraciadamente ninguno de estos enfoques mejora sustancialmente la capacidad de

distinguir entre BPH y PCa. Marcadores distintos al PSA son el Antígeno 3 de cáncer de próstata (PCA3) y el Índice de Salud de la Próstata (PHI), este último aprobado recientemente por la FDA y Europa para el diagnóstico del CaP. También se dispone de sistemas de imágenes sofisticadas que han mejorado el diagnóstico del cáncer de próstata.

5 Aprovechando que el proceso oncogénico conduce a una importante alteración del patrón de glicosilación celular, existen también trabajos científicos en la bibliografía que proponen el análisis del patrón de glicosilación del PSA, que se refiere al tipo y proporción de modificaciones de las moléculas de monosacáridos de la cadena polipeptídica, como elemento útil para el diagnóstico del CaP. Como se ha indicado anteriormente, el PSA es una glicoproteína y contiene un 8% de su peso en carbohidratos, en una sola cadena de N-oligosacárido unido a la asparagina 45 (Asn-45). Algunas de estas modificaciones con monosacáridos se corresponden con la fucosilación interna (*core fucosylation* del inglés), que es la unión de fucosa con un enlace α -1,6 a la β -N-acetilglucosamina del núcleo de los N-glicanos (o N-oligosacárido). En eucariotas, los N-glicanos derivan de la transferencia sobre una Asn consenso (Asn-X-Ser/Thr) de un oligosacárido inicial de 14 monosacáridos que contiene 3 unidades de glucosa, 9 unidades de manosa y 2 unidades de N-acetilglucosamina, que se procesa posteriormente en la ruta secretora (retículo endoplásmico y aparato de Golgi). Todos los glicanos generados contienen un núcleo que deriva de este oligosacárido inicial, y que esta formado por los 5 monosacáridos internos, que son las dos unidades de N-acetilglucosamina y tres manosas. Cuando se habla de fucosilación interna debe entenderse como la presencia de este monosacárido (fucosa) unido a la primera N-acetilglucosamina de la cadena de N-oligosacárido del PSA. Cuando se determina la fucosilación interna de una molécula de oligosacárido unido a una proteína (por ejemplo PSA) se habla del nivel de fucosilación o nivel de fucosa interna, o de la proporción de moléculas de proteína de una muestra (por ejemplo PSA) que contienen fucosa interna en dichas moléculas de oligosacárido unidas a la cadena polipeptídica.

Otro tipo de glicosilación que puede hallarse en la cadena oligosacárida del PSA es la sialilación. El ácido siálico es el término genérico empleado para los derivados del ácido neuramínico (monosacárido con una estructura de 9 carbonos) que están N- u O- substituidos. De las dos formas anoméricas, el anómero alfa (α) es la forma que se encuentra unida a los glicanos. La unión del ácido siálico a uno de los monosacáridos de los N-glicanos puede ser del tipo enlace α 2,6 entre unidades, α 2,3 o α 2,8, correspondiendo el 2 al número del carbono en la estructura del ácido siálico.

35 En estudios anteriores se ha analizado y comparado el patrón de glicosilación del PSA purificado de líquido seminal de donantes sanos con PSA producido por las células tumorales de próstata, a partir de una línea celular de tumor de próstata humano y de sueros de pacientes con cáncer de próstata. Un ejemplo de ello se desprende del documento Tabarés et al. "Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer será in relation to seminal plasma PSA", *Glycobiology* – 2006, vol. No. 16(2), pp.: 132-145. Estos estudios permitieron concluir que en comparación con PSA de plasma seminal, el contenido de fucosa interna (fucosa α 1,6) de los N-glicanos de PSA sérico de pacientes con CaP era significativamente menor. Además, el grado de sialilación del PSA, evaluado mediante cambios en la proporción de las isoformas del PSA separadas por electroforesis bidimensional (2-DE), indicó una disminución de la sialilación (ácido siálico que forma parte de la cadena de N-oligosacárido del PSA) en PSA de pacientes con CaP, en comparación con los niveles del mismo monosacárido en plasma seminal. Otros autores también observaron esta disminución de la sialilación del PSA de pacientes con CaP en comparación con el del PSA de pacientes con BPH, (Sarrats et al., "Differential percentage of serum prostate-specific antigen subforms suggests a new way to improve prostate cancer diagnosis", *Prostate* – 2010 vol. No. 70(1), pp.:1-9). Estos resultados sugerían, por tanto, una posible manera de discriminar entre BPH y PCa centrada en la determinación de los cambios de glicosilación del PSA sérico. Además de la electroforesis bidimensional, para el análisis de estos

patrones de glicosilación se realizaron ensayos de inmunoabsorción de glúcidos y captura utilizando lectinas, tal como la lectina de *Sambucus nigra* (SNA), la lectina de *Maackia amurensis* (MAA) y la lectina de *Aleuria aurantia* (AAL). Además de caracterizar los patrones de glicosilación, el objetivo de Tabarés et al., y Sarrats et al., era el de evitar tener que purificar el PSA de sueros de pacientes, que requiere grandes cantidades de suero y además se traduce en procesos largos y costosos.

También mediante el análisis del ácido siálico unido al PSA sérico, otros autores además de Tabarés et al. (*supra*) han propuesto y analizado los niveles de ácido siálico unido al PSA mediante la utilización de lectinas. Así, el documento Ohyama et al. "Carbohydrate structure and differential binding of prostate-specific antigen to Maackia amurensis lectin between prostate cancer and benign prostate hypertrophy", Glycobiology – 2004, vol. No. 14(8), pp.: 671-679, describe un ensayo entre pacientes con CaP (n=15) y pacientes con BPH (n=15), donde se concluye que los niveles de ácido α 2,3-siálico unido a PSA libre son significativamente mayores en CaP. Sin embargo, no se dan valores de sensibilidad y especificidad.

Del mismo modo la solicitud de patente WO2010011357 propone una plataforma analítica en dos fases que combina un microarray de lectina de alta densidad con un inmunoensayo con un anticuerpo y reactivos fluorescentes para determinar el patrón de glicosilación en muestras clínicas con PSA (en particular de ácido α 2,3-siálico y α 2,6-siálico unido a PSA).

En esta misma línea que pretende determinar el patrón de glicosilación en PSA sérico de pacientes, destaca también el documento de Meany et al., "Glycoproteomics for Prostate Cancer Detection: Changes in Serum PSA Glycosylation Patterns", J Proteome Res – 2009, vol. No. 8(2), pp.: 613-619. Meany et al., compararon el patrón de sialilación del PSA sérico libre y total de pacientes con CaP (n=26) y controles sin cáncer (n=26). Para ello, desarrollaron cinco ensayos de inmunoabsorción con lectinas. Los autores propusieron que el ensayo de ácido α 2,6-siálico unido a PSA sérico total mejoraba la detección del cáncer de próstata comparado con el porcentaje de PSA sérico libre en la denominada zona gris. Si este análisis se llevaba a cabo con la lectina SNA, en las curvas ROC podían incluso conseguirse valores de área bajo la curva (AUC) de 0.71.

Otro documento centrado en la comparación del patrón de glicosilación del PSA, en este caso de la fucosa interna unida en enlace α 1,6 (fucosa core), entre pacientes con CaP de diferentes grados de agresividad o riesgo, es el documento de Li et al., "Serum Fucosylated Prostate-specific Antigen (PSA) Improves the Differentiation of Aggressive from Non-aggressive Prostate Cancers", Theranostics – 2015, vol.no. 5(3), pp.: 267-276. Li et al., analizaron mediante inmunoabsorción con la lectina AAL los niveles de fucosilación de PSA de diferentes pacientes. Concluyeron que la relación "fucosa interna/PSA sérico total" permitía una mejor predicción (AUC=0.7762) que el valor de los niveles de PSA sérico total entre tumores con una puntuación Gleason de 6 y una puntuación mayor de 6 (más agresivos). La puntuación Gleason permite clasificar los distintos grados de tumoración en función del riesgo asociado a los mismos en términos de supervivencia.

A pesar de todos estos intentos, existe todavía la necesidad de desarrollar un test y/o parámetros que permitan diagnosticar el CaP en muestras fluidas, en particular en suero, y que permitan no sólo distinguir el cáncer de otras enfermedades de la próstata con mayor especificidad y sensibilidad, sino también poder distinguir los CaP agresivos o de alto riesgo, que requieren aplicar cuanto antes las terapias disponibles, de los CaP indolentes (o de bajo riesgo o riesgo intermedio), a los que se recomienda efectuar un seguimiento para controlar su evolución ("wait and watch" or "active surveillance"). También faltan medios o kits que permitan poner estos test en suero a la práctica de una forma simple y aplicable en clínica de manera rutinaria.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores proponen el empleo de un método de purificación y análisis del PSA sérico y unos parámetros o relaciones entre niveles o proporciones de distintos tipos de glicosilación del PSA, concretamente su sialilación y la fucosa interna, que permiten distinguir los pacientes con CaP agresivos de los pacientes con CaP indolentes y pacientes sin cáncer y con otras enfermedades de la próstata, en especial los pacientes con BPH. El método de diagnóstico incluye además la determinación de un parámetro (el porcentaje de PSA que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ o niveles de ácido $\alpha 2,3$ -siálico) que correlaciona muy bien con la clasificación de los tumores de próstata de acuerdo con la puntuación de Gleason, que es uno de los sistemas de gradación empleados para clasificar los pacientes con CaP entre cánceres de alto riesgo, de riesgo medio o de bajo riesgo, a partir de biopsias de los pacientes.

Así, en un primer aspecto la invención se refiere a un método para el diagnóstico in vitro del cáncer de próstata de alto riesgo en una muestra fluida aislada de un sujeto. Este método incluye la determinación del patrón de glicosilación del PSA de la muestra, que queda definido por la presencia, cantidad y proporción de fucosilación interna (entendiendo proporción como el ratio proteína fucosilada respecto la que no lo está) y/o por la presencia y porcentaje de ácido siálico $\alpha 2,3$, y donde el método comprende:

(A) Determinar la cantidad de PSA de la muestra que comprende fucosa interna y calcular un parámetro denominado relación de fucosilación interna (abreviado RFI) de la muestra, como el cociente entre la cantidad de PSA que comprende fucosa interna (abreviado fucose-PSA) respecto a la cantidad de PSA libre de la muestra (fPSA), según la fórmula (II)

$$RFI = (\text{fucose-PSA}) / \text{fPSA} \quad (II);$$

y/o

(B) Separar el PSA de la muestra en dos fracciones B y UB, mediante la interacción con una fase sólida que comprende lectinas específicas de ácido siálico, donde la fracción UB comprende PSA que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ y no comprende PSA con ácido siálico $\alpha 2,6$ (abreviado $\alpha 2,6$ -PSA), y donde la fracción B comprende PSA que comprende ácido siálico $\alpha 2,6$ (abreviado $\alpha 2,6$ -PSA); determinar en cada una de estas fracciones UB y B la cantidad de PSA; y calcular el porcentaje de PSA que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ (abreviado % $\alpha 2,3$ -PSA), calculando el cociente entre la cantidad de PSA de la fracción UB (UB-PSA) respecto a la suma de la cantidad de PSA de las fracciones UB (UB-PSA) y B (B-PSA) de acuerdo con la fórmula (Ia)

$$\% \alpha 2,3\text{-PSA} = [(UB\text{-PSA}) / ((UB\text{-PSA}) + (B\text{-PSA}))] \times 100 \quad (Ia);$$

donde:

si el porcentaje de PSA que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ (abreviado % $\alpha 2,3$ -PSA) es mayor que un valor control de referencia, el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo; y/o si la relación de fucosilación interna (RFI) en la muestra aislada es menor que un valor control de referencia, el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo, donde el cáncer de próstata de alto riesgo es aquel que se corresponde con una puntuación de grado Gleason igual o superior a 8, o Gleason 7 con metástasis.

Los cánceres de próstata se clasifican también en función de su agresividad como cánceres agresivos e indolentes también a partir de (o con base a) la puntuación de Gleason. En el sentido

de la presente invención, los cánceres de alto riesgo se corresponderían con los considerados agresivos de acuerdo con esta otra clasificación, mientras que los indolentes incluirían los cánceres de próstata de riesgo intermedio y bajo.

5 Los inventores han observado que con el análisis de estos parámetros definidos por las fórmulas (Ia) y (II) se obtienen valores de especificidad y de sensibilidad muy elevados en la discriminación entre el cáncer de próstata de alto riesgo respecto a este mismo tipo de cáncer pero de riesgo bajo o intermedio. También permite la diferenciación respecto a otras enfermedades benignas de próstata (BPH). Esto hace que pueda realizarse un diagnóstico más preciso y proceder
10 rápidamente al tratamiento cuando se detecta un cáncer de alto riesgo. Además, estos parámetros relativos al patrón de glicosilación del PSA se calculan a partir de datos que proceden de muestras fluidas de un sujeto, evitándose las biopsias, como se verá posteriormente.

