

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 983 352**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/245** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)  
**C07K 16/40** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 21/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2017 PCT/AU2017/051230**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.05.2018 WO18085888**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2017 E 17870370 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3538544**

---

(54) Título: **Mutante de la subunidad B de la citotoxina subtilasa**

(30) Prioridad:

**09.11.2016 AU 2016904572**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.10.2024**

(73) Titular/es:

**GRIFFITH UNIVERSITY (50.0%)  
170 Kessels Road  
Nathan, Queensland 4111, AU y  
THE UNIVERSITY OF ADELAIDE (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**JENNINGS, MICHAEL, PAUL;  
DAY, CHRISTOPHER;  
PATON, ADRIENNE, WEBSTER y  
PATON, JAMES, CLELAND**

(74) Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 983 352 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

- Mutante de la subunidad B de la citotoxina subtilasa
- 5 Campo técnico de la invención
- Esta invención se refiere a proteínas de toxinas bacterianas. Más particularmente, esta invención se refiere a una proteína mutante de la subunidad B de la citotoxina subtilasa que tiene capacidad para unirse al ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 al tiempo que conserva la capacidad de unirse al ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3.
- 10 Antecedentes de la invención
- Las toxinas AB5 ejercen sus efectos en un proceso de dos pasos: (i) unión de la subunidad B pentamérica a receptores glicanos específicos en la superficie de la célula objetivo; (ii) internalización de la toxina AB5, seguida de la inhibición o corrupción de funciones esenciales del hospedero mediada por la subunidad A<sup>1</sup>. Las subunidades B de las toxinas AB5 reconocen los receptores glicanos de la superficie celular, dirigiendo la internalización y el tráfico intracelular de la holotoxina. La especificidad de estas interacciones proteína-glicano es crítica para la patogénesis, ya que determina la susceptibilidad del hospedero y el tropismo tisular. Además, las interacciones pentavalentes entre las subunidades B de la toxina AB5 y sus glicanos afines dan lugar a uniones de muy alta afinidad, lo que las convierte en potentes ligandos para la detección de glicanos, siendo un ejemplo notable el uso de la subunidad B de la toxina del cólera para la detección del gangliósido GM1 en secciones histopatológicas<sup>2</sup> y para el etiquetado de balsas lipídicas en membranas<sup>3</sup>.
- 15 En 2004, Paton *et al.* describieron el descubrimiento y la caracterización biológica inicial de una nueva subfamilia de toxinas bacterianas AB5 cuyo prototipo se denominó citotoxina subtilasa (SubAB)<sup>4</sup>. En el caso de SubAB, se descubrió que la subunidad A (SubA) es una serina proteasa de la familia de las subtilasas con una especificidad excelente para la chaperona esencial del retículo endoplásmico BiP/GRP78<sup>5</sup>. Los estudios estructurales revelaron que, a diferencia de la mayoría de las subtilasas, la SubA poseía una hendidura del sitio activo inusualmente profunda, lo que explicaba su excelente especificidad de sustrato<sup>5</sup>. La SubA ha demostrado ser una poderosa herramienta para examinar el papel de BiP en diversos procesos celulares y también tiene potencial como un agente terapéutico contra el cáncer<sup>6,7</sup>.
- 20 Significativamente, el análisis de matrices de glicanos ha demostrado que la subunidad B de la toxina (SubB) tiene un alto grado de especificidad de unión para los glicanos que terminan con ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 (Neu5Gc), un ácido siálico que los humanos no pueden sintetizar<sup>8</sup>. De todos los glicanos de la matriz, la mejor unión se produjo con Neu5Gcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ-. La unión de la toxina etiquetada a la matriz se redujo 20 veces si se cambiaba el Neu5Gc por Neu5Ac; más de 30 veces si se cambiaba el enlace Neu5Gc de α2-3 a α2-6; y 100 veces si se eliminaba el ácido siálico. El patrón general de unión a las estructuras representadas en la matriz indicó que la SubB tiene una gran afinidad por el Neu5Gc terminal ligado a α2-3 con poca discriminación por el penúltimo resto. La estructura cristalina del complejo SubB-Neu5Gc reveló la base de esta especificidad. El hidroxilo adicional en el grupo metilo del resto N-acetilo que distingue al Neu5Gc del Neu5Ac interactúa con el Tyr78<sup>OH</sup> de la SubB y establece uniones de hidrógeno con la cadena principal del Met10<sup>8</sup>. Estas interacciones clave no podrían producirse con Neu5Ac, explicando así la marcada preferencia por Neu5Gc. Guiados por los datos estructurales, se mutagenizaron residuos clave en el bolsillo de unión previsto, y esto anuló el reconocimiento del glicano, la unión celular y la toxicidad. Los aminoácidos S12 e Y78 de la SubB forman uniones estabilizadoras cruciales con el Neu5Gc<sup>8</sup>. Una mutación S12A abolió completamente la unión al glicano, mientras que una mutación Y78F que impide las interacciones con el grupo<sup>C11 OH</sup> que distingue el Neu5Gc del Neu5Ac redujo la unión al glicano en un 90 % y abolió la preferencia de la proteína SubB mutante por Neu5Gc frente a Neu5Ac<sup>8</sup>.
- 25 45 La forma más prominente de glicosilación aberrante en los cánceres humanos es la expresión de glicanos terminados por Neu5Gc. El Neu5Gc no se expresa en niveles significativos en las células humanas sanas normales<sup>9-12</sup>, ya que los humanos no pueden sintetizar Neu5Gc debido a una mutación inactivadora en el gen CMAH<sup>13</sup>. No obstante, las investigaciones sugieren que la presentación de Neu5Gc en pacientes con cáncer puede explicarse por la absorción de Neu5Gc a través de la ingesta dietética de carne roja y productos lácteos, que son las fuentes más ricas en Neu5Gc<sup>14</sup>. La presencia de Neu5Gc tiene importancia pronóstica, ya que su expresión se correlaciona frecuentemente con la invasividad, la metástasis y el grado tumoral<sup>10</sup>. La visualización preferente de los glicanos Neu5Gc en las células cancerosas puede explicarse, al menos en parte, por el entorno tumoral hipódico, que induce notablemente la expresión del transportador de ácido siálico sialina, lo que da lugar a una mayor visualización de Neu5Gc y otros ácidos siálicos en la superficie celular<sup>15</sup>. Debido a que los sialil-conjugados regulan la adhesión y promueven la movilidad celular, estas alteraciones en la sialilación superficial pueden influir en la colonización y el potencial metastásico de las células tumorales<sup>16</sup>. Se han observado niveles elevados de ácidos siálicos anormales, tal como el Neu5Gc, en el cáncer de mama, ovario, próstata, colon y pulmón<sup>11,12</sup>. Es importante destacar que la incorporación de Neu5Gc en las células cancerosas es más prominente en las glicoproteínas solubles que se encuentran tanto en el espacio extracelular como en el interior de la célula, y el Neu5Gc es el ácido siálico dominante en las glicoproteínas secretadas por las células cancerosas a los tejidos circundantes<sup>9</sup>. También se sabe que la expresión de Neu5Gc en el cáncer impulsa la producción de xeno-autoanticuerpos contra Neu5Gc<sup>17,18</sup>. Estos anticuerpos anti-Neu5Gc se están investigando para determinar su potencial para nuevos diagnósticos, pronósticos y terapias en carcinomas humanos<sup>17</sup>.
- 30 40 45 60 65 Byres *et al.* (2008) Nature 456: 648-53 demostraron que la SubB tiene una fuerte preferencia por los glicanos que terminan en el ácido siálico N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e identificaron residuos específicos implicados en esta especificidad,

cuya mutagénesis anulaba el reconocimiento del glicano.

Breve descripción de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una proteína mutante de la subunidad B de la citotoxina subtilasa (SubB) que puede unirse a glicanos que tienen ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3y a glicanos que tienen ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6. Por lo tanto, la proteína SubB mutante tiene una capacidad no descrita anteriormente para unirse a glicanos que tienen ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6, mientras que no pierde la capacidad de unirse a glicanos que tienen ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3. Esto proporciona una proteína SubB mutante que puede utilizarse para detectar y tener como objetivo un espectro más amplio de glicanos que contienen ácido N-glicolilneuramínico de lo que era posible anteriormente.
- 10

Un aspecto de la invención proporciona una proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos de SubB (SEQ ID NO:2) o un fragmento de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos TTSTE (SEQ ID NO:3), que comprende una delección de uno o más de los residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos TTSTE (SEQ ID NO:3), y en donde la proteína aislada o el fragmento de la misma es capaz de unirse a ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3y ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6.

20 En una realización, la proteína aislada o fragmento de la misma comprende una delección de al menos uno de los residuos subrayados de TTSTE (SEQ ID NO:3) y opcionalmente una delección del residuo subrayado de TTSTE (SEQ ID NO:3).

En otra realización particular, la proteína aislada o fragmento de la misma comprende una delección de los residuos subrayados de TTSTE (SEQ ID NO:3). De forma adecuada, la proteína aislada o el fragmento de esta realización puede unir glicanos Neu5Ac, tales como Neu5Ac- $\alpha$ 2-6-lac y Neu5Ac- $\alpha$ 2-3-lac.

