

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 388**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2010 PCT/US2010/044307**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011 WO11017369**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2010 E 10807057 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2462240**

54 Título: **Un ensayo de lectina para evaluación de glicofomas como un marcador temprano en enfermedades**

30 Prioridad:

05.08.2009 US 231400 P

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

26.10.2017

73 Titular/es:

**INSTITUTE FOR HEPATITIS AND VIRUS
RESEARCH (100.0%)
3805 Old Easton Road
Doylestown, PA 18902, US**

72 Inventor/es:

**ROMANO, PATRICK, ROBERT;
MEHTA, ANAND y
BLOCK, TIMOTHY, M.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 639 388 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un ensayo de lectina para evaluación de glicofomas como un marcador temprano en enfermedades

REFERENCIA CRUZADA

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos No. 61/231400, presentada el 5 de agosto de 2009.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Existen diversas proteínas en dos o más isoformas diferentes que se diferencian solamente en sus patrones de glicosilación. Estas diferencias, o las proporciones relativas de las isoformas glicosiladas de manera diferente, pueden indicar una enfermedad o desorden y, de este modo, existe una necesidad para evaluar sistemas capaces de distinguir entre las isoformas glicosiladas de manera diferente.

La utilización de anticuerpos para distinguir entre isoformas glicosiladas de manera diferente de proteínas endógenas resulta problemática debido a que el índice de éxito en el aumento de anticuerpos que se unen de manera específica o preferencial a isoformas particulares de proteínas endógenas glicosiladas resulta relativamente bajo.

15 Además, se ha demostrado que la determinación de las concentraciones relativas de isoformas glicosiladas de manera diferente de una proteína endógena resulta ser muy importante a nivel clínico. Keir et al analiza las abundancias relativas anormales de las isoformas glicosiladas que se transfieren en pacientes con síndromes de glicoproteína deficiente en carbohidratos o desorden congénito de glicosilación (Keir et al. Ann. Clin. Biochem. 36: 20-36 (1999). Cualquier proteína con glicosilación postraducciona puede ocurrir potencialmente en diferentes
20 isoformas de glicosilación. De este modo, proteínas relevantes a nivel clínico pueden existir en diferentes isoformas glicosiladas, incluyendo marcadores glicosilados para cánceres y otras enfermedades, que incluyen fosfatasa alcalina, alfa fetoproteínas, gonadotropina coriónica humana, y posible proteína priónica (CD230).

25 Otras glicoproteínas que se asocian con desórdenes y se consideran objetivos potenciales para el desarrollo de ensayos en la presente invención incluyen, pero sin limitación, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-1-antitripsina, haptoglobina, tiroglobulina, antígeno específico de próstata, eritrocitos Banda 3 HEMPAS (asociados a anemia diseritropoyética congénita tipo II), glicoproteína de membrana PC-1, CD41 glicoproteína IIb, CD42b dicloxacilina, CD43 sialoglicoproteína de leucocitos, CD63 glicoproteína 3 asociada a membrana lisosómica, CD66a glicoproteína biliar, CD66f glicoproteína b1 específica del embarazo, CD164 proteína 24 del núcleo multiglicosilada,
30 y la familia de Cd235 glicoforina.

35 La lectina de Aleuria aurantia (AAL) es una proteína de 312 aminoácidos que no tiene cadena de carbohidratos y que contiene 5 sitios de unión para L-fucosa u oligosacáridos unidos a L-fucosa. La naturaleza multivalente de AAL le otorga una alta afinidad de unión de manera inusual (micromolar) para ligandos de carbohidratos en comparación con otras lectinas. La producción comercial de AAL se basa en el aislamiento y purificación de lectina mediante su
40 unión con una columna de almidón de fucosa. Se eluye AAL a partir de la columna con 50 mM L-fucosa (Fujihashi et al.). Sin embargo, el análisis estructural y bioquímico ha demostrado que AAL comercial tiene de 3 a 5 de sus 5 sitios de unión a ligandos ocupados con fucosa como un resultado de este proceso de fabricación (Olausson et al., Amano et al., Fujihashi et al., y Wimmerova et al.). Por consiguiente, AAL que se produce a través de estos métodos carece de la especificidad y afinidad que se necesitan para incorporación en un ensayo de diagnóstico significativo a nivel clínico.