Aunque para la determinación del % α 2,3-PSA puede analizarse tanto la cantidad de PSA libre (fPSA) como la de PSA total (tPSA), en una realización particular, opcionalmente en combinación con cualquier aspecto o realización de la invención, se procede calculando el porcentaje de PSA libre que comprende ácido siálico α 2,3 (abreviado % α 2,3-PSA), como el cociente entre la cantidad de PSA libre de la fracción UB (UB-fPSA) respecto a la suma de la cantidad de PSA libre de las fracciones UB (UB-fPSA) y B (B-fPSA) de acuerdo con la fórmula (Ib), empleándose por
15 tanto anticuerpos específicos de fPSA:
20

$$\% \alpha 2,3\text{-PSA} = [(UB\text{-fPSA}) / ((UB\text{-fPSA}) + (B\text{-fPSA}))] \times 100 \quad (Ib).$$

El primer aspecto de la invención se refiere, más particularmente, a un método para el diagnóstico in vitro del cáncer de próstata de alto riesgo en una muestra fluida aislada de un sujeto. El método consiste en la determinación del patrón de glicosilación del PSA de la muestra, y este patrón queda definido por la presencia, cantidad y proporción, respecto todo el PSA, de la fucosilación interna y/o por la presencia y porcentaje de PSA que contiene ácido siálico α 2,3, de acuerdo con las siguientes etapas:
25

30 (a) mezclar la muestra fluida aislada con una solución de etanolamina a una concentración molar final de etanolamina 0.5 al 2.5 M;
(b) inmunoprecipitar la solución obtenida en la etapa (a) con un anticuerpo específico de antígeno prostático específico (PSA) y eluir el PSA inmunoprecipitado para recuperar el PSA de la muestra;
35 (c) en la solución de la etapa (b):

(c.1) Separar el PSA en dos fracciones B y UB, mediante la interacción con una fase sólida que comprende lectinas específicas de ácido siálico, donde la fracción UB comprende PSA que comprende ácido siálico α 2,3 y no comprende PSA con ácido siálico α 2,6 (abreviado α 2,6-PSA), y donde la fracción B comprende PSA que comprende ácido siálico α 2,6 (abreviado α 2,6-PSA);
40 (c.2) determinar en cada una de estas fracciones UB y B la cantidad de PSA, más en particular la cantidad de PSA libre (fPSA); y
(c.3) calcular el porcentaje de PSA que comprende ácido siálico α 2,3 (abreviado % α 2,3-PSA), calculando el cociente entre la cantidad de PSA de la fracción UB (UB-PSA) respecto a la suma de la cantidad de PSA de las fracciones UB (UB-PSA) y B (B-PSA) de acuerdo con la fórmula (Ia)
45

$$\% \alpha 2,3\text{-PSA} = [(UB\text{-PSA}) / ((UB\text{-PSA}) + (B\text{-PSA}))] \times 100 \quad (Ia);$$

50 y/o

(d) En la solución de la etapa (b) determinar la cantidad PSA libre (fPSA) y la cantidad de PSA que comprende fucosa interna; y calcular un parámetro denominado relación de fucosilación interna (abreviado RFI) de la muestra como el cociente entre la cantidad de PSA que comprende fucosa interna (abreviado fucose-PSA) respecto a la cantidad de PSA libre de la muestra (fPSA), según la fórmula (II)

$$\text{RFI} = (\text{fucose-PSA}) / \text{fPSA} \quad (\text{II});$$

donde:

si el % α 2,3-PSA es mayor que un valor control de referencia, el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo; y/o si la RFI en la muestra aislada es menor que un valor control de referencia, el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo, donde el cáncer de próstata de alto riesgo es aquel que se corresponde con una puntuación de grado Gleason igual o superior a 8, o Gleason 7 con metástasis.

Cuando en esta descripción se hace referencia al PSA, se refiere en particular al PSA humano cuya secuencia proteica activa (sin péptido señal ni propéptido) consiste en 237 aminoácidos y es accesible en la base de datos UniProtKB, edición de 16 de septiembre de 2015, bajo el número de acceso P07288, cuya isoforma 1 es la versión 2 de la secuencia de fecha 1 de julio de 1989.

Las etapas (a) y (b) del método de diagnóstico particular permiten purificar de manera muy eficiente el PSA de la muestra fluida aislada del sujeto, separándolo de otras proteínas que podrían interferir con el cálculo de los parámetros que se propone. Tal como se verá en los ejemplos, la combinación de la mezcla con una solución de etanolamina a las concentraciones finales previstas y la inmunoprecipitación del tPSA con un anticuerpo, permite recuperar a partir de un volumen pequeño (750 microlitros de muestra fluida) una cantidad de PSA libre (fPSA) óptima para los subsiguientes análisis de los distintos tipos de glicosilación. Es decir, se emplaza en la solución de compromiso de recuperar el máximo de PSA y de aislarlo de las proteínas del suero que podrían interferir luego en los análisis de glicosilación, por ejemplo porque también están glicosiladas. Si a estas etapas de purificación se añade además la determinación de unos porcentajes y relaciones de los distintos tipos de glicosilación mencionados, permite determinar unos valores que comparados con valores de referencia dan lugar a una especificidad y sensibilidad elevadas. Además, el análisis estadístico confirma valores predictivos positivos y negativos elevados y también valores del área bajo la curva (AUC) en una curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) con valores próximos a 1. Ello quiere decir que la probabilidad de escoger al azar un valor positivo (enfermo de cáncer de próstata agresivo) es mayor que la probabilidad de obtener un valor negativo (enfermo con BPH u otra enfermedad benigna de la próstata o cáncer de próstata indolente, estos últimos incluyendo los cánceres de próstata de riesgo bajo o intermedio). Dicho de otra forma, la probabilidad de que el diagnóstico realizado a un paciente con CaP agresivo sea correcto es mayor que el que se realizaría a una persona sana o con enfermedad benigna escogida al azar. La sensibilidad es el concepto que indica que el método es capaz de detectar los pacientes con CaP agresivo a pesar de mínimos cambios en los niveles de los marcadores respecto de un control sano o con otra enfermedad. La especificidad es el concepto que nos indica que de manera inequívoca clasificamos bien entre una cohorte de pacientes, aquellos que tienen CaP agresivo de aquellos que no.

Según se desprende de los ejemplos, llevados a cabo con una cohorte de pacientes con una n de 65, en particular la detección y cuantificación del porcentaje de PSA que comprende ácido siálico α -2,3 (% α 2,3-PSA) permite separar los pacientes con CaP de alto riesgo de los pacientes con BPH o con cáncer de próstata de bajo riesgo, con una sensibilidad del 85,7% y una especificidad del 95,3%, empleando como punto de corte o valor control de referencia un porcentaje de PSA

con ácido siálico $\alpha 2,3$ de 30,05%, y alcanzando un alto rendimiento (AUC de 0,97). De acuerdo con el conocimiento de los inventores, estos valores no se han conseguido todavía. Además, el porcentaje de PSA sérico unido a ácido siálico $\alpha 2,3$ (% $\alpha 2,3$ -PSA) correlacionó positivamente con la puntuación del sistema Gleason, hito no logrado con los marcadores empleados actualmente en clínica, tal como los niveles tPSA o de % fPSA en suero. Esta correlación entre el porcentaje de PSA sérico unido a o que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ y la puntuación de Gleason puede mejorar la clasificación del tipo de CaP. Todo ello hace que el uso de este biomarcador en suero pueda ser monitorizado rutinariamente en pacientes que presenten valores de PSA séricos indicativos de patología prostática, para identificar a los pacientes con CaP de alto riesgo. Tratándose además de un marcador sérico, supone un método no invasivo, conllevando la ventaja de evitar biopsias innecesarias e incómodas para el paciente.

En la presente descripción el PSA que contiene (o sinónimamente que comprende) en su cadena oligosacárida ácido siálico $\alpha 2,3$ también puede denominarse ácido siálico $\alpha 2,3$ en el antígeno prostático específico (abreviado como $\alpha 2,3$ -PSA). Cuando en la descripción se habla de porcentaje de ácido siálico $\alpha 2,3$ en el antígeno prostático específico (abreviado % $\alpha 2,3$ -PSA), debe entenderse como el porcentaje de PSA de la muestra aislada que contiene exclusivamente ácido siálico $\alpha 2,3$ en su cadena oligosacárida y no contiene ácido siálico $\alpha 2,6$.

En una realización particular, cuando el método de diagnóstico incluye las etapas de (a) y (b) de purificación, este está caracterizado porque la concentración molar de etanolamina en la solución de la etapa (a) es de 1 a 1.5 molar (M), dicha concentración respecto el volumen total de solución de etanolamina más muestra fluida aislada del paciente.

Cuando en la presente se indican rangos de concentraciones, debe entenderse que estos incluyen los valores extremos del rango, y en particular el rango de 0.5 a 2.5 M incluye 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 M.

En otra realización particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o posterior, el método se lleva a cabo a una temperatura de 20 °C a 40 °C. Este rango incluye los valores de temperatura 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C y 40 °C.

El método según la invención también se caracteriza porque la etapa (a), según el método particular descrito arriba, se lleva a cabo por un periodo de tiempo de 20 horas a 75 horas, más en particular de 40 a 75 horas, y todavía más en particular de 70 a 75 horas y a una concentración molar final de etanolamina de 1 a 1.5 molar, más en particular de 1 molar.

En otra realización particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o posterior y en el caso de que sea de aplicación las etapas (a) y (b) de purificación de la muestra, tras la etapa (a) de mezclar la muestra fluida aislada con una solución de etanolamina y posterior incubación, se ajusta el pH entre 7 y 8, particularmente a 7.8, antes de seguir con la etapa (b) de inmunoprecipitación.

En otra realización particular, la elución del PSA en la etapa (b), si la hay, se realiza mediante tres incubaciones sucesivas con un tampón de alta fuerza salina, como el Gentle Elution Buffer (Pierce™); y opcionalmente se desala la muestra mediante filtración, en particular utilizando un filtro del tipo Amicon Ultra-0.5, 3K de Millipore.

En otra realización particular del método según el primer aspecto de la invención, la muestra fluida aislada del sujeto se selecciona del grupo constituido por sangre completa, suero, plasma y orina. En otra realización todavía más particular la muestra aislada es suero.

5 Precisamente, una de las ventajas del método según la invención es que se lleva a cabo en una muestra de fácil obtención en rutina clínica, evitándose así las biopsias que son molestas y no exentas de problemas para el paciente y resultan más costosas para el sistema sanitario. También con ello se reducen el número de intervenciones mediante técnicas de diagnóstico por imagen (RMN) que son también más caras que el test en muestras de sangre (suero).

10 En otra realización particular, la etapa (b) de inmunoprecipitación con un anticuerpo específico contra el antígeno prostático específico, se lleva cabo con un anticuerpo monoclonal o policlonal y seleccionado del grupo constituido por un anticuerpo anti-PSA total y un anticuerpo anti-PSA libre. Más en particular con un anticuerpo anti-PSA total. El experto entenderá que tratándose de una inmunoprecipitación estos anticuerpos están unidos a un soporte (tal como bolitas, perlas o beads del inglés) que puede ser capturado por distintos métodos, tal como mediante un campo magnético si el soporte es sensible al mismo.

15 El método según la invención comprende cualquier técnica para la determinación de la presencia y cantidad del ácido siálico α 2,3 unido al antígeno prostático específico (abreviado aquí como se ha indicado antes α 2,3-PSA). En una realización particular, el método según la invención, opcionalmente en combinación con cualquier realización aquí explicitada, está caracterizado porque la cantidad de α 2,3-PSA y seguidamente el % α 2,3-PSA, se determina mediante cromatografía de afinidad con una lectina específica de ácido siálico α 2,6.

20 En una realización todavía a más particular, el método según la invención, opcionalmente en combinación con cualquier realización aquí explicitada, está caracterizado porque la cantidad de α 2,3-PSA y seguidamente el % α 2,3-PSA, se determina mediante cromatografía de afinidad en una columna con una fase sólida que contiene la lectina de *Sambucus nigra* (SNA) y se procede de acuerdo con las siguientes etapas:

30 (i) el PSA de la muestra, opcionalmente obtenido tras las etapas (a) de mezcla con etanolamina y (b) de inmunoprecipitación y elución, se incuba con la lectina SNA en una columna de cromatografía por un periodo de 15 horas a 20 horas, más particularmente de 16 a 18 horas, y a una temperatura de 2 °C a 7 °C, más en particular de 2°C a 4 °C;

35 (ii) se centrifuga la columna y se eluye al menos dos veces durante 3-7 minutos, en particular 5 minutos, con un volumen de 200-700 μ l, en particular 500 μ l, de una solución tampón (LB), para obtener la fracción no unida a la columna (UB) y que comprende el α 2,3-PSA;

(iii) se eluye la fracción de PSA unido a la columna (B), que comprende α 2,6-PSA, de acuerdo con las siguientes dos sub-etapas:

- 40 - incubar dos veces la lectina con una solución tampón a pH entre 7 y 8 que comprende lactosa a una temperatura de 20 a 30 °C (que se corresponde con la temperatura ambiente) para obtener una primera fracción de eluido; e
- 45 - incubar la lectina con una solución ácida, particularmente con ácido acético de 0.1M a 1M, más en particular con 0.2 M de ácido acético, entre 2.5 y 3 minutos, en particular 2,7 minutos, donde dicha solución ácida contiene lactosa en LB, y a una temperatura de 20 a 30 °C (rt) para obtener una segunda fracción de eluido, que se neutraliza con una solución de pH=9;

50 (iv) se determina el PSA, ya sea el fPSA o el tPSA, de cada una de las etapas (ii) y (iii) y se calcula el porcentaje de antígeno prostático específico que comprende al ácido siálico α -2,3 (% α -2,3-PSA), como el cociente entre el PSA de la fracción UB de la etapa (ii) respecto de la suma de PSA de las fracciones UB y B de las etapas (ii) y (iii), de acuerdo con la fórmula (Ia), o (Ib) si se trata de comparar cantidades de fPSA, descritas antes.

En una realización particular, la centrifugación de la etapa (ii) se lleva a cabo a una velocidad entre 1500- 2000 revoluciones por minutos (rpm), en particular 2000 rpm, por un tiempo de 2 a 5 minutos (min).

5 En otra realización particular, la solución tampón comprende HEPES (ácido 4-(2-hidroxyetil)-1-piperazinetanesulfónico) y una mezcla de sales como el cloruro sódico y cálcico. Cuando esta solución tampón contiene lactosa, ésta está en particular a una concentración de 0.5 a 0.8 M, en particular 0.5 M. La solución tampón contiene también albúmina de suero bovino (BSA) en un porcentaje en peso del 0.1 % al 1.5 %. La incubación con esta solución tampón se lleva a cabo de
10 20 a 25 minutos, en particular durante 20 minutos.