25 En una realización, la proteína aislada o fragmento de la misma comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en un 98 % en toda la longitud completa de SEQ ID NO: 1.

30 Otro aspecto de la invención proporciona un complejo molecular aislado que comprende la proteína aislada o el fragmento del primer aspecto y un glicano que comprende ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6.

35 Otro aspecto más de la invención proporciona una composición que comprende la proteína aislada o el fragmento del primer aspecto.

En una realización la composición es una composición farmacéutica.

40 En otra realización , la composición es una composición diagnóstica.

Todavía otro aspecto de la invención proporciona un método para detectar el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6, en donde dicho método incluye el paso de combinar la proteína aislada o el fragmento del primer aspecto con una muestra para formar así un complejo detectable que comprenda la proteína aislada o el fragmento del primer aspecto y el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6.

45 En algunas realizaciones, el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 pueden ser expresados por una célula tumoral o células sanguíneas felinas.

50 En otra realización, el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 puede ser un contaminante en una muestra o preparación que comprenda fármacos glicosilados recombinantes, anticuerpos y otras biomoléculas terapéuticas para administración humana.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de aislar un glicano o una célula que expresa el glicano, en donde el glicano comprende ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o un ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6, en donde dicho método incluye los pasos de: combinar la proteína aislada o el fragmento divulgado en la presente con una muestra para formar así un complejo que comprenda la proteína aislada o el fragmento y el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6; y aislar la proteína o la célula.

60 En algunas realizaciones, la célula es una célula tumoral o una célula sanguínea felina.

En otra realización, el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 puede ser un contaminante en una preparación o formulación que comprenda fármacos glicosilados recombinantes, anticuerpos y otras biomoléculas terapéuticas para administración humana.

65 Otro aspecto de la invención proporciona una proteína aislada o un fragmento de acuerdo con la presente invención para

su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto para así dirigirse selectivamente a una célula cancerosa que exprese un ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o un ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6.

De forma adecuada, la proteína aislada o el fragmento del primer aspecto se acopla a un agente citotóxico.

5

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la proteína aislada o el fragmento del primer aspecto.

Otro aspecto adicional de la invención proporciona un constructo genético que comprende el ácido nucleico aislado de la invención.

Otro aspecto adicional de la invención proporciona una célula hospedera que comprende el constructo genético del aspecto mencionado.

15 Aspectos relacionados de la invención proporcionan kits que comprenden la proteína aislada o fragmento de la misma, ácido nucleico aislado, composición, y/o constructo genético. Pueden utilizarse, por ejemplo, en la detección del ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o del ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 o en el direccionamiento terapéutico de las células tumorales que expresan el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6.

20

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario, "comprenden", "comprende" y "que comprende" se utilizan de forma inclusiva y no exclusiva, de modo que un número entero o grupo de números enteros establecido puede incluir uno o más números enteros o grupos de números enteros no establecidos.

25

Por "*consistir esencialmente en*" se entiende en este contexto que la proteína aislada o el fragmento tiene uno, dos o no más de tres residuos de aminoácidos además de la secuencia de aminoácidos recitada. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden producirse en los extremos N- y/o C-terminales de la secuencia de aminoácidos recitada, aunque sin limitación al respecto.

30

También se entenderá que los artículos indefinidos "un" y "una" no deben leerse como singulares o como si de otro modo excluyeran más de uno o más de un único sujeto al que se refiera el artículo indefinido. Por ejemplo, "una" proteína incluye una proteína, una o más proteínas o una pluralidad de proteínas.

#### Breve descripción de las figuras

35

Figura 1. Representación de la superficie de la SubB en complejo con (A) Neu5Gca2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc (determinado a partir de una estructura cristalina de rayos X (Byres et al., 2008)) y (B) Neu5Gca2-6Gal $\beta$ 1-3Glc (modelado con la estructura cristalina de rayos X). Los trisacáridos se muestran como una barra verde o cian con residuos rojos y azules que representan el oxígeno y el nitrógeno, respectivamente.

40

Figura 2. Representación de la superficie de los mutantes de tipo silvestre y SubB modelados con Neu5Gca2-6Gal $\beta$ 1-3Glc (mostrado como una barra cian). Los residuos SubB mutados se muestran como barras grises, y los residuos rojos y azules representan el oxígeno y el nitrógeno, respectivamente.

Figura 3. ELISA de SubB modificada frente a suero humano y bovino etiquetado con FITC. SubB (A) y SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  (B) recubiertas sobre placas ELISA fueron capaces de capturar proteínas séricas humanas y bovinas etiquetadas con FITC.

45

Las barras de error muestran +1SD de la media de ensayos duplicados.

Figura 4. Ensayo de superposición de lectinas. Unión de SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  a diluciones seriadas de AGP humana o bovina aplicadas como manchas sobre nitrocelulosa (se indican las cantidades totales de proteína por mancha).

Figura 5. Iones de oxonio NeuAc y NeuGc procedentes de digestiones trípticas de glicoproteínas alfa-1 ácidas humanas y bovinas. Región de baja masa de los espectros MS/MS de (A) el ion glucopéptido a un *m/z* de 1183,163+ correspondiente al péptido TFMLAAASWN[Hex2HexNAc2NeuAc1NeuGc1+Man3GlcNAc2]GTK de la glicoproteína alfa-1 ácida bovina y (B) el ion glucopéptido a un *m/z* de 1122,284+ correspondiente al péptido QDQC1YN[Hex3HexNAc3NeuAc2+Man3GlcNAc2]TTYLNQVR de la glicoproteína alfa-1 ácida humana que muestra abundantes iones oxonio, incluyendo los 274,1 y 292,1 específicos de NeuAc, y los 290,1 y 308,1 específicos de NeuGc.

50

(C) Intensidad de los iones de oxonio específicos de NeuAc y NeuGc como una proporción de la intensidad total de iones de todos los espectros MS/MS procedentes del análisis LC-MS/MS de digestiones trípticas de glicoproteínas alfa-1 ácidas humanas y bovinas. (D) Gel de proteínas de la AGP humana y bovina utilizada en MS, ELISA, Biacore y transferencia en mancha.

Figura 6. Imágenes en bruto de SubB de tipo silvestre (WT) y mutante de delección SubB  $\Delta S106/\Delta T107$  (2M) de las matrices Z-biotech. Glicanos Neu5Gc de la Región A (Parte superior y 3 manchas en la parte inferior derecha de cada submatriz). Glicanos Neu5Ac de la Región B (Parte inferior de cada submatriz). Manchas de control de la Región C (Lado derecho de cada submatriz).

Figura 7. Interacción SubB WT con la matriz de glicanos Neu5Ac/Gc Z-Biotech. Los glicanos Neu5Gc se muestran en azul, los Neu5Ac se muestran en rojo.

60

Figura 8. Interacción del mutante de delección SubB  $\Delta S106/\Delta T107$  (Sub2M) con la matriz de glicanos Neu5Ac/Gc Z-Biotech. Los glicanos Neu5Gc se muestran en azul, los Neu5Ac se muestran en rojo.

Figura 9. Glicanos en la matriz Z-biotech.

Figura 10. SubB WT con AGP bovina mezclada con un 1 % de suero humano normal.

Figura 11. SubB 2M (mutante de delección ΔS106/ΔT107) con AGP bovina mezclada con un 1 % de suero humano normal.

#### Descripción detallada

5

La presente invención se refiere a una proteína mutante modificada de la subunidad B de la citotoxina subtilasa (SubB) o a un fragmento de la misma que tiene uno o más residuos de aminoácidos deletorios de la secuencia de aminoácidos TTSTE que pueden unirse a glicanos que terminan en Neu5Gc ligados a α2-3 o α2-6. La proteína aislada o un fragmento de la misma pueden utilizarse en métodos de detección de glicanos que comprenden ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6, tales como los expresados por ciertas células tumorales y también expresados por las células sanguíneas felinas tipo A. Estos glicanos también pueden ser contaminantes en las preparaciones de fármacos y otras biomoléculas. Por lo tanto, otros aspectos de la invención pueden estar relacionados con la purificación, eliminación o agotamiento de glicanos que comprenden ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6, o células que expresan estos glicanos. Otro aspecto de la invención se refiere a los usos terapéuticos de la proteína aislada para el suministro dirigido de agentes anticancerígenos a determinadas células tumorales.

A los efectos de la presente invención, por “*aislado*” se entiende un material que ha sido extraído de su estado natural o sometido a cualquier otra manipulación humana. El material aislado puede estar parcial, sustancial o esencialmente libre o agotado de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. El material aislado puede estar en forma nativa, sintética química o recombinante. En algunas realizaciones, el material aislado puede estar en forma enriquecida, parcialmente purificada o purificada.