45 De acuerdo con esto, existe una necesidad de contar con un ensayo que pueda distinguir de manera selectiva dos o más isoformas de glicoproteínas que tienen diferentes patrones de glicosilación, dicho método comprende poner en contacto una muestra que contiene una glicoproteína que expresa dos o más glicofomas utilizando una forma recombinante de AAL que tiene un reconocimiento de alta afinidad para oligosacáridos fucosilados específicos, y que detecta, de manera directa o indirecta, diferencias en glicofomas como un indicador de estado de enfermedad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

50 La presente invención incorpora la utilización de lectinas de alta afinidad para detectar alteraciones en fracciones objetivo de azúcar en proteínas y proporciona un medio para un ensayo de diagnóstico automático en la detección temprana de enfermedades. La invención proporciona un método para distinguir dos o más isoformas de glicoproteína de acuerdo con la reivindicación 1 y un método para el análisis de una muestra de suero de acuerdo
55 con la reivindicación 6. La invención proporciona además un método para producir un AAL recombinante, de acuerdo con la reivindicación 9, así como además un AAL recombinante de acuerdo con la reivindicación 15. Una realización de la presente invención es una prueba de sangre para personas con desórdenes inflamatorios, desórdenes autoinmunes, cáncer, infecciones, u otros desórdenes en los que se utiliza cambios en los patrones de glicosilación de proteínas específicas como marcadores en suero o como marcadores biológicos que se expresan en

la superficie de las células. El análisis de los niveles de estas proteínas, tanto a través de la identificación de la glicofoma como a través de la cuantificación de los niveles de proteínas que expresan estas glicofomas, proporciona para una prueba de sangre simple poder detectar personas con enfermedades o personas en riesgo de la evolución de enfermedades. Un ensayo que incorpora la utilización de lectina de alta afinidad como un detector en una plataforma de ensayo tal como, pero sin limitación, formatos basados en una placa o partículas, se automatiza fácilmente para ambientes clínicos o centros de atención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Estructura general del monómero AAL con 1 a 6 aspas. Los elipsoides indican los sitios 1 a 5 de unión a fucosa y el sitio 6 correspondiente. Tres modos de barras en los sitios 1, 2, y 4 muestran las moléculas de fucosa.

Figura 2: Comparaciones de afinidad para ligando de IgG0 utilizando placas de Níquel NTA.

Figura 3: ELISA indirecto utilizando proteínas de AAL recombinante que compiten con proteínas de AAL comercial.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el reciente descubrimiento de que (1) niveles de suero en aumento de glicofomas fucosiladas de ciertas proteínas sirven como marcadores biológicos tempranos de enfermedades tales como cáncer y (2) niveles de suero en aumento para glicofoma agalactosilatada de la inmunoglobulina G, denominada alfa-gal de IgG0, se correlacionan con el diagnóstico de enfermedad de hígado (ver Ejemplo 1). De acuerdo con esto, formas recombinantes o mutantes de lectina (AAL), unidas a cualquier molécula reportera conocida en el arte (por ejemplo, marcaje radioactivo, cromóforo o fluorófono), se utilizan como una molécula detectora de alfa-gal de IgG0, específica para proteínas fucosiladas en sangre. La incorporación en sistemas de ensayo basados en ELISA o en perlas proporciona la base para una plataforma automática para determinar un estado de enfermedad en pacientes.