Del mismo modo, el método según la invención comprende cualquier técnica para la determinación del nivel de fucosilación interna y con ello de la proporción de PSA libre fucosilado en la muestra (relación de fucosilación interna, RFI), que incluya determinar por cualquier metodología la cantidad de fucosilación interna del PSA en la muestra del sujeto y la cantidad o
15 los niveles de fPSA en esta misma muestra.

En una realización particular, el método según el primer aspecto de la invención está caracterizado porque la determinación del nivel de fucosilación interna (o cantidad de PSA que comprende fucosa interna) y seguidamente de la relación de fucosilación interna, se lleva a cabo mediante un ensayo de lectina unido a enzima (ELLA) con la lectina de *Pholiota squarrosa* (PhoSL) conjugada con biotina, de acuerdo con las siguientes etapas:

(i) se incuba el PSA, opcionalmente obtenido tras las etapas (a) de mezcla con etanolamina y (b) de inmunoprecipitación y elución, con un anticuerpo específico contra el antígeno prostático específico libre por un tiempo de 1 a 3 horas, en particular 2 horas;

(ii) se añade tras la etapa (i) la lectina de *Pholiota squarrosa* (PhoSL) conjugada con biotina por un tiempo de 1 a 3 horas, en particular por un tiempo de 2 horas;

(iii) se añade tras la etapa (ii) una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano por un periodo de 1 a 1,5 horas, más en particular 1 hora, periodo tras el cual se añade el sustrato de la enzima peroxidasa conjugado a una molécula emisora de fluorescencia y se determina la fluorescencia emitida, que es proporcional a la cantidad del PSA libre de la muestra que
35 comprende fucosa interna; y

(iv) se determina el fPSA de la muestra fluida aislada del sujeto, o de la solución opcionalmente obtenida obtenida tras las etapas (a) de mezcla con etanolamina y (b) de inmunoprecipitación y elución; y se calcula la relación de fucosilación interna, como el cociente entre la cantidad de PSA que comprende fucosa interna (o lo que es lo mismo, nivel de fucosa interna del PSA de la muestra) determinado en (iii) respecto a la cantidad de PSA libre de la muestra o en particular respecto de la solución opcionalmente obtenida tras las etapas (a) de mezcla con etanolamina y (b) de inmunoprecipitación y elución, todo ello de acuerdo con la fórmula (II) citada anteriormente.

Para trasladar los valores de fluorescencia emitida en la etapa (iii) con la fucosilación interna de PSA libre, se emplea en una realización particular una curva patrón realizada a partir de PSA estándar con un 77% de las moléculas de PSA con fucosilación interna. Entonces, la relación de fucosilación interna de la muestra se refiere a la cantidad de PSA con fucosa interna respecto al PSA standard, que contiene un 77% de las moléculas de PSA con fucosilación interna. De manera rigurosa la relación de fucosilación interna (RFI) de la muestra se corresponde al cociente entre el
50 nivel de fucosa interna del PSA de la muestra, calculado en relación al nivel de fucosa interna del PSA estándar, respecto a la cantidad de PSA libre de la muestra, en particular el PSA libre de la solución obtenida tras las etapas (a) de mezcla con etanolamina y (b) de inmunoprecipitación y

elución. Esta relación de fucosilación interna también se denomina en esta descripción proporción de PSA libre fucosilado.

- 5 En una realización todavía más particular, las etapas (iv) de cualquiera de los métodos para determinar el % α 2,3-PSA y la relación de fucosilación interna (RFI), se lleva a cabo con un anticuerpo específico de fPSA, que puede ser monoclonal o policlonal y seleccionado de los comercialmente disponibles, tal como el anticuerpo monoclonal de referencia M-30 de Roche Diagnostics.
- 10 En otra realización particular del método según la invención, éste está caracterizado porque el valor control de referencia de la relación de fucosilación interna es 0.86; y el valor control de referencia del porcentaje de PSA con ácido siálico α -2,3 es del 30 %. Ello quiere decir que un valor de la relación de fucosilación interna, determinado en la muestra aislada del sujeto, menor que 0.86 es indicativo de CaP agresivo o de alto riesgo de acuerdo con la puntuación Gleason. Por
- 15 otro lado, si el valor de PSA (medido como PSA libre o total) eluido en la fracción UB de la cromatografía SNA (o de la lectina que corresponda) es igual o superior al 30% de todo el PSA eluido (UB + B) significa que el PSA de la muestra tiene un contenido igual o superior al 30% de ácido siálico α 2,3 unido a PSA y por tanto es indicativo de un cáncer de próstata agresivo.
- 20 Se entiende por “valor control de referencia” un valor con el cual se compara la proporción de PSA fucosilado (lo que es lo mismo que relación de fucosilación interna) y/o el % α 2,3-PSA determinado en la muestra aislada según la invención para el diagnóstico del CaP de alto riesgo. Se trata de un valor de cada uno de estos parámetros que permite distinguir con un elevado grado de probabilidad un sujeto con CaP de alto riesgo del resto de individuos que no sufren este cáncer
- 25 o que sufren CaP de bajo riesgo, e incluso individuos que padecen enfermedades benignas de la próstata. El valor de referencia es un valor, también denominado punto de corte o valor umbral, que permite descartar con una elevada sensibilidad que el paciente diagnosticado sufre CaP de alto riesgo. Este valor umbral representa una relación de fucosilación interna o bien un porcentaje de α 2,3-PSA por debajo o por encima del cual, en función de cada caso, se asocia la muestra del
- 30 sujeto con la enfermedad (CaP de alto riesgo o agresivo) o no.
- Tal como se ha indicado antes, el método según la invención permite diagnosticar de manera diferencial el cáncer de próstata agresivo o de alto riesgo, del cáncer de próstata de riesgo intermedio y de riesgo bajo, y de enfermedades benignas de la próstata. En una realización
- 35 particular, las enfermedades benignas de próstata se seleccionan del grupo formado por hiperplasia benigna de próstata, prostatitis, y manipulaciones de la próstata. Por manipulaciones de la próstata debe entenderse todas aquellas situaciones que cursan con un incremento del PSA en suero y seleccionadas de la práctica del ciclismo, los cateterismos y los exámenes digitales del recto (DRE).
- 40 Los parámetros indicados anteriormente (% α -2,3-PSA y la relación de fucosilación interna) dan información significativa no solo de diagnóstico de cáncer de próstata, sino también del pronóstico del mismo correlacionando con la clasificación del CaP agresivo o no agresivo establecida de acuerdo con la puntuación del sistema Gleason, donde una puntuación de grado Gleason igual o
- 45 superior a 8 significa cáncer de alto riesgo. Estos pacientes después de ser sometidos sólo a prostatectomía radical presentan una probabilidad de supervivencia libre de recaída a los cinco años de entre el 50 y el 80% (Chang et al., “High-risk prostate cancer-Classification and therapy”, Nat.Rev.Clin. Onco -2014, vol. no. 11, pp.: 308-323) Los parámetros también correlacionan con el estadiaje Tumor Node Metastasis (TNM), otro método de clasificar la agresividad de este tipo de
- 50 cáncer.

El sistema de gradación de Gleason para el pronóstico del cáncer de próstata, se describe en Humphrey, et al. “Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate”, Modern

Pathology -2004, vol. no. 17, pp.: 292–306. El sistema de gradación de Gleason se basa en el patrón histológico del carcinoma: su patrón glandular y su grado de diferenciación. Los valores de puntuación (score) Gleason entre 2- 4 corresponden a un patrón altamente diferenciado (anaplasia); entre 5 y 6 moderadamente diferenciado y entre 7 y 10 pobremente diferenciado. Mientras que los valores de 6 e inferiores se han asociado a un buen pronóstico o cánceres indolentes o de bajo riesgo, los valores por encima de 8 son indicativos de cáncer agresivo o de alto riesgo. El valor de 7 se encuentra en un estadio intermedio de agresividad de entre 5-6 y 8-10.

La invención se refiere, en un segundo aspecto, a un método para decidir o recomendar un régimen médico para cáncer de próstata, dicho régimen médico seleccionado entre tratamiento farmacológico e intervención quirúrgica, que comprende llevar a cabo el método de diagnóstico según cualquiera de las realizaciones descritas más arriba; y donde, si el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata agresivo o de alto riesgo se recomienda o decide el régimen médico indicado para este tipo de cáncer de próstata, y si el sujeto no es diagnosticado de cáncer de próstata agresivo pero es diagnosticado de una enfermedad benigna de próstata o de cáncer de próstata indolente se recomienda o decide el régimen médico para esta otra enfermedad.

La invención se refiere también, según otro aspecto, al uso de:

(a) la relación de fucosilación interna, que resulta de determinar en una muestra fluida aislada de un sujeto el cociente entre la cantidad de PSA que comprende fucosa interna y la cantidad de PSA libre de la muestra; y/o

(b) el porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α 2,3, y que resulta de calcular la relación entre el PSA de una fracción no unida a lectina (en particular a una lectina específica de ácido siálico α 2,6, más en particular la lectina SNA) respecto de la suma de las fracciones de PSA unido y no unido a dicha lectina, como biomarcadores independientes de cáncer de próstata de alto riesgo, donde el cáncer de próstata de alto riesgo es aquel que se corresponde con una puntuación de grado Gleason igual o superior a 8, o de grado 7 con metástasis.

De acuerdo con la información de la que disponen los inventores, esta es la primera vez que se describe la relación de estos parámetros, RFI y % α 2,3-PSA calculados según se ha descrito antes, con el cáncer de próstata de alto riesgo. En una realización particular, para la determinación de estos parámetros la muestra fluida aislada del sujeto donde se determina la cantidad de PSA que comprende fucosa interna y/o la cantidad de PSA de las fracciones unida y no unida a lectina, es una muestra que previamente ha sido mezclada con una solución de etanolamina a una concentración molar final de 0.5 M al 2.5 M, en particular 1 M, y seguidamente inmunoprecipitada con un anticuerpo específico contra el antígeno prostático específico.

En una realización particular, el uso de estos biomarcadores es para el diagnóstico diferencial del cáncer de próstata de alto riesgo, del cáncer de próstata de riesgo intermedio bajo; y/o de enfermedades benignas de la próstata. La determinación de estos biomarcadores se lleva a cabo, en una realización particular en una muestra fluida aislada del sujeto que se selecciona del grupo constituido por sangre completa, suero, plasma y orina. Más en particular, se lleva a cabo en suero.

En la práctica, el método según la invención se lleva a cabo en kits que comprenden medios para determinar en una muestra fluida aislada de un sujeto la cantidad de PSA que comprende ácido siálico α -2,3 y/o la cantidad de PSA que comprende fucosilación interna. Estos kits se caracterizan porque comprenden:

(a) un anticuerpo específico contra el antígeno prostático específico libre; y

(b) una fase sólida para columna cromatográfica de afinidad que comprende una lectina específica contra el ácido siálico y, opcionalmente, soluciones para la elución de la muestra cargada en dicha

- columna como medios para detectar y cuantificar la cantidad antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α -2,3; y/o
- (c) una lectina específica contra fucosa, dicha lectina conjugada con biotina; opcionalmente un anticuerpo específico de antígeno prostático específico libre que está inmovilizado en una placa de pocillos; y opcionalmente, una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano y un sustrato de la enzima peroxidasa conjugado a una molécula emisora de fluorescencia, todo como medios para detectar y cuantificar el antígeno prostático específico que comprende fucosilación interna.
- En una realización más particular, el kit comprende una lectina específica contra fucosa, dicha lectina conjugada con biotina; y el anticuerpo específico de antígeno prostático específico libre que está inmovilizado en una placa de pocillos, y opcionalmente, una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano y un sustrato de la enzima peroxidasa conjugado a una molécula emisora de fluorescencia. Esta realización particular del kit resulta ventajosa para el usuario, quién ya dispone del anticuerpo específico de antígeno prostático específico libre inmovilizado. Así se simplifica el método para llevar a cabo el análisis de la cantidad de PSA que comprende fucosilación interna, al no tener que inmovilizar previamente el anticuerpo también subministrado en el kit.
- En una realización particular de estos kits, la lectina específica de ácido siálico es la aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) y la lectina específica de fucosa interna es la lectina de *Pholiota squarrosa* (PhoSL).
- En otra realización todavía más particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o posterior aquí descritas, la fase sólida que comprende lectina de *Sambucus nigra* consiste en perlas de agarosa reticuladas al 4 % con un límite de tamaño de exclusión molecular de 2×10^7 daltons (Da). A esta fase sólida la lectina se une covalentemente.
- En otra realización particular los kits están caracterizados porque además comprenden:
- (a) una solución de etanolamina para ser mezclada con la muestra del sujeto y obtener una concentración final de etanolamina del 0.5 al 2.5 M; y
- (b) un anticuerpo específico de antígeno prostático específico unido a un soporte para inmunoprecipitación.
- En la presente invención debe entenderse por “soporte para inmunoprecipitación” cualquier material sólido, generalmente perlas (bolitas) donde se unen covalentemente anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos contra las proteínas que quieren aislarse de una mezcla compleja. Estos soportes se separan luego de la mezcla compleja ya sea por medios de sedimentación o por aplicación de fuerzas externas (campos magnéticos u eléctricos) a las que dichos soportes son sensibles.
- Estos kits de acuerdo con la invención se usan para el diagnóstico de cáncer de próstata, y en particular para el diagnóstico de cáncer de próstata de alto riesgo, y/o para el diagnóstico diferencial del cáncer de próstata de alto riesgo y enfermedades benignas de la próstata.
- En realidad, la invención se refiere también a un método para purificar PSA en la muestra fluida aislada de un sujeto, concretamente en un volumen de muestra de 0.25 a 1.5 mL, en particular de 0.75 a 1.5 mL, donde además dicho PSA purificado está en condiciones de ser analizado para detectar y cuantificar su glicosilación a nivel de ácido siálico y de fucosilación interna.
- Este método de purificación comprende las etapas de:
- (a) mezclar la muestra fluida aislada con una solución de etanolamina a una concentración molar del 0.5 al 2.5 M en la mezcla final, en particular de del 1 M;

(b) inmunoprecipitar la solución obtenida en la etapa (a) con un anticuerpo específico de antígeno prostático específico y eluir el PSA inmunoprecipitado para recuperar el PSA de la muestra.