Tal como se utiliza en la presente, una “*muestra*” puede ser cualquier fracción, pieza, porción o parte que sea representativa de una entidad mayor. La muestra puede ser de un producto farmacéutico, un fármaco, un anticuerpo u otra formulación o preparación terapéutica, o una muestra biológica, tal como una obtenida de un ser humano, un animal u otra fuente biológica. En algunas realizaciones, una muestra biológica puede ser una muestra de célula o de tejido, tal como una biopsia, un frotis, una sección de tejido o un sedimento celular, o una muestra de fluido, tal como orina, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo o saliva, aunque sin limitaciones.

30

En general, tal como se utiliza en la presente, una “*composición*” comprende una proteína aislada o un fragmento de la misma, un ácido nucleico, un constructo genético, un anticuerpo u otra molécula junto con uno o más componentes, tales como agua u otros disolventes, sales, agentes amortiguadores y/o estabilizadores, aunque sin limitación de los mismos. En una realización particular, una composición “*diagnóstica*” puede comprender uno o más componentes moleculares que faciliten la detección de proteínas que comprendan ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6. Dichos componentes pueden incluir sustratos enzimáticos, anticuerpos secundarios, reactivos de color, etiquetas y catalizadores (por ejemplo, “*reactivos de detección*”), como se describirá con más detalle a continuación. En otras realizaciones particulares, una composición “*farmacéutica*” puede comprender uno o más componentes moleculares que faciliten la administración terapéutica de la proteína aislada o del fragmento de la misma divulgado en la presente (por ejemplo, un portador, diluyente o excipiente), como se describirá con más detalle en lo sucesivo.

Por “*proteína*” se entiende un polímero de aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales o no naturales, D- o L-aminoácidos como son bien conocidos en la técnica. El término “*proteína*” incluye y abarca “*péptido*”, que se utiliza típicamente para describir una proteína que no tiene más de cincuenta (50) aminoácidos, y “*polipéptido*”, que se utiliza típicamente para describir una proteína que tiene más de cincuenta (50) aminoácidos.

Tal como se utiliza generalmente en la presente, un “*glicano*” es una glicoproteína, un glicolípido u otra macromolécula que contiene carbohidratos, e incluye moléculas que pueden denominarse peptidoglicanos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolipoproteínas y similares. Un glicano particular comprende el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). El glicano puede comprender ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6. Convenientemente, el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y los ácidos N-glicolilneuramínicos ligados a α2-6 son ácidos siálicos terminales. A modo de ejemplo, el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 es un ácido siálico terminal, tal como en Neu5Gca2-3Galβ1-4GlcNAcβ-; y el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 es un ácido siálico terminal en Neu5Gca2-6Galβ1-3Glc-

55

Como se entenderá a partir de lo anterior, un aspecto preferido de la invención proporciona una proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos de la proteína SubB (SEQ ID NO:2) o un fragmento de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos TTSTE (SEQ ID NO:3), que tiene uno o más residuos de aminoácidos deletorios de la secuencia de aminoácidos TTSTE, en donde la proteína aislada o el fragmento es capaz de unir un glicano que comprende ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y un glicano que comprende ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6. Un aspecto relacionado de la invención proporciona un complejo molecular aislado que comprende la proteína aislada o el fragmento del primer aspecto y un glicano que comprende ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6.

65

En este contexto, por “*capaz de unirse a ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6*”

5       $\alpha$ 2-6" se entiende que la proteína aislada o el fragmento une glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 con una afinidad sustancialmente mayor que la de una proteína SubB de tipo silvestre, mientras que también une glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 con una afinidad comparable a la de una proteína SubB de tipo silvestre. En una realización particular, la proteína aislada o el fragmento se une a glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 con una afinidad de aproximadamente 5-15 nM, aproximadamente 7-12 nM o aproximadamente 8-10 nM. En una realización particular, la proteína aislada o el fragmento se une a glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 con una afinidad de aproximadamente 8-20 nM, 10-18 nM o aproximadamente 14-16 nM.

10     La secuencia de aminoácidos TTSTE está normalmente presente en una proteína SubB de tipo silvestre. La proteína SubB de tipo silvestre puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:2:

```

1  MTIKRPFVCA GINGOLSLRP AKLENTGQAR DQMFEGVYET QFNTGQIOMK PYPQTEGKQS
61  ASSEISACSM ENSEEWGASF STLYNQALYP YTTGQFRKIV YKPGWWTYEP PVFAITSNAL
121  VELSTPQRSTP ECPGDRREKNS S

```

15     Los residuos subrayados son una región N-terminal que está ausente en la forma madura de la SubB. Por lo tanto, la numeración utilizada en la presente comienza en el residuo de glutamato 24 (es decir, Glu24 = residuo 1). Utilizando esta numeración, los residuos **en negrita** TTSTE (SEQ ID NO:3) corresponden al "bucle T104-E108". Se propone que el azúcar terciario de la estructura  $\alpha$ 2-6 se pliega de nuevo sobre la superficie de la proteína SubB, haciendo estrecho contacto con un bucle que comprende los residuos T104-E108 de SubB. Este bucle está estabilizado por un enlace disulfuro entre C103 y C109. El impedimento estérico resultante distorsiona el acoplamiento del Neu5Gc terminal en el bolsillo de unión, 20    lo que explica la unión significativamente más deficiente de las estructuras Neu5Gc enlazadas con  $\alpha$ 2-6 observada en el análisis original de la matriz de glicanos de la SubB<sup>8</sup>. La modificación de uno o más residuos en el bucle potencia la unión de una proteína SubB mutante a la estructura  $\alpha$ 2-6 al tiempo que permite la unión a las estructuras  $\alpha$ 2-3. En general, las 25    delecciones de aminoácidos que reducen o disminuyen la "altura" del bucle pueden ser ventajosas para mejorar la unión de las estructuras de Neu5Gc ligado  $\alpha$ 2-6. En este contexto, la "altura" puede ser una función de la distancia que un grupo R del aminoácido proyecta o se extiende desde la cadena principal del péptido en el espacio tridimensional (por ejemplo, la valina tiene mayor altura que la leucina). Por lo tanto, en una realización se prefiere la delección de uno o más de los 30    residuos TTSTE (SEQ ID NO:3) del bucle (denominado en la presente "mutante de delección"). Preferiblemente, están subrayados en TTSTE (SEQ ID NO:3). Con base en la numeración de la secuencia de aminoácidos SubB madura en SEQ ID NO:2, se delecionalan los residuos S106 y/o T107. En una realización particularmente preferida, se delecionalan los residuos S106 y T107.

Por lo tanto, una realización particular de una proteína SubB mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1:

```

1  EWTGQARDEN FEGVVIRQFR TGGIDMKPFT QIEGQKQAGE SIEACAGKHS SWNGASFSTL
61  YNQALYPYTT QQPVRIYTKP GVWTYEPFWK ALTSUNRLVGL STOTTECNGP GRKNN

```

35     En otra realización, la proteína aislada o el fragmento comprenden una delección de los residuos de aminoácidos subrayados en la secuencia de aminoácidos TTSTE (SEQ ID NO:3).

40     Con base en la numeración de la secuencia de aminoácidos SubB madura en SEQ ID NO:2, se delecionalan los residuos T107 y E108. Como resultará evidente a partir de los datos mostrados en la Tabla 1, la proteína aislada "mutante de delección" que carece de T107 y E108 se une a glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 con una afinidad sustancialmente mayor que la de una proteína SubB de tipo silvestre, al tiempo que también se une a glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3. Sin embargo, a diferencia de un mutante de delección S106 y T107 (tal como el de la 45    SEQ ID NO:1), el mutante de delección T107 y E108 puede unirse ampliamente a glicanos, incluidos glicanos Neu5Ac, tales como Neu5Ac- $\alpha$ 2-6-lac y Neu5Ac- $\alpha$ 2-3-lac (por ejemplo, véase la Tabla 1). También se observa que la SubB WT no se une de forma detectable a Neu5Ac- $\alpha$ 2-6-lac. Por lo tanto, la proteína mutante de delección T107 y E108 puede ser una proteína útil para unir o detectar glicanos Neu5Gc, tales como los glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 y 50    los glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3, y también los glicanos Neu5Ac, tales como Neu5Ac- $\alpha$ 2-6-lac y Neu5Ac- $\alpha$ 2-3-lac.

55     También se divulan en la presente variantes, fragmentos y derivados de la proteína aislada. Convenientemente, las variantes, fragmentos y derivados de la proteína aislada conservan la capacidad de unirse a glicanos que terminan en Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-3 y ligado a  $\alpha$ 2-6. En realizaciones particulares, se trata de al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la capacidad de la proteína aislada de una proteína aislada divulgada en la presente para unirse a glicanos que terminan en Neu5Gc ligados a  $\alpha$ 2-3 y ligados a  $\alpha$ 2-6.

Como se utiliza en la presente, una "variante" peptídica tiene al menos un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de una proteína aislada divulgada en la presente. La "variante" peptídica divulgada en la presente puede tener uno o más aminoácidos delecionados o sustituidos por aminoácidos diferentes. Es bien sabido en la técnica que algunos aminoácidos pueden sustituirse o delecionarse sin cambiar la actividad biológica del péptido (sustituciones conservativas).