Una realización de la presente invención considera la producción y el aislamiento de una proteína AAL de tipo salvaje en bacteria de *E. coli* y/o levadura. Se proporcionan métodos que incluyen la creación y la producción de proteínas AAL mutantes que se alteran ya sea por mutagénesis de sitio dirigido o por mutagénesis al azar y se seleccionan posteriormente para proteínas AAL mutantes. Estas proteínas AAL tienen una alta afinidad por las uniones L-fucopiranosil de brazo externo, más específicamente proteínas AAL mutadas que tienen alta afinidad por la unión alfa L-fucopiranosil 1-2 de brazo externo, unión alfa L-fucopiranosil 1-3 de brazo externo, o unión alfa L-fucopiranosil 1-4 de brazo externo que se encuentran en los marcadores biológicos de proteína en suero en pacientes con enfermedades tales como, pero sin limitación, cáncer...

Una realización adicional de la presente invención incorpora la utilización de glicofomas de núcleo de fucosa (unión de tipo alfa 1-6) como un objetivo para la lectina, ya sea sola o en combinación con las uniones de brazo externo. La fucosa unida al núcleo es el indicador principal de enfermedades en un número de marcadores biológicos de suero para cáncer y detección específica de uniones de tipo alfa 1-6 al contrario que las uniones de brazo externo, y proporciona un marcador biológico significativo. El mutante N224Q es más selectivo para las uniones de tipo 1-6 con respecto al brazo externo. Esto ofrece una ventaja significativa con respecto al arte previo. Por consiguiente, las proteínas de la presente invención tienen una alta afinidad a la unión alfa L-fucopiranosil 1-6 de núcleo que se encuentra en marcadores biológicos de proteína en suero en pacientes con enfermedades tales como, pero sin limitación, cáncer.

La AAL es una proteína de 312 aminoácidos que contiene cinco sitios de unión para L-fucosa u oligosacáridos unidos a L-fucosa. La naturaleza multivalente de AAL le otorga una alta afinidad de unión de manera inusual (micromolar) para ligandos de carbohidratos en comparación con otras lectinas. La producción comercial de AAL aísla y purifica la lectina mediante su unión con una columna de almidón de fucosa. Se eluye AAL a partir de la columna con 50 mM L-fucosa (Fujihashi et al.). El análisis estructural y bioquímico ha demostrado que AAL comercial tiene de 3 a 5 de sus 5 sitios de unión a ligandos ocupados con fucosa como un resultado de este proceso de fabricación (Olausson et al., Amano et al., Fujihashi et al., y Wimmerova et al.).

De manera sorprendente, se encontró que (r)AAL que se produce en y se aísla a partir de bacteria utilizando cromatografía de afinidad a níquel tuvo afinidades de unión sustancialmente más altas para oligosacáridos fucosilados en comparación con AAL preparada de manera comercial según se determinó mediante estudios de resonancia de plasmón de superficie, estudios de fluorescencia del triptófano y ensayos de lectina unida a enzima.

Una realización de la presente invención se refiere a proporcionar métodos para la creación y producción de rAAL (recombinante) de alta afinidad y/o rAAL mutada que produzcan que todos los sitios de unión a ligandos disponibles para unión a uniones L-fucopiranosil específicas que se encontraron en alfa-gal de IgG0 y en marcadores biológicos de proteína en suero que marcan enfermedades y cáncer.

Otra realización de la presente invención se refiere a incorporar rAAL de alta afinidad como una molécula de detección en ensayos basados en sangre específicos y sensibles para determinar quienes se encuentran en riesgo de padecer enfermedades tales como, pero sin limitación, cáncer.

5 Producción y selección de AAL mutagénico de Alta Afinidad

La mutagénesis al azar de AAL se obtiene a partir de la transformación del plásmido AAL-pUC57 en la cepa de *E. coli* mutada XL1 Red (Strategene) siguiendo el protocolo de fabricantes.