En una realización particular, esta elución del PSA se realiza mediante tres incubaciones sucesivas con un tampón de alta fuerza salina, concretamente Gentle Elution Buffer (Pierce™). Tras la elución del PSA se desala la muestra mediante filtración, en particular utilizando Amicon Ultra-0.5, 3K de Millipore.

En una realización particular del método de purificación, el anticuerpo específico contra el antígeno prostático específico de la etapa (b) se selecciona del grupo constituido por un anticuerpo anti-PSA total y un anticuerpo anti-PSA libre. Más en particular con un anticuerpo anti-PSA total. Este anticuerpo, a su vez, puede ser monoclonal o policlonal.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y "contiene" deben entenderse como sinónimas y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" o "contiene" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 (A) Representación de la relación de fucosilación interna del PSA respecto de los niveles séricos de PSA total (tPSA) (panel A) o en función de la patología (panel B). Las muestras de suero de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (BPH) se indican con círculos blancos y las muestras de suero de CaP de alto riesgo (CaP HR) con los círculos negros. La línea punteada indica el valor de corte para discriminar las dos patologías. La significación se fijó en $p < 0,05$. En el panel (C) se comparan las curvas ROC para la relación de fucosilación interna (RFI) con una línea sólida, para el tPSA con una línea punteada; y para el fPSA% con una línea discontinua en segmentos. La línea diagonal es la línea de referencia de las ROC. La relación de fucosilación interna dio el valor más alto AUC (AUC = 0,94). El valor de corte de 0,86 dio la más alta sensibilidad (90%) y especificidad (95%).

FIG. 2 (A) Representación del porcentaje de PSA que comprende ácido $\alpha 2,3$ -siálico (% $\alpha 2,3$ -SA) respecto a la concentración de PSA sérico (tPSA) (panel A) o respecto de la patología (panel B). Las muestras de suero de BPH se indican con círculos blancos, el CaP de bajo riesgo (CaP LR) con una cruz, el CaP de riesgo intermedio (CaP IR) con un triángulo negro y el CaP de alto riesgo (CaP HR) con un círculo negro. La línea punteada indica el valor de corte para discriminar el CaP de alto riesgo de las otras tres patologías. La significación se fijó en $p < 0,05$. En el panel (C) se comparan las curvas ROC para el % $\alpha 2,3$ -SA, tPSA y el % de fPSA. El % $\alpha 2,3$ -SA dio el valor más alto de AUC (AUC = 0,97) y el valor de corte 30,05 mostró la más alta sensibilidad (85,7%) y especificidad (95,3%).

FIG. 3 es un gráfico que muestra la correlación entre el porcentaje de PSA que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ en PSA (% $\alpha 2,3$ -SA) de las muestras de suero de paciente con CaP con su puntuación de Gleason (PG). Las muestras de suero de CaP de bajo riesgo se indican con una cruz, CaP de riesgo intermedio con un triángulo negro y CaP de alto riesgo con un círculo negro. La media del % $\alpha 2,3$ -SA para cada puntuación de Gleason se indica con una línea horizontal.

La FIG. 4 muestra los cromatogramas (HPLC) de los perfiles de N-glicanos después de la digestión con sialidasas (NAN1, específica de ácido siálico $\alpha 2,3$; y ABS, que digiere todos los

ácidos siálicos $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$) para las fracciones no unida UB y unidas B. También se muestra el perfil de los cromatogramas a partir de muestras no digeridas con estas sialidasas. Los perfiles están estandarizados respecto a un hidrolizado de dextrano (unidades de glucosa; GU). Las estructuras de los N-glicanos se abrevían según: todos los N-glicanos tienen dos N-acetilglucosaminas (GlcNAc) y tres manosas en el núcleo; F al principio de la abreviación significa un núcleo con fucosa (fucosa interna); A representa en número de antenas; G representa las galactosas unidas por enlace $\beta 1-4$ en la antena; S representa el ácido siálico unido a la galactosa. En los picos con más de una estructura de N-glicano, el principal aparece resaltado. La leyenda se corresponde con, *UB PSA de columna SNA* es el perfil de N-glicanos en la fracción no unida que sale de la columna de lectina SNA; *UB PSA de columna SNA + NAN1* es el perfil de N-glicanos en la fracción no unida que sale de la columna de lectina SNA posteriormente digerido con el enzima NAN1; *UB PSA de columna SNA + ABS* es el perfil de N-glicanos en la fracción no unida que sale de la columna de lectina SNA posteriormente digerido con el enzima ABS; *B PSA de columna SNA* es el perfil de N-glicanos en la fracción unida que sale de la columna de lectina SNA; *B PSA de columna SNA + NAN1* es el perfil de N-glicanos en la fracción unida que sale de la columna de lectina SNA posteriormente digerido con el enzima NAN1; y *B PSA de columna SNA + ABS* es el perfil de N-glicanos en la fracción unida que sale de la columna de lectina SNA posteriormente digerido con el enzima ABS.

20 EJEMPLOS

1. Características clínicas de la población en estudio

Las muestras de suero analizadas (73 en total) procedían de 44 de pacientes con CaP, incluyendo 22 de alto riesgo, 11 de riesgo medio y 11 muestras CaP de bajo riesgo, y 29 muestras de hiperplasia benigna de próstata (BPH). Los 44 pacientes con CaP se clasificaron como se describe en la Tabla 1 de acuerdo con el sistema TNM* de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC). Los pacientes con CaP 11 de bajo riesgo tenían puntuaciones de Gleason de 6 y niveles de tPSA por debajo de 10 ng / ml. De los 11 pacientes con CaP de riesgo intermedio, 8 tenían puntuación de Gleason de 7, 1 presentó una puntuación de Gleason focal de 8 y 2 pacientes con CaP de riesgo intermedio fueron Gleason 6, uno con niveles de PSA por encima de 10 ng / mL y el otro presentó extensión extracapsular (T3a en la clasificación TNM*). De los 22 pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo, 17 eran pacientes con puntuaciones de Gleason igual o superior a 8, tres presentaron una puntuación de Gleason de 7 con metástasis. Los otros dos de alto riesgo presentaron metástasis, aunque no se disponía de los datos de la puntuación de Gleason del tumor primario. La edad y el promedio y el rango de los niveles de tPSA y fPSA de los distintos grupos (BPH, PCa de alto riesgo, PCa de riesgo intermedio y PCA de bajo riesgo) se muestran en la Tabla 1.

(*) El sistema TNM es un sistema ampliamente utilizado para el estadiaje de los tumores y ha sido aceptado por la "Union for International Cancer Control (UICC)", y por el "American Joint Committee on Cancer, AJCC".

Tabla 1: Características de las muestras

Patología	Casos	N	PuntuaciónGleason	N	Mediana de edad	±SD	Rango	tPSA ng/mL ±SD	Rango	fPSA ng/mL ±SD	Rango
BPH		29		29	63.24	8.08	44-76	9.76	3.05 5.53-18.20	1.72	0.75 0.31-3.06
PCa N=44	Riesgo bajo	11	Gleason 6	11	61.64	8.41	47-74	6.82	1.34 5.10-9.75	0.96	0.43 0.27-1.70
	Riesgo Intermedio	11	Gleason 6	2	64.5	14.85	54-75	10.92	7.75 5.44-16.40	1.32	0.11 1.24-1.39
			Gleason 7	8	66.5	4.44	58-73	9.79	3.77 6.96-17.63	0.93	0.49 0.36-1.98
			Gleason 8 focal	1	70			8.55		2.17	
	Alto riesgo	22	Gleason 7 / metastasis	3	78.3	8.1	69-83	15.13	4.39 12.42-20.2	2.72	1.50 1.00-3.73
			Gleason 8	8	61.63	10.89	51-81	24.42	15.38 4.14-54.12	2.17	1.95 1.04-6.81
			Gleason 9	8	71	9.77	51-79	28.55	33.35 6.48-109.7	4.56	4.93 0.19-15.20
			Gleason 10	1	49			15.07		3.39	
			Gleason no determinado	2	75	11.31	67-83	10.03	1.85 8.72-11.33	1.84	1.13 1.04-2.64

2. Preparación de las muestras

Para liberar el PSA complejo con α 1-antiquimotripsina (ACT), las muestras de suero (750 μ l) fueron tratadas primero con etanolamina (200 μ l 5M, Sigma-Aldrich, Germany), lo que daba una concentración de 1M de etanolamina a la mezcla de suero más etanolamina. Posteriormente se ajustó el pH a 10.3 con ácido clorhídrico 5M y se incubaron las mezclas 72 horas a 25 °C. Las muestras se neutralizaron luego a pH 7.8 con ácido clorhídrico 5M.

Con el fin de obtener el máximo rendimiento sin comprometer la integridad de proteínas se evaluaron previamente distintas concentraciones de etanolamina y distintos tiempos de incubación en un suero de un paciente con BPH (se determinaba en él el PSA). El porcentaje de escisión del complejo PSA-ACT era dependiente de la concentración de etanolamina. El aumento de la concentración molar de etanolamina a partir de 0,1 a 2,5 incrementó el porcentaje de fPSA de 32.9 % a 57.7%, respectivamente. Sin embargo, los resultados mostraron que a mayor concentración de etanolamina, menor era la recuperación de tPSA (ver Tabla 2). Por lo tanto, con el fin de preservar la integridad del PSA a analizar, diferentes tiempos de incubación y temperaturas se ensayaron con 1 M de etanolamina.

Tabla 2

Concentración etanolamina (M)	Tiempo de incubación (h)	Temperatura °C	% después de tratamiento con etanolamina fPSA	% después del tratamiento con etanolamina tPSA
0.1	24	25	32.88	87.5
0.5			48.10	89.2
1			51.63	85.5
2			54.93	77.3
2.5			57.74	73.1
1	24	25	50.87	77.0
	48		60.06	78.7
	72		60.00	81.1
	24	37	64.78	66.8
	48		71.32	61.9
	72		67.10	53.6

Las mejores condiciones para liberar PSA eran 1 M de etanolamina durante 72 horas a 25°C. Usando este protocolo el porcentaje de fPSA aumentó de 19% (suero no tratado) a 60% (suero etanolamina tratada). Los valores de fPSA a partir de las 73 muestras de suero del estudio después del tratamiento con etanolamina oscilaron entre el 50-80% de los valores de tPSA.

3. Inmunopurificación de tPSA de las muestras

Después de la liberación de PSA de la ACT, el tPSA sérico se aisló utilizando el kit de ensayo de PSA Access Hybritech (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.). En resumen, una suspensión de 100 μ l de partículas (perlas) paramagnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal de ratón anti-PSA (ensayo de PSA Access Hybritech, Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.) se lavaron con 500 μ l de tampón de incubación (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, 0,1% de Tween-20, 1% de BSA) usando separación magnética. Las perlas se incubaron después con 1 ml de suero tratado y neutralizado (que contiene 750 μ l de suero originales) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) con agitación. A continuación, las perlas se lavaron con 500 μ l de tampón de lavado (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, 1% Triton X-100) usando separación magnética y el PSA inmunoabsorbido se eluyó en tres pasos usando 100 μ l del tampón Gentle Ag / Ab de elución, pH

6.6 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) durante 30 minutos cada uno. El volumen de elución final fue de 300 µl. Las muestras se desalaron y se concentraron hasta un volumen final de 40 µl utilizando un dispositivo de filtro Amicon Ultra-0.5 3K Centrifugal Filter Devices (Millipore, Cork, IRL). Los filtros Amicon habían sido pre-tratados previamente con 5% de Brij-35 (Sigma-Aldrich, Alemania) y se usaron para el desalado de la muestra de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4. Determinación de la relación de fucosilación interna (RFI)

10 Las muestras inmunoprecipitadas según se ha comentado en el apartado anterior fueron sometidas a una segunda etapa de inmunopurificación mediante un ensayo de lectina unida a enzima (ELLA; de Enzyme linked lectin assay).

15 Para ello, anticuerpos monoclonales de ratón M-30 contra tPSA de Roche Diagnostics se diluyeron a 8 µg / ml en tampón fosfato salino (PBS) y se unieron a microplacas Maxisorp negras (FluoroNunc / LumiNunc Maxisorp Surface) durante la noche a temperatura ambiente (r.t; que significa de 20 a 30 °C). Las placas se lavaron 3 veces con solución salina-T (solución de NaCl al 0.9%, 0.05% v / v de Tween-20) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (2% w / v PVP en PBS). Después de lavar con solución salina-T, las muestras
20 obtenidas después de la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-tPSA (PSA total IP) se añadieron en un volumen final de 100 µl en PBS - 0,1% Tween-20 (PBST) y se dejaron incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con solución salina, se añadió la lectina PhoSL biotinilada diluida a 1 µg / ml en solución de lectina (150 mM Tris pH 7.4, NaCl 150 mM, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) y se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se
25 lavaron a continuación con solución salina-T y estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (GE Healthcare-, Reino Unido) [diluida 1: 5000 en PBS] y se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS y la detección se realizó con 100 µl / pocillo de el sustrato de peroxidasa de rábano QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate (Thermo Scientific, EE.UU.). La reacción se detuvo con 10 µl / pocillo de solución de parada
30 QuantaRed Stop Solution (Thermo Scientific, EE.UU.) y la fluorescencia se leyó a 585 nm después de excitación a 530 nm en un lector de microplacas automatizado (BIO-TEK, EE.UU.). Los pocillos que contenían sólo tampón PBST fueron utilizados como controles negativos (blancos) y los pocillos con sueros de mujeres (sin PSA endógeno pero procesados en paralelo con las muestras) se utilizaron como controles para normalizar la señal de fondo.