Los términos utilizados en general en la presente para describir las relaciones de secuencia entre las proteínas y los ácidos nucleicos respectivos incluyen "*ventana de comparación*", "*identidad de secuencia*", "*porcentaje de identidad de secuencia*" e "*identidad sustancial*". Debido a que los ácidos nucleicos/proteínas respectivos pueden comprender cada uno (1) sólo una o más porciones de una secuencia completa de ácido nucleico/proteína que comparten los ácidos nucleicos/proteínas, y (2) una o más porciones que son divergentes entre los ácidos nucleicos/proteínas, las comparaciones de secuencias se realizan típicamente comparando secuencias sobre una "*ventana de comparación*" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "*ventana de comparación*" se refiere a un segmento conceptual de típicamente 6, 9 o 12 residuos contiguos que se compara con una secuencia de referencia. La ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) de aproximadamente un 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo de las secuencias respectivas. El alineamiento óptimo de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones informáticas de algoritmos (programa Geneworks de Intelligenetics; GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Software Package Liberación 7,0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.), o por inspección y el mejor alineamiento (es decir, el que tenga como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generado por cualquiera de los diversos métodos seleccionados.

La similitud y la identidad de secuencias se definen comúnmente con referencia al algoritmo GAP (Wisconsin Package, Accelrys, San Diego EE. UU.). GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas de forma que se maximice el número de coincidencias y se minimice el número de huecos. En general, se utilizan los parámetros por defecto, con una penalización por creación de hueco = 12 y una penalización por ampliación de hueco = 4.

También se hace referencia a la familia de algoritmos BLAST, que utiliza el método de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), el algoritmo psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402), FASTA (que utiliza el método de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), el algoritmo Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), o el programa TBLASTN, de Altschul et al. (1990) *supra*, empleando generalmente parámetros por defecto.

Se encontrará una discusión detallada sobre el análisis de secuencias en la Unidad 19,3 de CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-2015).

La comparación de secuencias puede realizarse sobre la longitud completa de la secuencia pertinente descrita en la presente.

El término "*identidad de secuencia*" se utiliza en la presente en su sentido más amplio para incluir el número de coincidencias exactas de nucleótidos o aminoácidos teniendo en cuenta un alineamiento adecuado mediante un algoritmo estándar, teniendo en cuenta hasta qué punto las secuencias son idénticas a lo largo de una ventana de comparación. Por lo tanto, un "*porcentaje de identidad de secuencia*" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas durante la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) en ambas secuencias. Para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Por ejemplo, por "*identidad de secuencia*" puede entenderse el "*porcentaje de coincidencia*" calculado por el programa informático DNAsis (Versión 2,5 para Windows; disponible sw Hitachi Software Engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, EE. UU.).

La invención también proporciona fragmentos del péptido aislado divulgado en la presente. En algunas realizaciones, los fragmentos pueden comprender, consistir esencialmente o estar formados por 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 aminoácidos contiguos de una proteína aislada divulgada en la presente.

También se divultan en la presente los derivados del péptido aislado.

Tal como se utilizan en la presente, las proteínas o péptidos "derivados" han sido alterados, por ejemplo, por conjugación o formación de complejos con otras moléculas químicas, por modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación, ubiquitinación, glucosilación), modificación química (por ejemplo, reticulación, acetilación, biotinilación, oxidación o reducción y similares), conjugación con etiquetas (por ejemplo, fluoróforos, enzimas, isótopos radiactivos) y/o inclusión de secuencias de aminoácidos adicionales, según se entienda en la técnica.

Con respecto a esto, se remite al experto al Capítulo 15 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2015) para una metodología más amplia relativa a la modificación química de

las proteínas.

Las secuencias de aminoácidos adicionales pueden incluir secuencias de aminoácidos de compañeros de fusión que crean una proteína de fusión. A modo de ejemplo, las secuencias de aminoácidos del compañero de fusión pueden ayudar en la detección y/o purificación de la proteína de fusión aislada. Entre los ejemplos no limitativos se incluyen las proteínas de fusión de unión a metales (por ejemplo, polihistidina), la proteína de unión a la maltosa (MBP), la proteína A, la glutatión S-transferasa (GST), secuencias de proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), etiquetas epítópicas, tales como las etiquetas myc, FLAG y hemaglutinina.

10 Los péptidos aislados de la presente invención pueden producirse por cualquier medio conocido en la técnica, incluidos, entre otros, la síntesis química y la tecnología del ADN recombinante.

La síntesis química incluye la síntesis en fase sólida y en fase de disolución solución. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, aunque se hace referencia a ejemplos de técnicas de síntesis química tal como se proporcionan en el Capítulo 9 de SYNTHETIC VACCINES, Ed. Nicholson (Blackwell Scientific Publications) y Capítulo 15 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY EE.UU. 1995-2014). A este respecto, también se hace referencia a la Publicación Internacional WO 99/02550 y la Publicación Internacional WO 97/45444.

20 Las proteínas recombinantes pueden ser convenientemente preparadas por un experto en la materia utilizando protocolos estándar como los descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), en particular las Secciones 16 y 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY, EE. UU. 1995-2014), en particular los capítulos 10 y 16; y CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY EE.UU. 1995-2014), en particular los Capítulos 1, 5 y 6.

30 Un aspecto de la invención proporciona un método para detectar el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6, en donde dicho método incluye el paso de combinar la proteína aislada o el fragmento divulgado en la presente con una muestra para formar así un complejo detectable que comprenda la proteína aislada o el fragmento del primer aspecto y el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6.

35 El ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 pueden ser componentes de glicanos expresados por células tumorales, y ciertas células sanguíneas, tales como las células sanguíneas felinas. En realizaciones particulares, los glicanos que comprenden ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 pueden ser expresados por carcinomas humanos, detectándose una expresión elevada en el cáncer de mama, ovario, próstata, colon y pulmón. En otras realizaciones particulares, el ácido N-glicolilneuramínico define el grupo sanguíneo "A" de los felinos, mientras que el ácido N-acetilneuramínico define el grupo sanguíneo "B" de los felinos.

40 En consecuencia, la proteína aislada o el fragmento pueden utilizarse para detectar la presencia de células tumorales que expresen ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 en una muestra de un paciente, tal como una biopsia, una muestra de fluido, un frotis o similares. En otra realización, la proteína aislada o el fragmento pueden utilizarse para la tipificación sanguínea felina mediante la detección de células sanguíneas que expresen glicanos de ácido N-glicolilneuramínico, tales como los que comprenden ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6, en una muestra de sangre felina.

50 En otras realizaciones particulares, los glicanos que comprenden ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 pueden estar presentes en una preparación o formulación que comprenda fármacos, anticuerpos u otras biomoléculas terapéuticas para administración humana.

55 Los fármacos glicosilados recombinantes, los anticuerpos y otras biomoléculas terapéuticas para administración humana se producen a menudo en líneas celulares de mamíferos no humanos que pueden sintetizar y/o incorporar metabólicamente el ácido siálico no humano ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Algunos humanos tienen altos niveles de anticuerpos anti-Neu5Gc circulantes. A modo de ejemplo, el mAb antiEGFR Cetuximab, clínicamente eficaz, puede tener Neu5Gc unido covalentemente. Los anticuerpos anti-Neu5Gc de humanos normales interactúan con el Cetuximab de forma Neu5Gc-específica y generan complejos inmunes *in vitro*. Estos anticuerpos pueden potenciar la depuración del cetuximab (u otro anticuerpo terapéutico) *in vivo*. Por lo tanto, la contaminación por Neu5Gc de fármacos, anticuerpos y otras biomoléculas terapéuticas puede afectar negativamente a la vida media, la eficacia y las reacciones inmunológicas de los pacientes a los que se administran dichos fármacos. Aunque sea posible evitar la contaminación por Neu5Gc utilizando células y medios deficientes en Neu5Gc, puede que ésta no sea una disolución óptima en todos los casos. Por lo tanto, ciertas realizaciones de la invención proporcionan la detección del ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o del ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 en fármacos, anticuerpos u otras biomoléculas terapéuticas para la administración humana. Otras realizaciones de la invención proporcionan el aislamiento, agotamiento o eliminación de contaminantes que contienen ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 de fármacos, anticuerpos u otras biomoléculas terapéuticas para la administración humana.