10 La mutagénesis de sitio dirigido se enfoca en cambios en las afinidades de unión a ligandos de varios de los 5 sitios de unión a fucosa en AAL. Un motivo *beta*-propulsor se repite seis veces en AAL. Este motivo se conserva ampliamente en lectinas y constituye el dominio de unión a ligandos. Los cinco (5) sitios para unión a fucosa dentro del motivo (ver Figura 1) se han descrito en cuanto a que cada sitio tiene un afinidad diferente para ligandos fucosilados.

15 Como se muestra en la Figura 1, los sitios 2 y 4 son sitios de unión a ligandos de alta afinidad, mientras que los sitios 1, 3, y 5 tienen una afinidad más débil. Cada lámina *beta* contiene residuos altamente conservados que se involucran específicamente en la unión de fucosa. En especial, los sitios 2 y 4 tienen un residuo de glutamina conservada en las posiciones Q22 y Q75, respectivamente, lo que mantiene el sitio de unión de fucosa en un estado de acceso abierto a la fucosa. Los residuos correspondientes en los sitios 3 y 5 son asparaginas N129 y N224. Debido a que estos residuos (N) de asparagina tiene un carbono menos con respecto a la glutamina (Q), éstos no establecen los contactos de enlaces de hidrógeno necesarios con respecto a los residuos conservados adyacentes para mantener estos sitios en una configuración abierta energéticamente estable. Una molécula de AAL mutante se desarrolló para cambiar los residuos N129 y N224 a glutaminas (N129Q, N224Q) de manera individual, AALN129Q y AALN224Q y en combinación AALN129Q, N224Q para hacer que estos sitios se asemejen estructuralmente a los sitios de unión de alta afinidad.

20 Los experimentos de competición muestra que estas proteínas tienen más afinidad por ligandos de IgG0 en comparación con la proteína de tipo salvaje (ver Figura 2). Estos resultados indican que el enfoque de mutagénesis al azar identificará ligandos de alta afinidad específicos para las uniones L-fucopiranosil que se utilizan para selección mutante. Además, se describe el desarrollo de una librería mutante de lectinas para selección de otras estructuras de azúcar más allá de aquellas que se mencionan específicamente en el presente documento.

25 Un sistema basado en la visualización y selección de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se utiliza para examinar y seleccionar proteínas AAL mutantes reactivas a uniones L-fucopiranosil específicas. Brevemente, se toma una reserva de colonias de 200-400 XL1 red que se transforman con AAL-Puc57 y se someten al protocolo de mutación (Strategene) y se prepara un plásmido de ADN. Mediante la utilización de técnicas de biología molecular estándares, las secuencias de AAL mutada se subclonan en una versión del vector de visualización de levadura pCT302. Este sistema y vector se describen en detalle en Broder and Wittrup and (2000) Methods Enzymology. Vol. 328, 430-444. Los plásmidos de visualización de levadura que contienen la librería de AAL mutante se transforman en una cepa de levadura haploide EBY100 y crecen como se describe. Las proteínas AAL mutantes se expresan y visualizan de manera inducida en la superficie celular de la levadura. La levadura muestra que la librería de AAL mutante se enriquece a partir de uniones a ligandos biotinilados que comprenden uniones L-fucopiranosil específicas bajo condiciones de selección para uniones de alta afinidad (Bergan, L., J.A. Gross, B. Nevin, N. Urban, N. Scholler. Cancer Lett 255, 263-74 (2007). Las células unidas a ligandos se disponen en dos rondas de enriquecimiento de partículas magnéticas de estreptavidina (Miltenyi Macs) seguidas de tres rondas de separación de flujo (Scholler et al., Feldhaus et al, Broder and Wittrup). Se ha demostrado que este sistema evita la inclinación a la expresión y selección basada en crecimiento común en las librerías de visualización de fagos, y produce de manera consistente el rápido enriquecimiento, 10^5 , de clones seleccionados (Feldhaus et al.).