35 Este ensayo se utilizó para analizar el contenido de PSA que contiene fucosa interna (niveles de fucosilación interna) de una cohorte de sueros que consistió en 20 muestras de BPH (tPSA a partir de 7.82 a 18.20 ng / ml) y 20 muestras de cáncer de próstata (CaP) de alto riesgo (12 con un tPSA a partir de 8,72 a 19.53 ng / ml y 8 con un tPSA de más de 20 ng / ml). Para ello, los sueros fueron
40 tratados como se ha indicado antes con etanolamina, e inmunoabsorbidos (inmunoprecipitados). Seguidamente se analizaron con el ensayo ELLA descrito anteriormente. Para cada muestra, se realizaron dos diluciones por duplicado que podrían ser interpolados en una curva de calibración realizada con PSA estándar comercial. La curva de calibración osciló entre 0,8 a 13 ng de PSA estándar por pocillo.

45 El PSA estándar se corresponde con un PSA con un patrón de glicosilación caracterizado, que se añade a un pool de suero de mujer (por tanto, sin PSA endógeno). El PSA estándar que está N-glicosilado contiene un 77% de sus N-glicanos con fucosilación interna.

50 Para realizar las réplicas correspondientes, se requirieron 1,5 ml de suero de cada muestra con valores de tPSA por encima de 8 ng / mL. Sólo se usaron muestras con un coeficiente de variación (CV) por debajo del 15%. El CV interensayo del ELLA se determinó con una muestra de

CaP de alto riesgo de 12,4 ng / ml de tPSA en cinco ensayos independientes y se encontró que estaba por debajo del 10%.

Para cada muestra, la cantidad de PSA que contenía fucosa interna (obtenida a partir del ensayo ELLA) se dividió por el valor de fPSA de la misma muestra inmunoprecipitada, utilizando la plataforma ELECSYS®, y el cociente resultante se denominó relación de fucosilación interna (RFI). La plataforma ELECSYS® en el dispositivo Modular Analytics E170 (Roche Diagnostics) contiene el anticuerpo monoclonal biotinilado anti PSA libre (anti-fPSA) denominado M-30 para medir el fPSA y el anticuerpo monoclonal biotinilado denominado M-36 anti PSA total (anti-tPSA).

La relación de fucosilación interna de las muestras se representó frente a la concentración de tPSA sérico en ng/mL (FIG. 1(A)) y frente a la agrupación por patologías (BPH y PCa de alto riesgo) (FIG. 1(B)). Como se muestra en la FIG. 1, el grupo de BPH mostró significativamente una mayor relación de fucosilación interna (0.72 a 1.56) que los pacientes con CaP de alto riesgo (0.53-1.00) (significación establecida en $p < 0,05$). Se realizó una curva ROC de la relación de fucosilación interna y se comparó con la curva ROC de tPSA y la del porcentaje de fPSA. El ensayo ROC realizado con las 40 muestras de suero de pacientes, mostró que los pacientes con CaP de alto riesgo se discriminaban de los que padecían BPH con un 90% de sensibilidad y con una especificidad del 95%, siendo el punto de corte del parámetro denominado relación de fucosilación interna (RFI) = 0.86 con un área bajo la curva (AUC) de 0.94 (Figura 1C).

Las bajas cantidades de PSA en suero (2-20 ng / ml), que representan sólo entre un 0.0000025 y 0.000025% en peso de la proteína total en suero, y el hecho de que otras proteínas de suero son glicoproteínas que incluyen fucosa en el núcleo de sus N-glicanos, hace que desarrollar un ensayo para detectar específicamente PSA fucosilado represente un desafío importante. Generalmente, se lleva a cabo la detección de este monosacárido mediante lectinas. El método debe incluir una etapa de inmunopurificación del PSA para eliminar la mayoría de las proteínas séricas glicosiladas, en particular aquellas que pueden contener fucosa en las cadenas oligosacáridas, tales como las inmunoglobulinas, con el fin de que la señal generada por la fucosa al ser reconocida por la lectina pueda atribuirse a la molécula de PSA y no a otras.

Por eso, para poner a punto el método de la invención primero se comprobó si otras proteínas distintas del PSA que contuvieran fucosa en el núcleo de sus N-glicanos se recuperaban en este proceso de inmunopurificación. Con este fin, se utilizó el PSA estándar con un patrón de glicosilación caracterizado con el que se enriquecía un pool de suero de mujeres (por tanto, sin PSA endógeno) (suero control). El PSA estándar que está N-glicosilado contiene un 77% de sus N-glicanos con fucosilación interna. Este PSA estándar se añadió en sueros control y fue inmunopurificado utilizando anticuerpos contra tPSA (anti-tPSA) unidos covalentemente a perlas magnéticas (IP PSA total) y también utilizando el anticuerpo monoclonal biotinilado contra fPSA M-30 (PSA libre IP), este último unido a perlas recubiertas de estreptavidina.

El PSA inmunoabsorbido en las dos inmunoprecipitaciones anteriores (con anti-tPSA o anti-fPSA) se eluyó con un tampón de alta fuerza salina, se desaló y se concentró usando filtros del tipo centricon (Merk-Millipore). La cuantificación de proteínas y de PSA inmunoabsorbido/inmunoprecipitado indicó que el 99% de proteínas de suero habían sido eliminadas y que el PSA se recuperaba en porcentajes de alrededor del 40% en peso. El PSA de estas dos inmunoprecipitaciones se evaluó en Western blot y con lectinas que reconocen la fucosa para visualizar si con las inmunoprecipitaciones había otras proteínas que habían sido recuperadas y que presentaban fucosilación interna. No se muestran los datos pero, aparecieron bandas de proteínas de mayor peso molecular que el PSA.

Es por ello que, con la finalidad de eliminarlas se decidió llevar a cabo una doble inmunoprecipitación. Así, después de inmunoprecipitar el tPSA, éste se sometió a una

inmunoprecipitación con anticuerpo anti-fPSA. Se comprobó en un Western blot que con la PhoSL se detectaba una banda de PSA y apenas se detectaban otras glicoproteínas con fucosilación interna. Por eso se eligió la lectina PhoSL para determinar de manera más específica la cantidad de PSA que contiene fucosa interna (también denominado aquí los niveles de fucosilación o niveles de fucosa).

5. Determinación del porcentaje de PSA sérico que contiene ácido siálico α 2,3.

Se prepararon columnas de lectina (una por muestra aislada a analizar) mediante la carga de 250 μ l de agarosa que contenía lectina de corteza de saúco (SNA; *Sambucus nigra* agglutinin) (Vector Laboratories, INC.) en tubos de centrífuga spin-X (0,22 micras de acetato de celulosa) de Corning, Costar (NY, EE.UU.). La agarosa estaba en forma de perlas reticuladas al 4 % con un límite de tamaño de exclusión molecular de 2×10^7 daltons (Da). Las columnas de lectina se lavaron vigorosamente con 4 ml de tampón de lectina (LB) [Hepes 10 mM (pH 7.6), NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM]. El PSA de las muestras de suero (0.75 ml por muestra) se purificó utilizando el protocolo de inmunoprecipitación (apartado 3) descrito antes. A continuación, las muestras se diluyeron en LB a un volumen final de 405 μ l y se incubaron con lectina SNA durante 16 horas a 4°C. Las columnas se centrifugaron 2 minutos a 2.000 rpm a 4°C y se lavaron dos veces (5 min cada uno) con 500 μ l de LB que contenía 1% de albúmina de suero bovina (BSA) (UB; es la fracción no unida y que contiene PSA con sólo ácido siálico α 2,3 en la cadena oligosacárida tal como se describe más abajo). A continuación, la fracción unida se eluyó primero mediante la incubación de la lectina dos veces con 500 μ l de una solución 0,5 M lactosa en 1% de BSA en LB, durante 20 min a temperatura ambiente (fracción B1). Se realizó una segunda elución (B2) con 0,5 M de lactosa en 1% de BSA en LB, y 0,2 M de ácido acético. Las fracciones unidas (B, que contienen PSA con ácido siálico α 2,6) se recogieron por centrifugación a 2.000 rpm durante 2 minutos. En la elución ácida, antes de la centrifugación, se añadieron al tubo colector 150 μ l de Tris 1 M pH 9,0 con el fin de neutralizar la muestra. El PSA total (tPSA) y el PSA libre (fPSA) cargados en la columna y eluidos en cada fracción fueron cuantificados por el ensayo ELECSYS.

El porcentaje de PSA que comprende ácido siálico α 2,3 (% α 2,3-PSA) en cada muestra de suero aislada se calculó como el cociente entre la cantidad de fPSA de la fracción no unida (UB-fPSA) en la lectina respecto de la suma de las cantidades de fPSA de las fracciones no unida (UB-fPSA) y unida (B-fPSA), según la siguiente fórmula (Ib):

$$\% \alpha 2,3\text{-PSA} = [(UB\text{-fPSA}) / ((UB\text{-fPSA}) + (B\text{-fPSA}))] \times 100 \text{ (Ib)}$$

Con esta metodología se analizó el porcentaje de PSA que comprende ácido siálico α 2,3 en las muestras de suero de una cohorte de sujetos que consistía en 22 muestras de BPH (tPSA de 5.53 a 14.71 ng / mL), 11 muestras de cáncer de próstata (CaP) de bajo riesgo (tPSA de 5.10 a 9.75 ng / mL), 11 muestras de cáncer de próstata (CaP) de riesgo intermedio o moderado (tPSA a partir de 5.44 a 17.63 ng / mL) y 21 muestras de cáncer de próstata (CaP) de alto riesgo (13 con un tPSA a partir de 4.14 a 19.53 ng / mL y 8 con un tPSA más de 20 ng / mL). La cuantificación del fPSA de las fracciones no unidas y unidas de cada muestra una vez sometidas a la cromatografía permitió calcular los porcentajes relativos de PSA en la fracción no unida (PSA- α 2,3 sialilado) y en las fracciones unidas (PSA α 2,6-sialilado). La variación interensayo del método se determinó usando un suero de CaP (tPSA de 31.89 ng / mL) en 10 experimentos independientes, y se encontró que estaba por debajo del 5%.

En la FIG. 2 (A) se muestra el porcentaje de PSA no unido de las muestras, lo que corresponde al porcentaje de PSA que comprende ácido siálico α 2,3 (o PSA α 2,3-sialilado), respecto la concentración de PSA total (tPSA) en el suero de cada muestra. En la FIG. 2(B) se muestra este mismo parámetro para cada uno de los cuatro grupos o tipos de muestras/pacientes ensayados.

De esta FIG. 2 (A) y (B) se desprende que hay un aumento significativo de PSA que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ en el grupo de pacientes con CaP de alto riesgo (CaP HR 26.5 a 61.4%) en comparación con los otros tres grupos: CaP de riesgo intermedio (CaP IR; 16.9-35.5%); CaP de bajo riesgo (CaP LR; 12.5 a 29.9%); BPH (13.4-33.5%), con una significación de $p < 0,05$. No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de PSA $\alpha 2,3$ -sialilado en BPH y los

Además, se representaron gráficamente las curvas ROC del del porcentaje de PSA que contiene ácido siálico $\alpha 2,3$ (% $\alpha 2,3$ -PSA) y se compararon con las curva ROC de tPSA y del porcentaje de fPSA (FIG. 2(C)). El ensayo ROC para % $\alpha 2,3$ -PSA realizado con las 65 muestras de suero de pacientes mostró que los pacientes con CaP de alto riesgo se discriminaban muy bien de los pacientes con BPH y de los pacientes con cánceres de próstata de riesgo intermedio o bajo. La sensibilidad fue del 85.7% y la especificidad de 95.3% si se analizaba el % $\alpha 2,3$ -PSA de las muestras respecto un valor control de referencia o de corte del 30% . El valor de área bajo la curva (AUC = 0.968) se calculó como una indicación de la exactitud de la predicción del parámetro % $\alpha 2,3$ -PSA.

Además, el % $\alpha 2,3$ -PSA correlacionó significativamente ($p < 0,01$) con la puntuación de Gleason del tumor (coeficiente de correlación de 0.54) (FIG. 3). Con ello, esta relación conlleva la ventaja que puede ayudar a los médicos a mejorar la evaluación del pronóstico utilizando un parámetro medido en suero, pudiendo reducir así el número de biopsias de próstata.

La metodología para determinar los niveles de ácido siálico $\alpha 2,3$ en PSA (o PSA que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$) se basó, por tanto, en una cromatografía con una fase sólida que comprendía lectina, en particular utilizando columnas de agarosa con SNA. La SNA se une a glicoconjugados que comprenden ácido siálico $\alpha 2,6$.