- En consecuencia, puede ser ventajoso acoplar, unir, fijar o ligar de otro modo la proteína aislada (por ejemplo, de una proteína aislada divulgada en la presente como la que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1), o un fragmento de la misma, a un agente que facilite la detección del ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o del ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-6. En una forma preferida, la proteína aislada o el fragmento se acopla covalentemente a una etiqueta.
- En otras realizaciones, puede utilizarse un agente de unión secundario etiquetado, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, para detectar la proteína aislada cuando se une a glicanos que comprenden ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-6.
- De acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, una etiqueta puede seleccionarse de entre un grupo que incluya un cromógeno, un catalizador, biotina, avidina, digoxigenina, una enzima, un fluoróforo, una molécula quimioluminiscente o un radioisótopo, aunque sin limitación al respecto.
- El fluoróforo puede ser, por ejemplo, isoftiocianato de fluoresceína (FITC), tintes Alexa, isoftiocianato de tetrametilrhodamina (TRITL), aloficiocianina (APC), rojo Texas, FAM, ROX, Cy5, Cy3, o R-ficoeritrina (RPE) aunque sin limitación de los mismos.
- La enzima puede ser peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β-galactosidasa o glucosa oxidasa, aunque sin limitación de las mismas. Entre los sustratos apropiados se incluyen la diaminobanzidina (DAB), el rojo permanente, el ácido 3-etilbenzotiazolina sulfónico (ABTS), el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), el azul de nitro tetrazolio (NBT), la 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TNB) y el 4-cloro-1-naftol (4-CN), aunque sin limitación de los mismos. Un ejemplo no limitativo de sustrato quimioluminiscente es el Luminol™, que se oxida en presencia de HRP y peróxido de hidrógeno para formar un producto de estado excitado (3-aminoftalato).
- Las etiquetas radioisotópicas pueden incluir <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>51</sup>Cr y <sup>99</sup>Tc, aunque sin limitación de las mismas.
- En el caso de una etiqueta visual directa, puede utilizarse una partícula coloidal metálica o no metálica, una partícula de tinte, un polímero orgánico, una partícula de látex, un liposoma, una minicélula u otra vesícula que contenga una sustancia productora de señales y similares.
- La proteína aislada etiquetada o el fragmento pueden utilizarse en sistemas de detección, tales como la histoquímica, la citometría de flujo, la microscopía de fluorescencia y los ensayos ELISA, la imagenología corporal (por ejemplo, las tomografías por emisión de positrones) y la medicina nuclear, aunque sin limitación de los mismos.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de aislar un glicano o una célula que expresa el glicano, en donde el glicano comprende ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o un ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-6, en donde dicho método incluye los pasos de: combinar la proteína aislada o el fragmento divulgado en la presente con una muestra para formar así un complejo que comprenda la proteína aislada o el fragmento y el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-6; y aislar el glicano o la célula.
- En este contexto, el término "aislar" se refiere preferentemente a purificar, enriquecer o agotar o eliminar el glicano que comprende el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o un ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-6, o las células que lo expresan.
- En algunas realizaciones, la proteína aislada (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1), o un fragmento del mismo, se acopla a una etiqueta como la descrita anteriormente, que facilita la detección del glicano que comprende el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o un ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-6, o las células que lo expresan. Un ejemplo no limitativo incluye una etiqueta fluorescente (como la descrita anteriormente) que facilita la clasificación por citometría de flujo de células tumorales o células sanguíneas felinas.
- En otra realización, la proteína aislada divulgada en la presente, o un fragmento de la misma, puede acoplarse, unirse, fijarse o enlazarse de otro modo a un sustrato que facilite el aislamiento, enriquecimiento, purificación, agotamiento o eliminación de un glicano que comprenda ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-6, o células que lo expresan.
- La proteína aislada divulgada en la presente, o un fragmento de la misma, puede acoplarse, unirse, fijarse o ligarse de otro modo a un sustrato que puede ser una perla, una matriz, un polímero reticulado, un gel, una partícula, una superficie u otro sustrato sólido o semisólido. En realizaciones particulares, el sustrato puede ser o comprender sefarosa, agarosa, proteína A, proteína G, una perla magnética, una partícula paramagnética o la superficie de un chip sensor (por ejemplo, para BIACore o resonancia de plasmón superficial). De manera adecuada, una muestra comprende una mezcla de moléculas que pueden comprender, o que se sospecha que comprenden, ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a α2-6, o células que lo expresan.
- En ciertas realizaciones, la proteína aislada divulgada en la presente o un fragmento de la misma, acoplada, unida, fijada

5

o ligada de otro modo a un sustrato puede ser adecuada para la cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad), agotamiento por perlas magnéticas u otras técnicas que faciliten el aislamiento, enriquecimiento, purificación, agotamiento o eliminación de un glicano que comprenda ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6, o células que lo expresen.

10

En una realización particular, el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o un ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 pueden estar presentes como contaminantes en una muestra, por lo que el complejo formado entre la proteína aislada y el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o el ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 elimina los contaminantes de la muestra. Un ejemplo particular es una preparación o formulación que comprende fármacos glicosilados recombinantes, anticuerpos y otras biomoléculas terapéuticas para administración humana, como se ha descrito anteriormente.

15

La proteína aislada divulgada en la presente, tal como la que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, o un fragmento puede ser adecuada para el suministro dirigido de compuestos anticancerígenos a células tumorales que expresan glicanos que comprenden ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6. La capacidad de unirse tanto al ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 como al ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 significa que la presente invención proporciona un sistema de suministro dirigido mucho más eficaz que el que podría proporcionarse utilizando una proteína SubB de tipo silvestre.

20

Por consiguiente, otro aspecto de la invención proporciona una proteína aislada o un fragmento de la misma de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto para así dirigirse selectivamente a una célula cancerosa que exprese un ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o un ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6.

25

Como se ha descrito anteriormente, algunas células tumorales expresan glicanos que comprenden ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6, mientras que las células normales no suelen expresar estos azúcares. En realizaciones particulares, los glicanos que comprenden ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 pueden ser expresados por carcinomas humanos, detectándose una expresión elevada en el cáncer de mama, ovario, próstata, colon y pulmón, aunque sin limitación al respecto.

30

En una realización, la proteína aislada o el fragmento pueden acoplarse, unirse, fijarse o enlazarse de otro modo a un agente citotóxico que facilite la unión a células tumorales que expresen ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3 y/o ácido *N*-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6, así como su destrucción o desactivación.

35

El agente citotóxico puede ser un radionúclido, un fármaco quimioterapéutico, un mutágeno, una toxina, un inhibidor de la mitosis u otro agente antiproliferativo, un agente proapoptótico, un agente intercalante del ADN, o cualquier otro agente que ayude o provoque la muerte o desactivación de las células tumorales.

40

Ejemplos no limitativos de radionucleidos incluyen  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Yt}$ ,  $^{193}\text{Pt}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{134}\text{Eu}$  y  $^{67}\text{Ga}$ , aunque sin limitación de los mismos.

Los fármacos quimioterapéuticos, mutágenos, toxinas, inhibidores de la mitosis, agentes proapoptóticos y agentes intercalantes del ADN pueden incluir la doxorubicina, la *N*-acetil- $\gamma$ -calicheamicina, los maytansinoides, los taxoides, las auristatinas y las duocarmicinas, aunque sin limitación de los mismos. Los fármacos quimioterapéuticos, mutágenos, toxinas, inhibidores de la mitosis, agentes proapoptóticos y agentes intercalantes del ADN pueden acoplarse a la proteína aislada o al fragmento mediante un enlazador escindible o no escindible para formar un conjugado escindible. Típicamente, el conjugado escindible es internalizado por la célula tumoral, en donde el enlazador escindible se escinde para liberar el fármaco en la célula. En el caso de los enlazadores no solubles, éstos pueden ser preferibles cuando sea esencial que el fármaco esté totalmente localizado en la célula tumoral objetivo y no haya "fugas" del fármaco de la célula tumoral objetivo a células, tejidos o fluidos adyacentes. En algunas realizaciones, los fármacos quimioterapéuticos, mutágenos, toxinas, inhibidores de la mitosis, proapoptóticos y agentes intercalantes del ADN pueden estar en forma de profármaco que se activa al internalizarse en el interior de una célula tumoral objetivo.

45

En las realizaciones relativas a los usos terapéuticos, la proteína aislada (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1), o un fragmento de la misma, puede administrarse como una composición farmacéutica.

50

De manera adecuada, la composición farmacéutica comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55

Por "portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende un material de relleno sólido o líquido, diluyente o sustancia encapsulante que pueda utilizarse con seguridad en la administración sistémica. Dependiendo de la vía de administración particular, se pueden usar una variedad de portadores bien conocidos en la técnica. Estos portadores pueden seleccionarse entre un grupo que incluya azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato cálcico, liposomas y otros portadores a base de lípidos, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido algínico, disoluciones amortiguadoras de fosfatos, emulsionantes, disolución salina isotónica y sales como sales de ácidos minerales, incluidos clorhidratos, bromuros y sulfatos, ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos y malonatos y agua libre de pirógenos.

Una referencia útil que describe portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. EE.UU., 1991).

5 Puede emplearse cualquier vía de administración segura para proporcionar a un paciente la composición de la invención. Por ejemplo, pueden emplearse por vía oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa, intraarticular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, inhalatoria, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica y similares. La inyección intramuscular y subcutánea es apropiada, por ejemplo, para la administración de composiciones inmunoterapéuticas, vacunas proteínicas y vacunas de ácidos nucleicos.

10 Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, disoluciones, jarabes, troqueles, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas de dosificación también pueden incluir la inyección o el implante de dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este fin u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente de esta manera. La liberación controlada del agente terapéutico puede efectuarse mediante el recubrimiento del mismo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos, incluyendo 15 resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y poliglicólico, y ciertos derivados de la celulosa, tal como la hidroxipropilmelcelulosa. Además, la liberación controlada puede efectuarse utilizando otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

20 Las composiciones de la presente invención adecuadas para la administración oral o parenteral pueden presentarse como unidades separadas, tales como cápsulas, sobres o comprimidos que contengan cada uno una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos de la invención, como un polvo o gránulos o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Dichas composiciones pueden prepararse por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen el 25 paso de poner en asociación uno o varios de los agentes descritos anteriormente con el portador que constituye uno o varios ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando uniforme e íntimamente los agentes de la invención con portadores líquidos o sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto en la presentación deseada.