30 La librería de visualización se convierte en una librería de AAL mutante encubierta como se describe según Scholler et al. El ADN de AAL mutante se aísla a partir de la librería de visualización enriquecida y se clona mediante reparación de espacio en el vector pTOR para permitir la secreción de las proteínas de AAL mutante dentro del medio de cultivo. Características del vector pTOR incluyen; un líder alfa-prepro para dirigir la secreción de la proteína recombinante y en adiciones de marco de una etiqueta de His 6X y una secuencia de etiqueta de Avi en el extremo C-terminal de las proteínas mutantes (Scholler et al). La etiqueta de avidina es un sitio aceptor de biotina y es biotinilizado en un residuo de lisina específico cuando células haploides que se transforman con la librería de mutante de AAL pTOR se aparean con células haploides de tipo de apareamiento opuesto que expresan el gen para la ligasa de biotina de *E. coli* (BirA). Se seleccionan células diploides para un medio sólido y crecen en cultivo líquido bajo condiciones inducidas para secreción de las proteínas AAL mutantes biotiniladas, etiquetadas con His. El cultivo de células diploides flotantes se desala, se concentra y se ajusta mediante regulador para la purificación en columna de Níquel-agarosa de AAL-His conforme a los protocolos de los fabricantes (His-Trap, Amersham). AAL mutantes biotiniladas etiquetadas con His pueden luego ser purificadas y utilizadas en estudios de unión a ligandos posteriores.

65

La unión en equilibrio cuantitativo de AAL mutante y de tipo salvaje para el ligando de selección u otros oligosacáridos L-fucopiranosil se determina mediante análisis BIAcore y ensayos de lectina unida a una enzima (Olausson et al).

5 Reconocimiento de alta afinidad de Ligando de IgG0 mediante proteínas de AAL Mutante

Cantidades equivalentes de AAL recombinante (tipo salvaje o mutantes) que contienen etiquetas de Histidina 10x recubrieron para placas de níquel NTA e incubadas con cantidades en incremento de ligando de IgG0 (eje X). AAL no etiquetado que fue adquirida comercialmente (AAL-V) se recubrió también para placa de níquel NTA o placa de ELISA de unión de alta afinidad (AAL-Vc) y se incubaron con cantidades en incremento de ligando de IgG0. Se lavaron las placas y se incubaron con IgG antihumana etiquetada con fluorescencia, se lavaron y se leyeron en un detector de fluorescencia. La fluorescencia relativa en incremento indica afinidad de unión más alta. Los resultados mostraron que el mutante AAL_{M1(N129Q)} exhibió la señal más alta al índice de ruido, mejoró el Límite de Detección de 10-100 pliegues a 10 ng/ml, e incrementó el rango dinámico de 10 ng/ml a 10 ug/ml sin saturación (ver Figura 2). Estos resultados indican que las proteínas AAL mutantes recombinantes incrementarán la sensibilidad y especificidad de un ensayo basado en sangre para detectar cambios sutiles en niveles de IgG0 de suero.

Ejemplo 1: Proteína rAAL selectiva para pacientes cirróticos

20 Se demostró que la lectina recombinante (rAAL) tiene una mayor afinidad por el ligando de IgG0 que la AAL disponible comercialmente. En experimentos basados en ELISA de competición que utilizaron muestras de suero, rAAL tuvo una afinidad significativamente mayor en pacientes cirróticos en comparación con los controles (ver Figura 3).

25 Protocolo experimental:

Placas de 96 pozos se recubren con IgG de ratón tratada con periodato de sodio (NaIO₄). 3 ul de suero de un paciente con cirrosis (Gish 342) o suero de donantes normales (Sigma) se diluyeron en 100 uL y se agregaron a pozos recubiertos con anticuerpos. Las placas se lavaron y luego se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos/bajo agitación con cantidades equivalentes de ya sea AAL (vector) comercial no biotinilada, etiquetada con His 10x recombinante no biotinilada (rAAL 10X), o AAL mutante etiquetada con His 10X recombinante no biotiniladas (rAAL N129Q, N224Q). Cantidades equivalentes de AAL biotinilada se agregaron luego a cada pozo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente/bajo agitación. Las placas se lavaron y se incubaron con estreptavidina-800-IRSeca como se describió anteriormente. Las placas se lavaron y se cuantificó la fluorescencia utilizando una máquina Odyssey LiCor. Las muestras de control midieron AAL biotinilada en unión con IgG0 en la ausencia de AAL no biotinilada.