Como se decía antes, la fracción UB comprendía el PSA con ácido siálico $\alpha 2,3$ porque previamente los inventores llevaron a cabo un ensayo de especificidad de la columna de cromatografía (o lo que es lo mismo de la fase sólida con lectina). La especificidad de la cromatografía SNA fue validada usando primero el PSA estándar disuelto en suero de mujer. En primer lugar, se estableció la proporción de SNA-agarosa / suero, para evitar la saturación de la columna de lectina, que fue de 10 μ l de suero en 500 μ l de agarosa-SNA. Para aumentar la cantidad de suero y para evitar la saturación de la columna debido a otras proteínas séricas sialiladas, la muestra de suero que contiene PSA estándar fue inmunoabsorbida primero utilizando anticuerpos monoclonales contra PSA total (anti-tPSA) unido covalentemente a perlas magnéticas como se ha descrito anteriormente, lo que permitió cargar 0.75 ml de suero inicial. Después de optimizar el protocolo, la selectividad de la columna de lectina SNA para ácido siálico $\alpha 2,6$ se evaluó utilizando este PSA estándar tratado. El PSA estándar se sometió a cromatografía y la fracción retenida se eluyó usando lactosa 0.5 M. Una segunda fracción se eluyó con lactosa 0.5 M en ácido acético 0.2 M en 0.001% de BSA. La cuantificación del fPSA de la fracción UB y de las dos fracciones unidas Bs se realizó utilizando la plataforma ELECSYS (antes detallada).

A continuación, se calcularon los porcentajes relativos de fPSA en la fracción no unida (PSA $\alpha 2,3$ -sialilado) y en las fracciones unidas (PSA- $\alpha 2,6$ sialilado). Por tanto, se pudo determinar que el 25% del PSA estándar contenía N-glicanos- α 2,3 sialilados de acuerdo con los datos publicados anteriores (Tabares et al, *supra*). El PSA de las fracciones UB y B se aisló utilizando electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se tiñó con azul de Coomassie. El análisis de densitometría de las bandas de gel reveló un 25,7% de PSA en la fracción no unida (UB) vs un 75.4% en fracciones unidas (B1 + B2) que era consistente con el porcentaje de ácido siálico $\alpha 2,3$ / ácido siálico $\alpha 2,6$ obtenido en análisis anteriores (Tabarés et al., *supra*).

Se realizó la escisión de la banda de proteína y la liberación de los N-glicanos del PSA se llevó a cabo con la enzima PNGasa. En resumen, las fracciones de gel se lavaron y trataron con PNGasa F para liberar los N-glicanos del PSA. Estos N-glicanos se marcaron fluorescentemente con 2-aminobenzamida (2AB) por aminación reductiva usando el kit Ludger Tag 2AB. El exceso de 2AB se eliminó por cromatografía ascendente en papel Whatman 3MM en acetonitrilo. Los glicanos marcados con 2AB se digirieron en 10 µl de tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5.5 durante 18 horas a 37 °C con la sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (ABS) (EC 3.2.1.18), 0.5 U/ml o la sialidasa de *Streptococcus pneumonia* (NAN1) (EC 3.2.1.23) específica de ácido siálico α2,3, 1.7 U/ml. Seguidamente se separaron las enzimas (filtración por filtros EZ de Millipore) y se analizaron los N-glicanos mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC). Estos N-glicanos derivatizados con 2AB se separaron por cromatografía líquida de ultraresolución y con detección de fluorescencia (dispositivo Waters Acquiti UPLC). La columna para la separación consistió en una columna de glicano BEH de 2.1 x 150 mm, 1.7 µm de partículas BEH (Solvente A: 50 mM ácido fórmico ajustado a pH 4.4 con solución de amoníaco; Solvente B: acetonitrilo; Tª columna 30 °C; El método cromatográfico fue de n 30 min con un gradiente lineal de 70-53 % acetonitrilo a 0.56 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µl de muestra en 60% v/v de acetonitrilo; Detección fluorescencia: excitación a 330 nm y emisión a 420 nm). Los tiempos de retención se trasladaron a unidades de glucosa (GU) con la ayuda de un estándar realizado con dextrano hidrolizado.

La secuenciación de los N-glicanos liberados del PSA mostró que la fracción no unida (UB) contenía glicanos monosialilados principalmente y unos pocos glicanos disialilados que fueron digeridos a las correspondientes estructuras neutras con NAN1, tratamiento específico con α2,3-sialidasa. Por lo tanto, la fracción libre contenía sólo el PSA con ácido siálico α2,3 que no quedaba retenido en la columna de la SNA. Ambas fracciones unidas (B= B1+B2) contenían N-glicanos con ácido siálico α2,6. La FIG. 4 muestra el perfil de retención de las distintas muestras UB y B de PSA estándar tratados con PNGasa y con los N-glicados digeridos por NAN1 o ABS. Los perfiles procedentes de la fracción UB muestran como inicialmente los distintos tipos de oligosacáridos (N-glicanos) comprendían ácido siálico α2,3, que desaparecían una vez digeridos con NAN1 y también con ABS (que digiere cualquier forma de ácido siálico α2,6 o α2,3). Por otro lado, los perfiles de retención de las fracciones unidas (Bs) muestran que mayoritariamente comprendían PSA con ácido siálico α2,6.

En todos los ensayos llevados a cabo y descritos en esta descripción, el análisis estadístico se llevó a cabo según se describe a continuación:

Los pacientes fueron divididos en cuatro grupos; BPH, CaP de bajo riesgo, CaP de riesgo intermedio y CaP de alto riesgo. Todos los análisis estadísticos se realizaron en los pacientes dentro del rango de tPSA entre 4.14 y 109.7 ng / mL.

Los medios de comparación y el análisis de correlación de las variables se realizaron utilizando el programario IBM SPSS Statistics 19 para Windows. Los datos con un coeficiente de variación entre ensayos de CV> 15% no se incluyeron en los análisis estadísticos. Las variables fueron analizadas para la normalidad y homocedasticidad mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov y de Levene. Cuando se cumplieron estos criterios (estudio de ácido siálico α2,3% (SA)), las diferencias entre los grupos fueron analizadas mediante ANOVA con el test post-hoc de Bonferroni. Al contrario, para los grupos no normalmente distribuidos (estudio de fucosilación) se realizó el test U de Mann-Whitney. Las curvas ROC se generaron con el software SPSS. Para el contenido α2,3-SA se calculó el valor de criterio superior correspondiente al más alto del promedio de sensibilidad y especificidad con el software estadístico R (versión 3.1.2). Se realizó la regresión bivalente (correlación de Pearson) para evaluar el valor diagnóstico del contenido α2,3-SA. En todos los análisis estadísticos, el nivel significativo se fijó en 5%. Los resultados se muestran como las medias de los valores (95% de intervalo de confianza, IC).

REFERENCIAS CITADAS

- Tabarés et al. "Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cáncer será in relation to seminal plasma PSA", Glycobiology – 2006, vol. No. 16(2), pp.: 132-145.
- 5 - Sarrats et al., "Differential percentage of serum prostate-specific antigen subforms suggests a new way to improve prostate cancer diagnosis." Prostate – 2010 vol. No. 70(1), pp.:1-9.
- Meany et al., "Glycoproteomics for Prostate Cancer Detection: Changes in Serum PSA Glycosylation Patterns", J Proteome Res – 2009, vol. No. 8(2), pp.: 613-619.
- 10 - Li et al., "Serum Fucosylated Prostate-specific Antigen (PSA) Improves the Differentiation of Agressive from Non-aggressive Prostate Cancers", Theranostics – 2015, vol.no. 5(3), pp.: 267-276.
- Ohyama et al. "Carbohydrate structure and differentiak binding of prostate-specific antigen to Maackia amurensis lectin between prostate cáncer and benign prostate hypertrophy", Glycobiology – 2004, vol. No. 14(8), pp.: 671-679.
- 15 - Chang et al., "High-risk prostate cancer-Classification and therapy", Nat.Rev.Clin. Onco - 2014, vol. no. 11, pp.: 308-323.
- Humphrey, et al. "Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate", Modern Pathology -2004, vol. no. 17, pp.: 292–306.

REIVINDICACIONES

1.- Método para el diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata de alto riesgo en una muestra fluida aislada de un sujeto, caracterizado porque comprende determinar el patrón de glicosilación del antígeno prostático específico de la muestra, dicho patrón definido por la presencia y proporción de fucosa interna y/o por la presencia y porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$, y donde el método comprende:

(A) Determinar la cantidad de antígeno prostático específico de la muestra que comprende fucosa interna y calcular un parámetro denominado relación de fucosilación interna de la muestra, como el cociente entre la cantidad de antígeno prostático específico que comprende fucosa interna respecto a la cantidad de antígeno prostático específico libre de la muestra, según la fórmula (II)

RFI = (fucose-PSA) / fPSA (II),

donde RFI es la relación de fucosilación interna, fucose-PSA es la cantidad de antígeno prostático específico de la muestra que comprende fucosa interna y fPSA es la cantidad de antígeno prostático específico libre de la muestra;

y/o

(B) Separar el antígeno prostático específico de la muestra en dos fracciones B y UB, mediante la interacción con una fase sólida que comprende lectinas específicas contra ácido siálico, donde la fracción UB comprende antígeno prostático específico con ácido siálico $\alpha 2,3$ y no comprende antígeno prostático específico con ácido siálico $\alpha 2,6$, y donde la fracción B comprende antígeno prostático específico con ácido siálico $\alpha 2,6$; determinar en cada una de estas fracciones UB y B la cantidad de antígeno prostático específico; y calcular el porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$, calculando el cociente entre la cantidad de antígeno prostático específico de la fracción UB (UB-PSA) respecto a la suma de la cantidad de antígeno prostático específico de las fracciones UB (UB-PSA) y B (B-PSA) de acuerdo con la fórmula (I)

% $\alpha 2,3$ -PSA = [(UB-PSA) / ((UB-PSA) + (B-PSA))] x 100 (Ia);

donde:

si el porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ es mayor que un valor control de referencia, el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo; y/o si la relación de fucosilación interna en la muestra aislada es menor que un valor control de referencia, el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo, donde el cáncer de próstata de alto riesgo es aquel que se corresponde con una puntuación de grado Gleason igual o superior a 8 o grado Gleason 7 con metástasis.

2. - Método según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende determinar el patrón de glicosilación del antígeno prostático específico de la muestra, dicho patrón definido por la presencia y proporción de fucosilación interna y/o por la presencia y porcentaje de ácido siálico $\alpha 2,3$, de acuerdo con las siguientes etapas:

(a) mezclar la muestra fluida aislada con una solución de etanolamina a una concentración molar final de etanolamina de 0.5 al 2.5 M;

(b) inmunoprecipitar la solución obtenida en la etapa (a) con un anticuerpo específico de antígeno prostático específico y eluir el antígeno prostático específico inmunoprecipitado para recuperar el antígeno prostático específico de la muestra; y
 (c) en la solución de la etapa (b):

(c.1) Separar el antígeno prostático específico en dos fracciones B y UB, mediante la interacción con una fase sólida que comprende lectinas específicas contra ácido siálico, donde la fracción UB comprende antígeno prostático específico con ácido siálico $\alpha 2,3$ y no comprende antígeno prostático específico con ácido siálico $\alpha 2,6$, y donde la fracción B comprende antígeno prostático específico con ácido siálico $\alpha 2,6$;

(c.2) determinar en cada una de estas fracciones UB y B la cantidad de antígeno prostático específico; y

(c.3) calcular el porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$, calculando el cociente entre la cantidad de antígeno prostático específico de la fracción UB (UB-PSA) respecto a la suma de la cantidad de antígeno prostático específico de las fracciones UB (UB-PSA) y B (B-PSA) de acuerdo con la fórmula (Ia)

$$\% \alpha 2,3\text{-PSA} = [(UB\text{-PSA}) / ((UB\text{-PSA}) + (B\text{-PSA}))] \times 100 \quad (Ia);$$

y/o

(d) En la solución de la etapa (b) determinar la cantidad antígeno prostático específico libre y determinar la cantidad de antígeno prostático específico que comprende fucosa interna; y calcular un parámetro denominado relación de fucosilación interna de la muestra como el cociente entre la cantidad de antígeno prostático específico que comprende fucosa interna (fucose-PSA) respecto a la cantidad de antígeno prostático específico libre de la muestra según la fórmula (II)

$$RFI = (fucose\text{-PSA}) / fPSA \quad (II);$$

donde:

si el porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico $\alpha 2,3$ según la fórmula (Ia) es mayor que un valor control de referencia, el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo; y/o si la relación de fucosilación interna según la fórmula (II) en la muestra aislada es menor que un valor control de referencia, el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo, donde el cáncer de próstata de alto riesgo es aquel que se corresponde con una puntuación de grado Gleason igual o superior a 8 o grado Gleason 7 con metástasis.

3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque la concentración molar de etanolamina en la solución de la etapa (a) es de 1 a 1.5 molar.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, caracterizado porque la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura de 20 °C a 40 °C.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, caracterizado porque la etapa (a) se lleva a cabo por un periodo de tiempo de 20 horas a 75 horas.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la muestra fluida aislada del sujeto se selecciona del grupo constituido por sangre completa, suero, plasma y orina.