30 Las composiciones anteriores pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de la dosis y en la cantidad que sea farmacéuticamente eficaz. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en un paciente durante un periodo de tiempo apropiado. La cantidad de agente(s) a administrar puede depender del sujeto a tratar, incluyendo la edad, el sexo, el peso y el estado general de salud del mismo, factores que dependerán del criterio del profesional.

35 También se describe en la presente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la proteína aislada o a un fragmento de la misma. De manera adecuada, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no se une a una proteína SubB de tipo silvestre (como la que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2), o se une con una afinidad al menos 5 o 10 veces menor en comparación con la afinidad con la que se une a la proteína aislada o fragmento divulgado en la presente (como la que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1). De forma adecuada, el 40 anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un epítopo de SEQ ID NO:1 que comprende uno o más residuos de aminoácidos modificados de la secuencia de aminoácidos TTSTE.

45 Tal como se utiliza en la presente, un "anticuerpo" es o comprende una inmunoglobulina. El término "*inmunoglobulina*" incluye cualquier producto proteico de unión a antígeno de un complejo génico de inmunoglobulina de mamífero, incluidos los isotipos de inmunoglobulina IgA, IgD, IgM, IgG e IgE y sus fragmentos de unión a antígeno. Se incluyen en el término "*inmunoglobulina*" las inmunoglobulinas que son químicas o humanizadas o que comprenden de otro modo residuos de aminoácidos, secuencias y/o glicosilación alterados o variantes, ya sean naturales o producidos por intervención humana (por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante).

50 Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab y Fab'2, diacuerpos y fragmentos de anticuerpos de cadena única (por ejemplo, scVs), aunque sin limitación a los mismos. Típicamente, un anticuerpo comprende regiones variables respectivas de cadena ligera y cadena pesada que comprenden cada una secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender al menos una parte de una secuencia de aminoácidos CDR1, 2 y/o 3. Un fragmento de anticuerpo preferido comprende al menos una región variable CDR de la cadena ligera completa y/o al menos una región variable CDR de la cadena pesada completa.

55 Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos pueden ser policionales o, preferiblemente, monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse utilizando el método estándar como, por ejemplo, el descrito en un artículo de Köhler & Milstein, 1975, Nature 256, 495, o mediante modificaciones más recientes del mismo como por ejemplo las descritas en Capítulo 2 de Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, inmortalizando células del bazo u otras células productoras de anticuerpos derivadas de una especie de producción a la que se haya inoculado la proteína aislada (por ejemplo, que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) o un fragmento de la misma. También se entenderá que los anticuerpos pueden producirse como anticuerpos sintéticos recombinantes o fragmentos de anticuerpos expresando un ácido nucleico que codifique el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo en una célula hospedera apropiada. El anticuerpo sintético recombinante o el fragmento de anticuerpo de cadena pesada y ligera pueden coexpresarse a partir de diferentes vectores de expresión en la misma célula hospedera o expresarse como un

anticuerpo de cadena única en una célula hospedera. Se proporcionan ejemplos no limitativos de técnicas de expresión y selección de anticuerpos recombinantes en Capítulo 17 de Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY *supra* y Zuberbuhler et al., 2009, Protein Engineering, Design & Selection 22 169.

- 5 Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos pueden modificarse para que sean administrables a una especie habiendo sido producidos en, u originarios de, otra especie sin provocar una respuesta inmunitaria deletérea al anticuerpo "extraño". En el contexto de los humanos, se trata de la "humanización" del anticuerpo producido en, u originario de, otra especie. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y generalmente implican el "injerto" recombinante de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de anticuerpos no humanos en un andamiaje o cadena principal de anticuerpos humanos.

10 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar etiquetado. Las etiquetas pueden ser como las descritas anteriormente.

- 15 La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la proteína aislada divulgada en la presente, o un fragmento de la misma. En una realización, el ácido nucleico aislado codifica la proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:1, o un fragmento de la misma.

20 El término "ácido nucleico", tal y como se utiliza en la presente, designa el ADN y el ARN monocatenarios o bicatenarios. El ADN incluye el ADN genómico y el ADNc. El ARN incluye ARNm, ARN, ARNi, ARNip, ARNc y ARN autocatalítico. Los ácidos nucleicos también pueden ser híbridos de ADN-ARN. Un ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que típicamente incluye nucleótidos que comprenden una base A, G, C, T o U. Sin embargo, las secuencias de nucleótidos pueden incluir otras bases, tales como la inosina, la metilcitosina, la metilinosina, la metiladenosina y/o la tiouridina, aunque sin limitación alguna.

- 25 También se contemplan variantes del ácido nucleico aislado.

30 En una realización, una variante de ácido nucleico puede tener al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de nucleótidos con una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:1.

En otra realización, una variante de ácido nucleico puede hibridarse con una secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:1 en condiciones de alta rigurosidad.

- 35 Las condiciones de alta rigurosidad son bien conocidas en la técnica, tales como las descritas en los capítulos 2,9 y 2,10 de Ausubel et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1995-2015) y en particular en las páginas 2,9.1 a 2,9.20.

40 Generalmente, la rigurosidad depende de la concentración de uno o más factores durante la hibridación y/o el lavado. Dichos factores pueden incluir la fuerza iónica, el tipo y/o la concentración de detergente, la temperatura, el tiempo, el tipo y/o la concentración de desnaturizante, como es bien sabido en la técnica.

Los ejemplos específicos y no limitativos de condiciones de alta rigurosidad se incluyen:

- 45 (i) de al menos aproximadamente 31 % v/v a al menos aproximadamente 50 % v/v de formamida y de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de sal para la hibridación a 42 °C, y de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de sal para el lavado a 42 °C;
- (ii) BSA al 1 %, 1 mM EDTA, 0,5 MNaHPO<sub>4</sub> (pH 7,2), SDS al 7 % para la hibridación a 65 °C, y (a) 0,1 x SSC, SDS al 0,1 %; o (b) BSA al 0,5 %, 1mM EDTA, 40 mMNaHPO<sub>4</sub> (pH 7,2), SDS al 1 % para el lavado a una temperatura superior a 65 °C durante aproximadamente una hora; y
- 50 (iii) 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % para el lavado a 68 °C o más durante aproximadamente 20 minutos.

En general, el lavado se realiza a  $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C) \% - 12$  °C. En general, la  $T_m$  de un ADN dúplex disminuye aproximadamente 1 °C con cada aumento del 1 % en el número de bases con falta de concordancia.

- 55 En un aspecto, el ácido nucleico aislado se encuentra en un constructo genético que comprende el ácido nucleico aislado enlazado o conectado operativamente a otro u otros componentes genéticos. Un constructo genético puede ser adecuado para el suministro terapéutico del ácido nucleico aislado o para la producción de proteínas recombinantes en una célula hospedera.

60 En términos generales, el constructo genético tiene la forma de, o comprende componentes genéticos de, un plásmido, un bacteriófago, un cósmido, un cromosoma artificial de levadura o bacteriano, tal y como se conocen bien en la técnica. Los constructos genéticos pueden ser adecuados para el mantenimiento y la propagación del ácido nucleico aislado en bacterias u otras células hospedadoras, para su manipulación mediante la tecnología de ADN recombinante y/o la expresión de ácido nucleico o de una proteína codificada de la invención.

- 65 A efectos de la expresión en células hospedadoras, el constructo genético es un constructo de expresión. De forma

adeuada, el constructo de expresión comprende el ácido nucleico de la invención ligado operativamente a una o más secuencias adicionales en un vector de expresión. Un “vector de expresión” puede ser un vector extracromosómico autorreplicante, tal como un plásmido, o un vector que se integra en un genoma hospedero.

5 Por “ligado operativamente” se entiende que dicha secuencia o secuencias nucleotídicas adicionales están posicionadas con respecto al ácido nucleico de la invención preferentemente para iniciar, regular o controlar de otro modo la transcripción.

10 Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula hospedera utilizada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una gran variedad de células hospedadoras.

15 Típicamente, dichas una o más secuencias nucleotídicas reguladoras pueden incluir, entre otras, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosómica, secuencias de poliadenilación, secuencias de inicio y terminación transcripcional, secuencias de inicio y terminación traslacional, y secuencias potenciadoras o activadoras.

La invención contempla los promotores constitutivos, reprimibles o inducibles como son conocidos en la técnica.

20 El constructo de expresión también puede incluir una secuencia de nucleótidos adicional que codifique un compañero de fusión (normalmente proporcionado por el vector de expresión) de modo que la proteína recombinante se exprese como una proteína de fusión, tal como se ha descrito anteriormente.