Resultados experimentales

40 Los experimentos de competición proporcionan un ELISA indirecto para medir la habilidad de proteínas (Vector) comerciales no biotiniladas y proteínas rAAL no biotinilada para interferir con las uniones de AAL biotinilada con el ligando de IgG0. Resulta una indicación cuantitativa de las afinidades relativas de las proteínas AAL no etiquetadas para el ligando de IgG0.

45 Como se muestra en la Figura 3, las proteínas rAAL disminuyen la intensidad de la señal en mayor medida en comparación con AAL (Vector) que se adquiere comercialmente en un formato basado en ELISA de competición. En las muestras de suero obtenidas a partir de pacientes cirróticos (Gish 342) AAL (Vector) comercial no biotinilada competirá con AAL biotinilada y conducirá a un descenso en la intensidad de señal en comparación con el control (las emisiones de señal disminuyen desde ~35 a ~20). rAAL de tipo salvaje no biotinilada 10X y una proteína mutante rAAL (N129Q, N224Q) conducen a una disminución mayor en las emisiones de señal en comparación con el control, lo que indica una mayor afinidad por IgG0 en suero de pacientes cirróticos. Sigma= sueros de control negativo (sueros de sangre de personas sin enfermedades de hígado).

55 Una realización adicional de la presente invención proporciona un kit para un método de ensayo de acuerdo con la invención, dicho kit comprende una forma de AAL recombinante o mutante que tiene un reconocimiento de alta afinidad por oligosacáridos fucosilados específicos.