7.- Método según la reivindicación 6, caracterizado porque la muestra aislada es suero.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α -2,3 se determina mediante cromatografía de afinidad en una columna con una fase sólida que comprende lectina de *Sambucus nigra* (SNA) y se procede de acuerdo con las siguientes etapas:

- 5 (i) el antígeno prostático específico de la muestra se incuba con la lectina de *Sambucus nigra* en una columna de cromatografía por un periodo de 15 horas a 20 horas y a una temperatura de 2 °C a 7 °C, dicha lectina de *Sambucus nigra* con la capacidad de retener el antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α -2,6;
- 10 (ii) se centrifuga la columna y se eluye al menos dos veces durante 3-7 minutos, con un volumen de 200-700 μ l de una solución tamponadora, para obtener la fracción no unida a la columna (UB) y que comprende el antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α 2,3;
- 15 (iii) se eluye la fracción de antígeno prostático específico unido a la columna (B), que comprende ácido siálico α 2,6, de acuerdo con las siguientes dos sub-etapas:
 - incubar dos veces la lectina con una solución tampón que comprende lactosa a una temperatura de 20 °C a 30 °C y a un pH de 7 a 7.5 para obtener una primera fracción de eluido; e
 - 20 - incubar la lectina con una solución ácida a un pH de 2.5 a 3 que comprende lactosa a una temperatura de 20 a 30 °C para obtener una segunda fracción de eluido y neutralizarla a un pH de 7 a 8;
- 25 (iv) se determina el antígeno prostático específico de cada una de las etapas (ii) y (iii) y se calcula el porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α -2,3, como el cociente entre el antígeno prostático específico de la fracción UB de la etapa (ii) respecto de la suma del antígeno prostático específico de las fracciones UB y B de las etapas (ii) y (iii), de acuerdo con la fórmula (Ia) anterior.
- 30 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la determinación de la relación de fucosilación interna se lleva a cabo mediante un ensayo de lectina unido a enzima (ELLA) con la lectina de *Pholiota squarrosa* (PhoSL) conjugada con biotina, de acuerdo con las siguientes etapas:
- 35 (i) se incuba el antígeno prostático específico de la muestra fluida aislada con un anticuerpo específico de antígeno prostático específico libre por un tiempo de 1 a 3 horas;
- (ii) se añade tras la etapa (i) la lectina de *Pholiota squarrosa* (PhoSL) conjugada con biotina por un tiempo de 1 a 3 horas;
- 40 (iii) se añade tras la etapa (ii) una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano por un periodo de 1 a 1,5 horas, periodo tras el cual se añade el sustrato de la enzima peroxidasa conjugado a una molécula emisora de fluorescencia y se determina la fluorescencia emitida, que es proporcional a la cantidad de antígeno prostático específico que comprende fucosa interna; y
- 45 (iv) se determina el antígeno prostático específico libre de la muestra y se calcula la relación de fucosilación interna, de acuerdo con la fórmula (II) anterior.
- 50 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque el valor control de referencia de la relación de fucosilación interna es 0.86 y el valor control de referencia del porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α -2,3 es del 30 %.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque es para el diagnóstico diferencial de cáncer de próstata de alto riesgo del cáncer de próstata de riesgo intermedio y de riesgo bajo y de enfermedades benignas de la próstata.
- 5 12. Método según la reivindicación 11, caracterizado porque las enfermedades benignas de próstata se seleccionan del grupo formado por hiperplasia benigna de próstata, prostatitis y manipulaciones de la próstata.
- 10 13. Método para decidir o recomendar un régimen médico para cáncer de próstata de alto riesgo, dicho régimen médico seleccionado entre tratamiento farmacológico e intervención quirúrgica, que comprende llevar a cabo el método de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12; y donde, si el sujeto es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo se recomienda o decide el régimen médico indicado para el cáncer de próstata, y si el sujeto no es diagnosticado de cáncer de próstata de alto riesgo pero es diagnosticado de una enfermedad benigna de próstata o cáncer de próstata de riesgo bajo o moderado se recomienda o decide el régimen médico para esta otra enfermedad.
- 15 14. Uso de (a) la relación de fucosilación interna, que resulta de determinar en una muestra fluida aislada de un sujeto el cociente entre la cantidad de antígeno prostático específico que comprende fucosa interna y la cantidad de antígeno prostático específico libre de la muestra; y/o (b) del porcentaje de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α -2,3, y que resulta de calcular la relación entre el antígeno prostático específico de una fracción no unida a lectina específica contra ácido siálico respecto de la suma de las fracciones de antígeno prostático específico unido y no unido a dicha lectina, como biomarcadores independientes de cáncer de próstata de alto riesgo, donde el cáncer de próstata de alto riesgo es aquel que se corresponde con una puntuación de grado Gleason igual o superior a 8 o grado Gleason 7 con metástasis.
- 20 15. Uso según la reivindicación 14, caracterizado porque la muestra fluida aislada donde se determina la cantidad de antígeno prostático específico que comprende fucosa interna y/o la cantidad de antígeno prostático específico de las fracciones unida y no unida a lectina, es una muestra que previamente ha sido mezclada con una solución de etanolamina, esta etanolamina a una concentración molar final de 0.5 M al 2.5 M, y seguidamente inmunoprecipitada con un anticuerpo específico de antígeno prostático específico.
- 25 16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14-15, donde la muestra fluida aislada del sujeto se selecciona del grupo constituido por sangre completa, suero, plasma y orina.
- 30 17. Uso según la reivindicación 16, donde la muestra fluida aislada del sujeto es suero.
- 35 18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14-17, donde el biomarcador es para el diagnóstico diferencial de cáncer de próstata de alto riesgo y cáncer de próstata de riesgo bajo o intermedio y/o enfermedades benignas de la próstata.
- 40 19. Kit que comprende medios para determinar en una muestra fluida aislada de un sujeto la cantidad de antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α -2,3 y/o la cantidad de antígeno prostático específico que comprende fucosa interna, caracterizado porque comprende:
- 45 (a) un anticuerpo específico de antígeno prostático específico libre; y
 (b) una fase sólida para columna cromatográfica de afinidad que comprende una lectina específica contra ácido siálico y, opcionalmente, soluciones para la elución de la muestra cargada en dicha columna, como medios para detectar y cuantificar la cantidad antígeno prostático específico que comprende ácido siálico α -2,3; y/o
- 50

- 5 (c) una lectina específica contra fucosa y conjugada con biotina; opcionalmente un anticuerpo específico de antígeno prostático específico libre, dicho anticuerpo inmovilizado en una placa de pocillos; y opcionalmente, una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano y un sustrato de la enzima peroxidasa conjugado a una molécula emisora de fluorescencia, como medios para detectar y cuantificar el antígeno prostático específico que comprende fucosilación interna.
- 10 20. Kit según la reivindicación 19, donde la lectina específica contra ácido siálico es la aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) y la lectina específica contra fucosa interna es la lectina de *Pholiota squarrosa* (PhoSL).
- 15 21. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 19-20, caracterizado porque además comprende:
 (a) una solución de etanolamina para ser mezclada con la muestra del sujeto y obtener una concentración final de etanolamina del 0.5 al 2.5 M; y
 (b) un anticuerpo específico de antígeno prostático específico unido a un soporte para inmunoprecipitación.

(A)

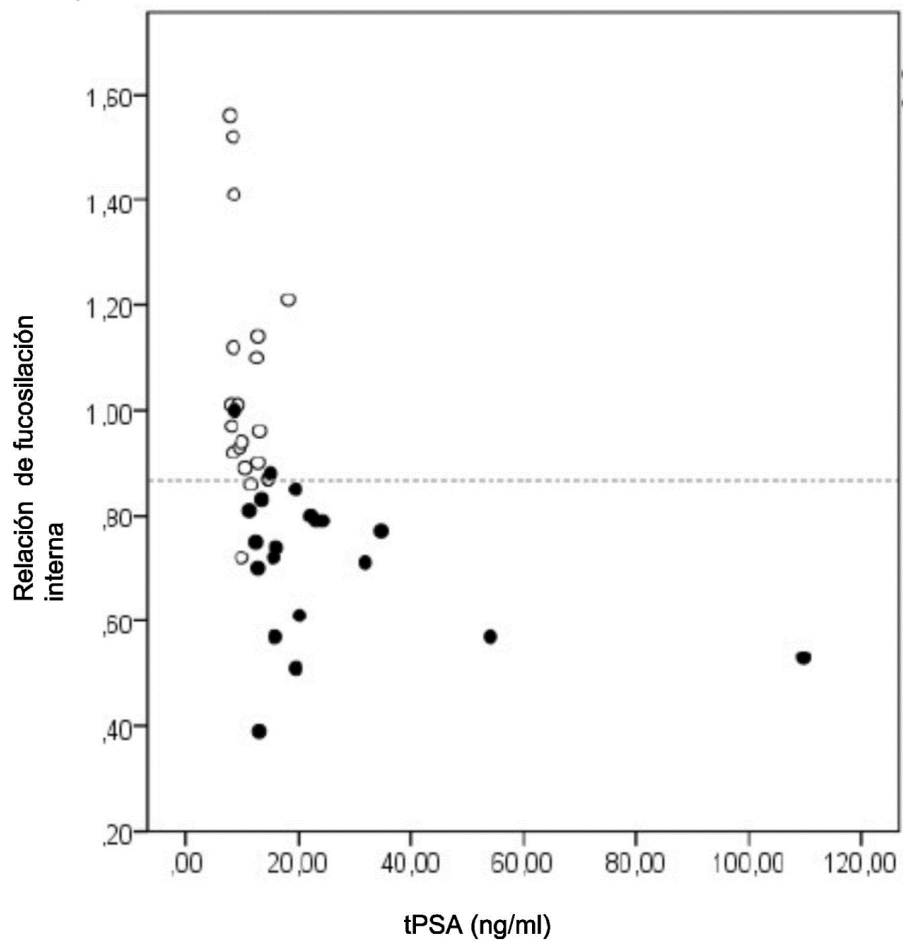
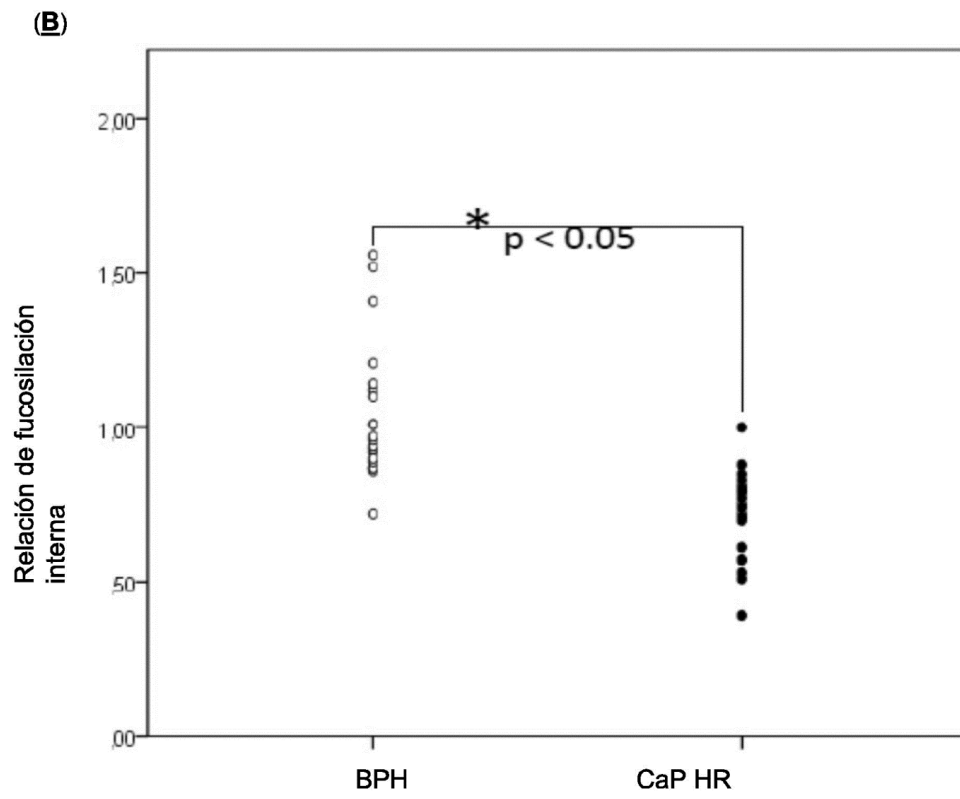
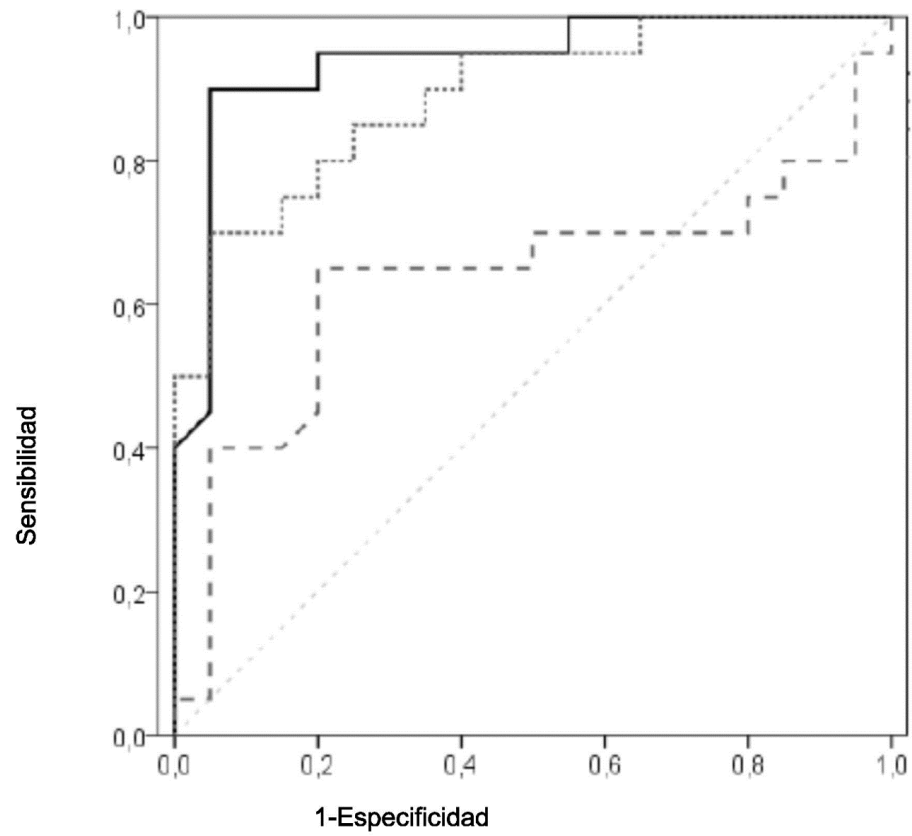