El constructo de expresión también puede incluir una secuencia de nucleótidos adicional que codifique un marcador de selección como amp<sup>R</sup>, neo<sup>R</sup> o kan<sup>R</sup>, aunque sin limitación de los mismos.

25 En realizaciones particulares relacionadas con el suministro de ácidos nucleicos aislados a una herida o a un sujeto, el constructo de expresión puede estar en forma de ADN plasmídico, que comprende adecuadamente un promotor operable en una célula animal (por ejemplo, un CMV, un promotor de SV40 o α A-cristalina). En otras realizaciones, el ácido nucleico puede estar en forma de un constructo viral, tal como un vector viral adenoviral, vaccinia, lentiviral o adenoasociado.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedera transformada con una molécula de ácido nucleico o un constructo genético descrito en la presente.

35 Las células hospedadoras adecuadas para la expresión pueden ser procariotas o eucariotas. Por ejemplo, las células hospedadoras adecuadas pueden incluir, entre otras, células de mamífero (por ejemplo, células HeLa, Cos, NIH-3T3, HEK293T, Jurkat), células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), células de insecto (por ejemplo, Sf9, *Trichoplusia ni*) utilizadas con o sin un sistema de expresión de baculovirus, células vegetales (por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*) o células bacterianas, tal como *E. coli*. La introducción de constructos genéticos en células hospedadoras (ya sean procariotas o eucariotas) es bien conocida en la técnica, como, por ejemplo, se describe en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-2015), en particular los Capítulos 9 y 16.

40 Los aspectos relacionados de la invención proporcionan kits que comprenden la proteína aislada o fragmento de la misma, ácido nucleico aislado, y/o constructo genético, tal como para la expresión de la proteína aislada o fragmento, su uso en la detección del ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o del ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 o en el objetivo terapéutico de células tumorales que expresen el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6, aunque sin limitación de los mismos.

45 50 A modo de ejemplo, los kits para detectar el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 pueden comprender la proteína aislada o el fragmento, que puede estar etiquetado o no etiquetado, opcionalmente un agente de unión secundario etiquetado como un anticuerpo que se une a la proteína aislada o al fragmento, opcionalmente uno o más sustratos para enzimas, tales como AP o HRP, e instrucciones de uso.

55 En otro ejemplo, los kits para la expresión de la proteína o fragmento aislado pueden comprender un constructo genético que codifique la proteína o fragmento aislado, células hospedadoras adecuadas para la transfección y expresión de la proteína aislada e instrucciones de uso.

60 Para que la invención pueda comprenderse fácilmente y llevarse a la práctica, se hace referencia a los siguientes Ejemplos no limitativos.

## Ejemplos

### Introducción

65 Debido a su conocida implicación en el cáncer y a su nivel normalmente bajo en los tejidos humanos no cancerosos, la detección de una gran cantidad de Neu5Gc en el suero y en los tejidos se consideraría anormal y sería indicativa de la

presencia de un tumor. Esto plantea la posibilidad de explotar la especificidad de la SubB para Neu5Gc con el fin de desarrollar una prueba de cribado diagnóstico de alto rendimiento para una serie de cánceres. Sin embargo, la escasa afinidad por el Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-6 podría repercutir en la sensibilidad de una prueba de este tipo. En el presente estudio, hemos examinado la interacción entre la SubB y los glicanos que terminan en Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-3, o  $\alpha$ 2-6, con vistas a diseñar un mutante SubB con capacidad para reconocer ambos tipos de estructuras con alta afinidad.

5

## Resultados

### Mutación guiada por la estructura del sitio de unión del glicano de la SubB

10

Para comprender la base molecular de la preferencia por las estructuras ligadas a  $\alpha$ 2-3, hemos comparado la interacción entre SubB y Neu5Gca2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc (determinada por cristalografía de rayos X) frente a Neu5Gca2-6Gal $\beta$ 1-3Glc (Figura 1). Mientras que los azúcares subterminales del primer glicano se extienden libremente hacia el disolvente, tal y como se informó anteriormente<sup>8</sup>, el azúcar terciario de la estructura  $\alpha$ 2-6 se pliega de nuevo sobre la superficie SubB, haciendo estrecho contacto con un bucle que comprende los residuos de SubB T104-E108. Este bucle está estabilizado por un enlace disulfuro entre C103 y C109. El impedimento estérico resultante distorsiona el acoplamiento del Neu5Gc terminal en el bolsillo de unión, lo que explica la unión significativamente más deficiente de las estructuras Neu5Gc enlazadas con  $\alpha$ 2-6 observada en el análisis original de la matriz de glicanos.

20

Dado que los ácidos siálicos ligados a  $\alpha$ 2-6 son marcadores comunes del cáncer de colon<sup>19,20</sup> y están ligados al pronóstico en una serie de cánceres<sup>21</sup>, utilizamos la ingeniería molecular para mejorar la unión de las estructuras de Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-6 a SubB mediante el diseño de una serie de mutantes de sustitución y/o delección para reducir la altura del bucle T104-E108. Hemos modelizado las interacciones entre estos mutantes SubB y Neu5Gca2-6Gal $\beta$ 1-3Glc y predecimos que habrían mejorado el reconocimiento de Neu5Gc  $\alpha$ 2-6-ligado sin impactar significativamente en el enlace de Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-3, como se muestra en la Figura 2. A continuación, construimos genes subB recombinantes y expresamos y purificamos las distintas proteínas como proteínas de fusión marcadas con His6 terminal C a partir de *E. coli* recombinante (véanse los Métodos). Se purificaron con éxito proteínas SubB con sustituciones de aminoácidos simples o dobles (T107A y S106A/T107A), un mutante de delección doble ( $\Delta$ S106/ $\Delta$ T107) y un mutante triple ( $\Delta$ S106/ $\Delta$ T107/E108D).

30

### Resonancia de plasmón superficial de mutantes SubB modificados por ingeniería

35

A continuación, la SubB purificada y los distintos derivados mutantes se inmovilizaron en chips Biacore y se probaron sus afinidades de unión a una serie de estructuras con terminación Neu5Ac o Neu5Gc (ácido siálico libre, ácido siálico- $\alpha$ 2-3-lactosa y ácido siálico- $\alpha$ 2-6-lactosa), así como a la glicoproteína  $\alpha$ 1 ácida (AGP) humana y bovina, mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) (Tabla 1). Los glicanos AGP humanos contienen Neu5Ac<sup>22,23</sup> y los glicanos AGP bovinos contienen tanto Neu5Ac como Neu5Gc<sup>23</sup>. El análisis glicoproteómico por EM (Figura 5) se realizó para confirmar la distribución de Neu5Ac y Neu5Gc en las AGP humana y bovina utilizadas en el estudio SPR. Se descubrió que la SubB de tipo silvestre tenía una gran afinidad por la Neu5Gc-lactosa ligada a  $\alpha$ 2-3 y la Neu5Gc libre, tal y como se predijo a partir del resultado de la matriz de glicanos, observándose afinidades de unión nanomolares. No se observó ninguna unión para la Neu5Gc-lactosa ligada a  $\alpha$ 2-6 (probada hasta una concentración máxima de 25  $\mu$ M) y se observó una afinidad de 2,2  $\mu$ M para Neu5Ac ligado a  $\alpha$ 2-3, una disminución de más de 300 veces en la unión en comparación con la estructura Neu5Gc equivalente. La SubB de tipo silvestre también tenía una afinidad de unión 13 veces menor por la AGP humana en comparación con la bovina. La mutación en SubB $_{\Delta}$ T107A no tuvo un efecto significativo en la unión a ninguna de las estructuras probadas en comparación con la proteína de tipo silvestre. SubB $_{\Delta}$ S106A/ $\Delta$ T107A presentó una mejor unión a las estructuras ligadas a  $\alpha$ 2-6, pero esta mejora se observó tanto para Neu5Ac como para Neu5Gc. Las afinidades de rango nanomolar observadas para todos los azúcares de enlace probados revelan que la SubB $_{\Delta}$ S106A/ $\Delta$ T107A es una lectina que reconoce bien el ácido siálico. El mutante SubB $_{\Delta}$ S106/ $\Delta$ T107/E108D presentaba un reconocimiento mejorado del Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-6 sin cambiar la unión a las estructuras de Neu5Ac ligado a  $\alpha$ 2-6. Sin embargo, la diferencia de afinidad entre el Neu5Ac ligado a  $\alpha$ 2-3 y el Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-3 se redujo a 50 veces en comparación con las 300 veces observadas para el tipo silvestre. El mutante SubB $_{\Delta}$ S106/ $\Delta$ T107 mejoró significativamente la discriminación Neu5Gc frente a Neu5Ac en comparación con la proteína de tipo silvestre, y tuvo la capacidad de unir Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-3 y Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-6 con afinidades de unión que no fueron significativamente diferentes entre las dos estructuras (15,3 nM frente a 8,5 nM, respectivamente; P = 0,12). Por lo tanto, SubB $_{\Delta}$ S106/ $\Delta$ T107 mostró la combinación óptima de una mayor discriminación Neu5Gc frente a Neu5Ac y la capacidad de reconocer estructuras Neu5Gc tanto ligado a  $\alpha$ 2-3 como ligado a  $\alpha$ 2-6. El mutante de delección SubB $_{\Delta}$ T107/ $\Delta$ E108 se unió a glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 con una afinidad sustancialmente mayor que la proteína SubB de tipo silvestre, mientras que también se unió a glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3. Sin embargo, a diferencia de SubB $_{\Delta}$ S106/ $\Delta$ T107, SubB $_{\Delta}$ T107/ $\Delta$ E108 puede unir ampliamente glicanos Neu5Ac, tal como Neu5Ac- $\alpha$ 2-6-lac, que no están unidos de forma detectable ni por la SubB de tipo silvestre ni por la SubB $_{\Delta}$ S106/ $\Delta$ T107.