A pesar de que la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, las personas capacitadas en la técnica reconocerán que se pueden realizar diversas variaciones a partir de la misma, por ejemplo en la selección particular de una molécula de detección unida a AAL que se describe en el presente documento, y se comprenderá y apreciará que las divulgaciones de acuerdo con la invención muestran solo algunas realizaciones preferidas y ventajas de la invención. Se comprenderá y apreciará que estos descubrimientos de acuerdo con la presente invención corresponden solamente a aquellos que se ilustran con respecto a las muchas aplicaciones adicionales que una persona capacitada en la técnica puede visualizar, y por lo tanto, de ninguna manera se pretende que sean limitantes. De acuerdo con esto, otros objetos y ventajas de la invención se volverán aparentes para las personas capacitadas en la técnica a partir de la descripción detallada junto con las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para distinguir dos o más isoformas de glicoproteínas que comprende:
 - a. obtención de una muestra que contiene glicoproteínas;
 - 5 b. unión de dicha glicoproteínas a una lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) recombinante que contiene al menos un sitio de unión para L-fucosa u oligosacáridos unidos a L-fucosa y tiene una mutación en al menos uno de dichos sitios de unión, dicha mutación comprende N129Q y/o N224Q, en el que dicha lectina tiene una alta afinidad por una unión alfa L- fucopiranosil 1-6 de núcleo en una isoforma de glicoproteína y en el que dicha lectina se une a una molécula reportera; y
 - 10 c. detección de la presencia de dicha molécula reportera, la presencia de dicha molécula reportera indica la presencia de la isoforma.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha AAL recombinante se une en marco a seis o diez o más residuos de histidina.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha AAL recombinante tiene diez o más residuos de histidina que se unen en marco a las C-terminales.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha isoforma tiene un residuo de fucosa unido por alfa 1-6.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha AAL incluye mutaciones en al menos uno de los sitios de un grupo que consiste de R24A, E36A, R77A en dominio 2, E898A en dominio 2, R179A en dominio 4, E191A en dominio 4, y combinaciones de los mismos.
- 20 6. Un método para análisis de una muestra en suero que se obtiene de un paciente que contiene una glicoforma fucosilada de una proteína objetivo que comprende:
 - a. unir una lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) recombinante que contiene al menos un sitio de unión para L-fucosa u oligosacáridos unidos a L-fucosa y tiene una mutación en al menos uno de dichos sitios de unión, dicha mutación comprende N129Q y/o N224Q, en el que dicha lectina tiene una alta afinidad por una unión alfa L- fucopiranosil 1-6 de núcleo en una isoforma de glicoproteína, con respecto a la proteína objetivo que tiene la glicoforma fucosilada;
 - 25 b. detectar la presencia de la glicoforma fucosilada en el que un cambio en la cantidad de glicoforma fucosilada presente es indicativo de la presencia de una enfermedad.
 - 30 7. El método de la reivindicación 6 en el que dicha enfermedad es cáncer.
 8. El método de la reivindicación 6, en el que dicha AAL recombinante se une en marco a seis o diez o más residuos de histidina.
 - 35 9. Un método para producir una lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) que tiene una alta afinidad por proteínas fucosiladas, que comprende:
 - a. obtener una lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) que contiene al menos un sitio de unión para L-fucosa u oligosacáridos unidos a L-fucosa;
 - 40 b. mutar la lectina dentro de al menos uno de dichos sitios de unión, comprendiendo dicha mutación N129Q y/o N224Q; y
 - c- enriquecer dicha lectina mutada, en el que dicha lectina tiene una afinidad de unión en incremento por proteínas fucosiladas;
 - 45 en el que dicha afinidad de unión en incremento es por las uniones L-fucosiladas de núcleo en dichas proteínas fucosiladas.
 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha mutación se realiza mediante mutagénesis al azar.
 11. El método de la reivindicación 9, en el que dicha mutación se realiza mediante mutagénesis de sitio dirigido.
 12. El método de la reivindicación 9, en el que dicho enriquecimiento se realiza mediante cromatografía de níquel.
 - 50 13. El método de la reivindicación 9, en el que dicha AAL se une además a seis o diez o más residuos de histidina.
 14. El método de la reivindicación 9, en el que dicha AAL se une además a una molécula reportera.

15. Una lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) recombinante que contiene al menos un sitio de unión para L-fucosa u oligosacáridos unidos a L-fucosa y tiene una mutación en al menos uno de dichos sitios de unión, dicha mutación comprende N129Q y/o N224Q, en el que dicha lectina tiene una alta afinidad por una unión alfa L- fucopiranosil 1-6 de núcleo en una isoforma de glicoproteína.

5

16. El AAL recombinante de acuerdo con la reivindicación 17 en la que dicha AAL recombinante se une en marco a seis o diez o más residuos de histidina.