FIG. 1



Cont FIG. 1

(c)



____ :Relación de fucosilación interna (RFI)
 : tPSA (ng/ml)
 ----- : % fPSA

Cont FIG. 1

(A)

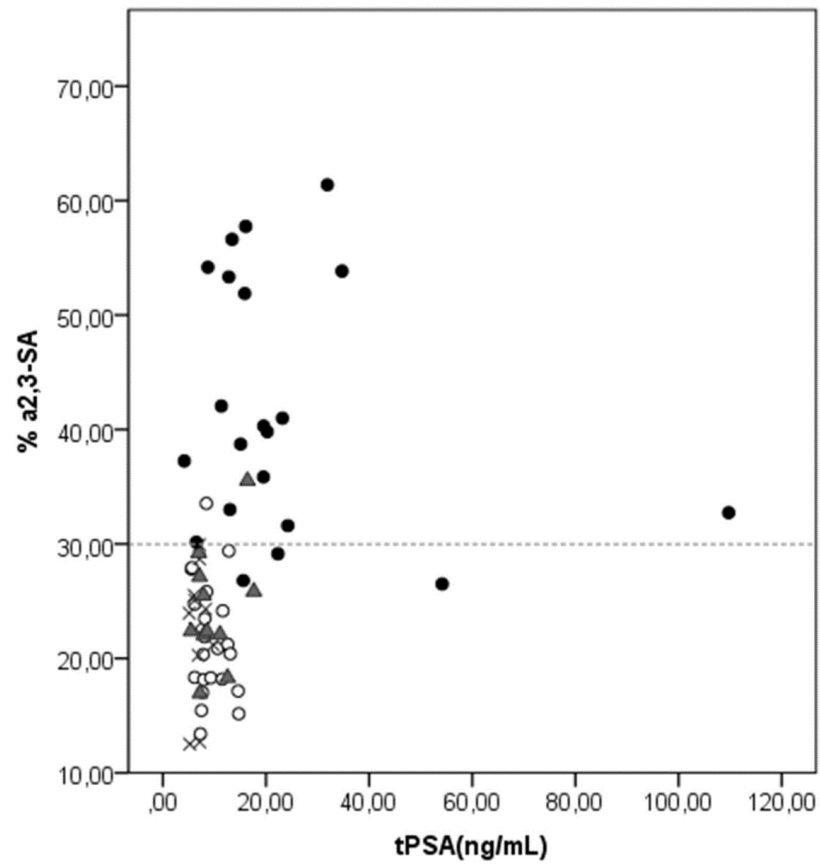
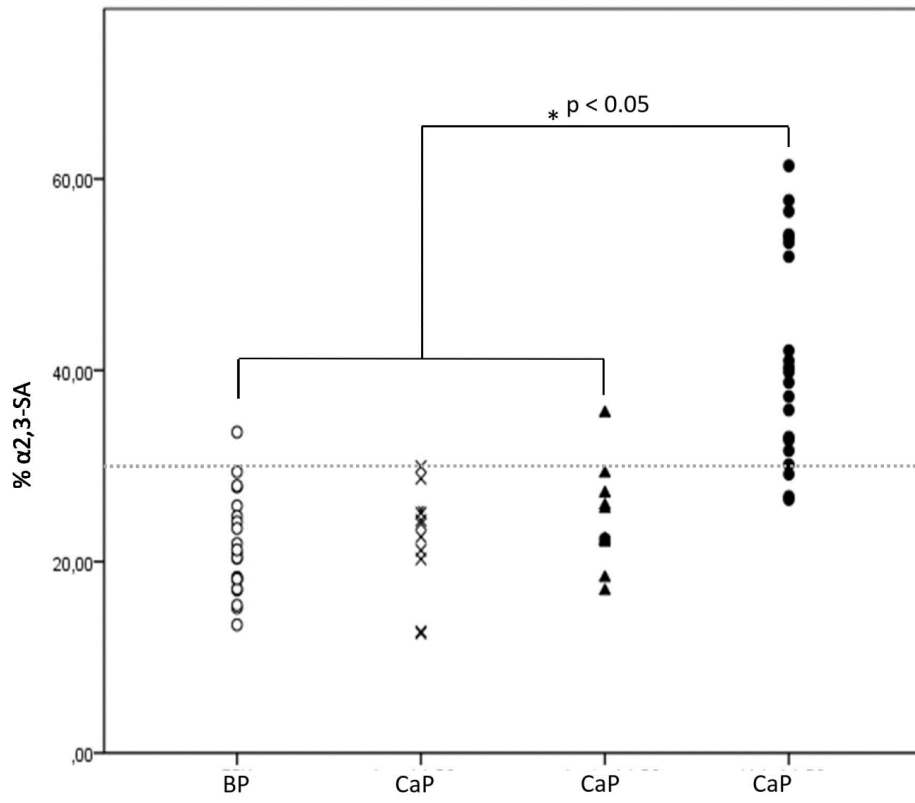


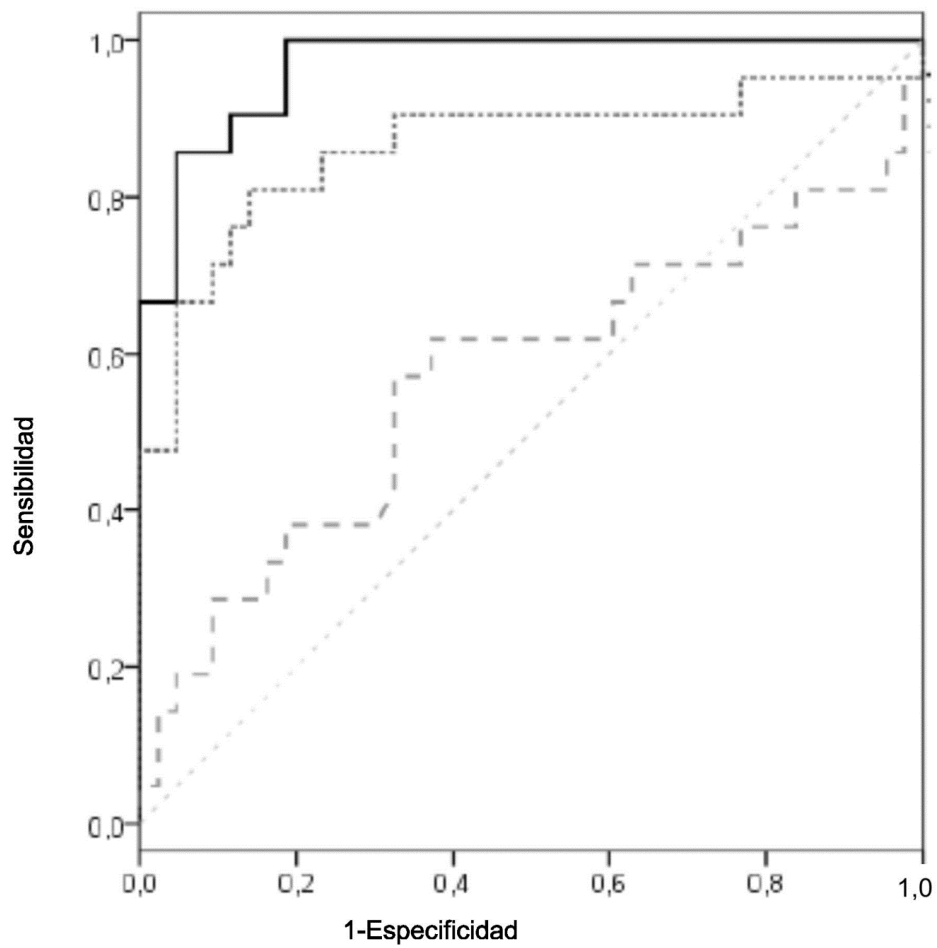
FIG. 2

(B)



Cont FIG. 2

(c)



Cont FIG. 2

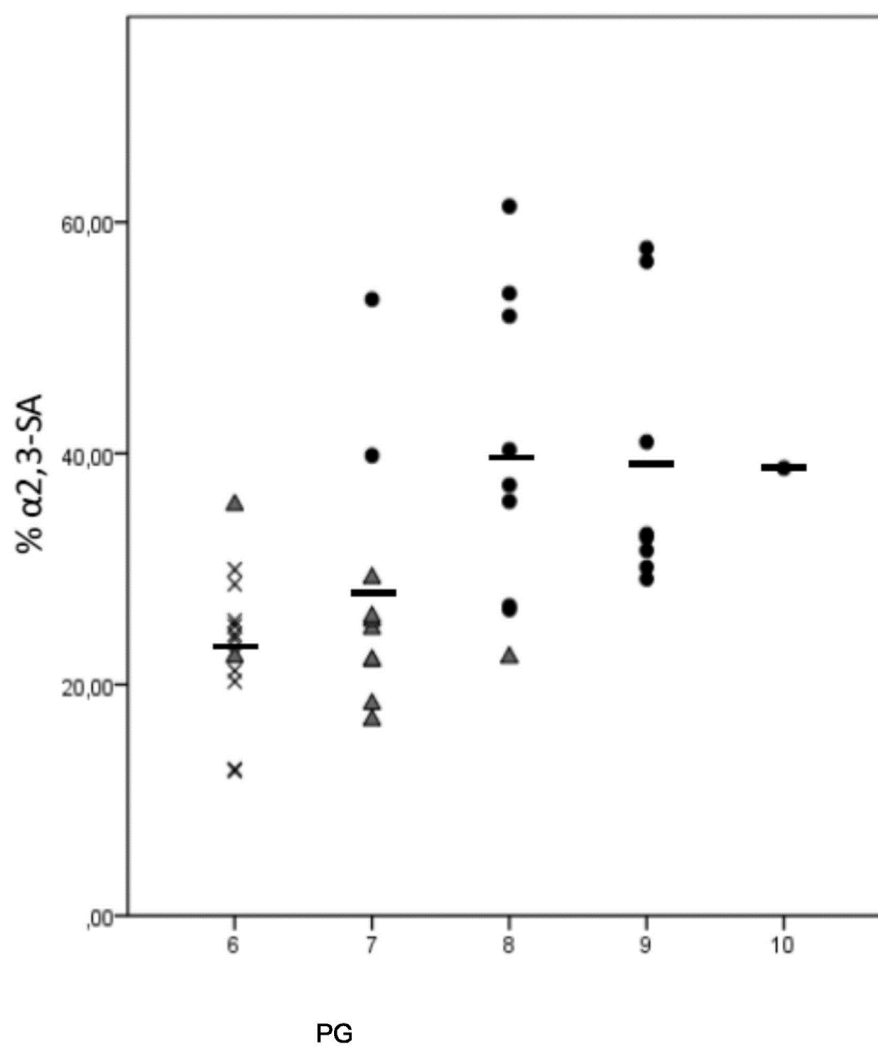
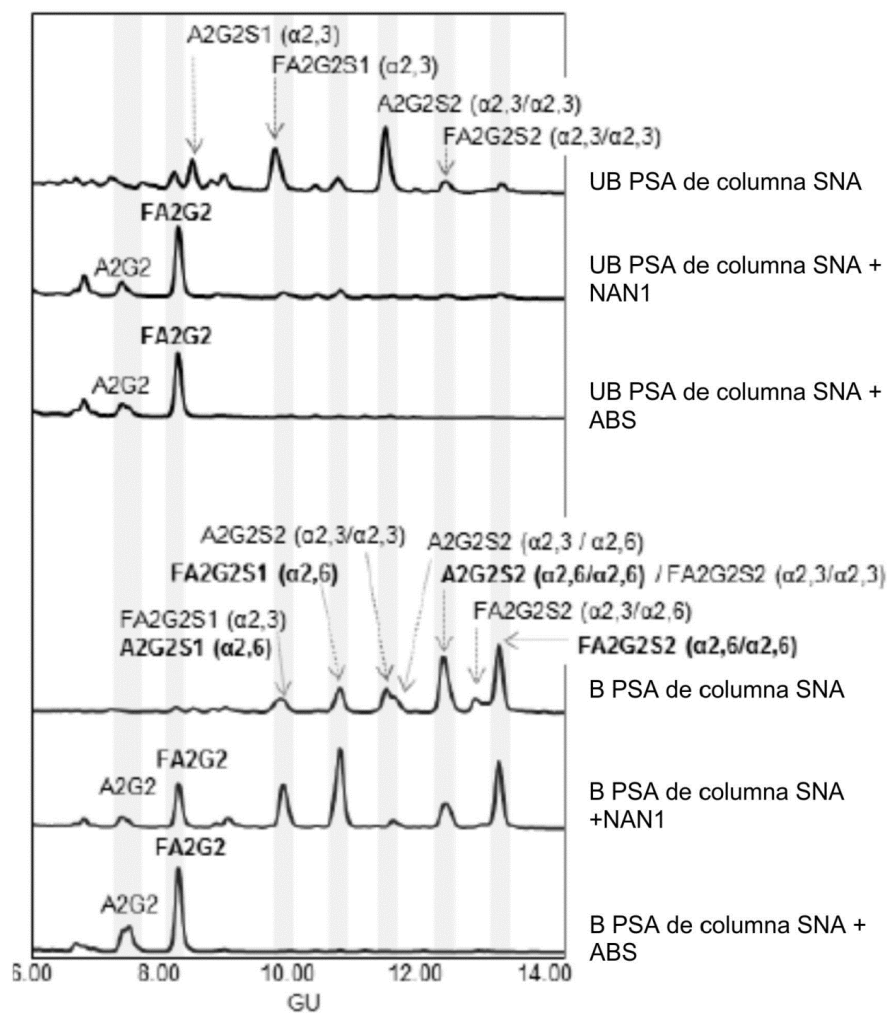


FIG. 3

**FIG. 4**