FIGURA 1

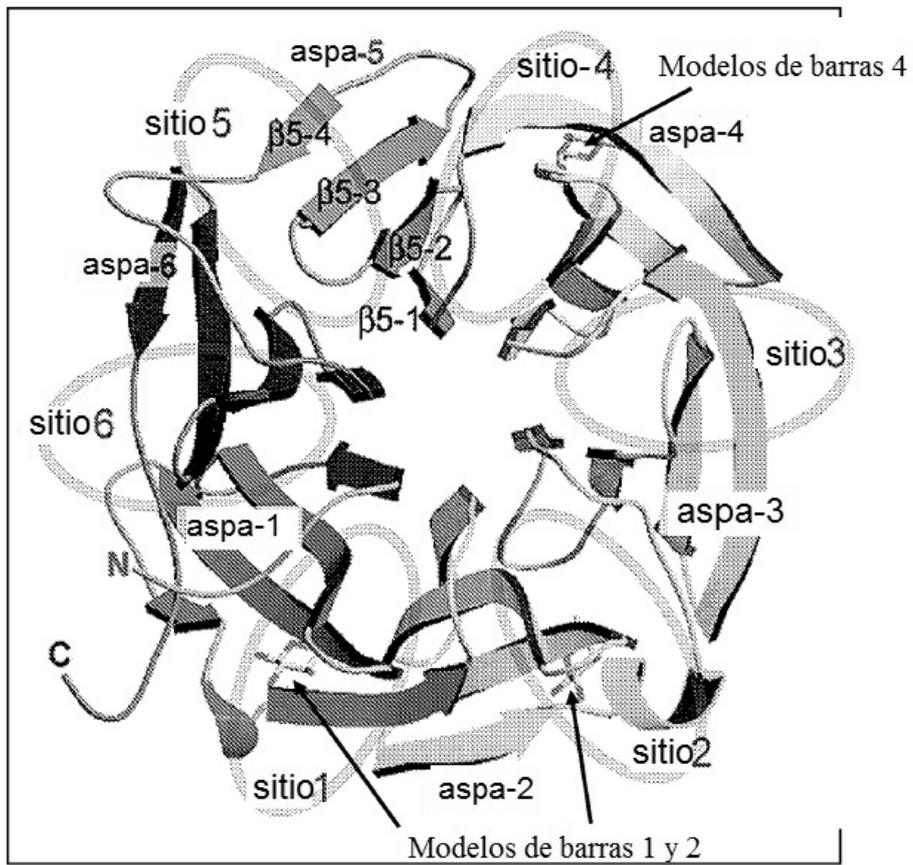


FIGURA 2

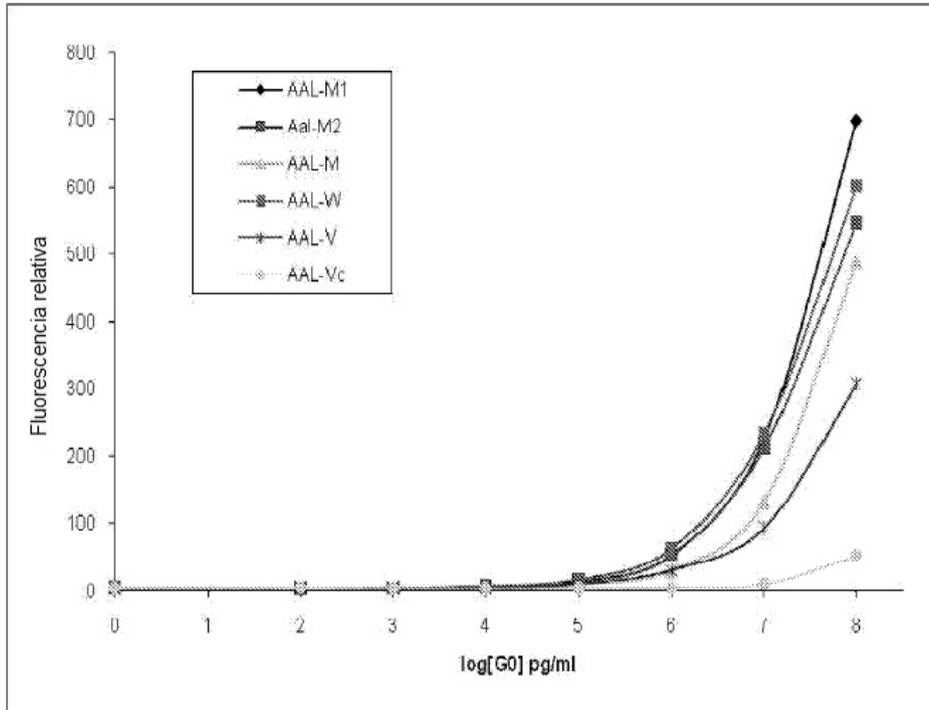


FIGURA 3