60

El anticuerpo anti-Neu5Gc producido en pollo se utilizó como control y mostró menos selectividad y menor afinidad por los glicanos que contienen Neu5Gc que cualquiera de las proteínas SubB probadas.

### Análisis de matrices de glicanos de SubB de tipo silvestre, SubB $_{\Delta}$ S106A/T107A y SubB $_{\Delta}$ S106/ $\Delta$ T107.

65

Para valorar si la mutación SubB $_{\Delta}$ S106/ $\Delta$ T107 preferida y específica para Neu5Gc introducía especificidad para

estructuras no sialiladas, no cubiertas por el análisis SPR, se realizaron análisis de matrices de glicanos en los mutantes SubB de tipo silvestre, SubB $\Delta$ S106/ $\Delta$ T107 y SubB $\Delta$ S106A/T107A (Tabla 4). La SubB de tipo silvestre sólo mostró una unión significativa a cuatro de las 402 estructuras del conjunto de glicanos; Neu5Gca2-3 Gal, Neu5Gca2-3 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc y dos estructuras terminadas en Neu5Aca2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc. Esto concuerda con el análisis de matriz de glicanos de SubB8 publicado anteriormente ([www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&psId=primscreen\\_1579#](http://www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&psId=primscreen_1579#)). SubB $\Delta$ S106/ $\Delta$ T107 sólo habían mostrado una unión significativa a cuatro estructuras de la matriz. Éstas se limitaron a estructuras con terminación en Neu5Gca2-3Gal o Neu5Gca2-6 Gal. SubB $\Delta$ S106A/T107A se unió a 18 glicanos en total en la matriz, incluyendo estructuras que contenían Neu5Gc y Neu5Ac. También reconoció estructuras sulfatadas, incluidos glicosaminoglicanos (heparina y condroitina-6-sulfato) y estructuras de lactosamina sulfatada (Tabla 4). SubB $\Delta$ S106A/T107A también reconoció un rango con carga negativa de monosacáridos (NeuSAc, Neu5Gc, 9-NAc-NeuSAc, 3-O-Su-GlcNAc) en la matriz.

#### ELISA de SubB modificado por ingeniería frente a proteínas/suero humano y bovino

Para valorar la capacidad de los mutantes diseñados para detectar la presencia de Neu5Gc en muestras biológicas se realizaron ensayos ELISA. Utilizando placas recubiertas con una serie de diluciones de SubB, se probaron proteínas séricas etiquetadas de origen humano y bovino. Se identificó una mejora del doble en el reconocimiento diferencial de las proteínas séricas bovinas que contienen Neu5Gc con SubB $\Delta$ S106/ $\Delta$ T107. (Fig. 3).

#### Detección de AGP humana frente a bovina

Para verificar de forma independiente la capacidad de discriminar entre AGP humana y bovina (sólo la bovina muestra niveles significativos de glicanos Neu5Gc-terminales), se aplicaron como manchas glicoproteínas diluidas en serie sobre filtros de nitrocelulosa y, tras lavarlos y bloquearlos, se superpusieron los filtros con SubB $\Delta$ S106/ $\Delta$ T107 biotinilado purificado. A continuación, la lectina unida se detectó en los filtros lavados utilizando estreptavidina-AP (Figura 4). La unión de SubB $\Delta$ S106/ $\Delta$ T107 a la AGP bovina fue detectable hasta aproximadamente 200 ng/mancha, mientras que la unión significativa a la AGP humana no fue detectable ni siquiera en la cantidad máxima probada (12,5  $\mu$ g/mancha). Este poder discriminatorio es coherente con los datos de SPR anteriores.

#### Matrices de glicanos adicionales

Las distintas estructuras de glicanos Neu5Ac y Neu5Gc analizadas en las matrices de glicanos de Z-biotech se muestran en la Figura 9 y un ejemplo de matriz en la Figura 6. La Tabla 3 proporciona el código que enlaza los glicanos de la Figura 9 con los datos de la matriz de las Figuras 7 y 8. Los datos de la matriz resumidos en la Figura. 7 muestran que la unión a estructuras Neu5Gc es preferida por la SubB de tipo silvestre, pero hay 4/40 glicanos Neu5Ac que se unen con más de 5000 unidades de fluorescencia por encima del fondo y 14/41 estructuras Neu5Gc que tienen una unión por debajo de 5000. Todas las estructuras Neu5Ac registran alguna unión por encima del fondo. Como también es evidente en la Figura 8, la unión a estructuras Neu5Gc es preferida por la SubB 2M. Ningún glicano Neu5Ac se une con más de 5000 unidades de fluorescencia por encima del fondo y sólo 5/41 estructuras Neu5Gc tienen una unión por debajo de 5000. Sólo 7/14 glicanos Neu5Ac tienen alguna unión por encima del fondo. Estos resultados muestran una mejora definitiva con respecto a los resultados obtenidos con la SubB WT en términos de especificidad para el Neu5Gc y de reconocimiento mejorado de los diferentes enlaces y presentaciones de los glicanos que contienen Neu5Gc.

#### Desarrollo ulterior del cribado en chip de proteínas que contienen Neu5Gc en suero utilizando SubB 2M.

En referencia a las Figuras 10 y 11, todos los ensayos se realizaron en un fondo de suero humano normal al 1 % obtenido de Sigma-Aldrich. La SubB de tipo silvestre no pudo analizarse ya que todas las uniones observadas procedían del suero presente, con valores que caían por debajo del control de sólo suero cuando se añadía una proteína que contenía Neu5Gc. Esto indica que la SubB WT tenía preferencia por la proteína Neu5Gc sobre el suero pero se unía al suero a niveles elevados en ausencia de la proteína (Figura 10). En la FIG. 11, la SubB 2M funcionó mucho mejor con respuestas por encima del fondo sérico a partir de concentraciones entre 31,25 nM y 62,5 nM. Esto es a una concentración de proteína de -2  $\mu$ g/mL.

#### Discusión

El Neu5Gc es un importante marcador diagnóstico y pronóstico en los carcinomas humanos, habiéndose detectado una elevada expresión de Neu5Gc en el cáncer de mama, ovario, próstata, colon y pulmón<sup>11,12</sup>. La SubB de tipo silvestre tenía una especificidad sin precedentes para los glicanos con terminación en Neu5Gc, pero se unía de manera deficiente al Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-6 y seguía reconociendo las estructuras de Neu5Ac ligado a  $\alpha$ 2-3, aunque débilmente<sup>8</sup>. Para mejorar el reconocimiento de la SubB para el Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-6 y hacerla más específica para el Neu5Gc, diseñamos la SubB utilizando modificaciones asistidas por la estructura, centrándonos específicamente en el bucle T104-E108.

La manipulación de este bucle tuvo dos resultados específicos mediante la modificación de los mismos dos aminoácidos. En primer lugar, la sustitución por alanina de S106 y T107 (S106A/T107A) condujo a una pérdida de especificidad por Neu5Gc, produciendo una lectina capaz de unirse a todos los glicanos sialilados terminales probados,

independientemente del enlace ( $\alpha$ 2-3 y  $\alpha$ 2-6) o del tipo de ácido siálico (Neu5Ac o Neu5Gc). La segunda fue que la delección de los mismos dos aminoácidos ( $\Delta S106/\Delta T107$ ) produjo una lectina con una especificidad excelente para Neu5Gc independientemente del enlace ( $\alpha$ 2-3 y  $\alpha$ 2-6). El mutante SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  mejoró significativamente en el reconocimiento de estructuras que contienen Neu5Gc en comparación con la SubB de tipo silvestre. La SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  tampoco presentaba diferencias en su capacidad para unirse a estructuras Neu5Gc ligado  $\alpha$ 2-3 o Neu5Gc ligado  $\alpha$ 2-6, lo que la convertía en una mejora significativa con respecto a la proteína de tipo silvestre. Otras modificaciones de la proteína SubB fuera de los aminoácidos S106 y T107 no produjeron ninguna mejora significativa de la especificidad. La proteína mutante SubB $_{\Delta S106/\Delta T107/E108D}$ , que es la proteína SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  con una mutación E108D también añadida, era menos capaz de distinguir el Neu5Gc ligado a  $\alpha$ 2-3 del Neu5Ac ligado a  $\alpha$ 2-3 que la SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  y tenía una unión más fuerte a la glicoproteína  $\alpha$ 1-ácido humana que el mutante SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  (24 veces más proteína unida por SubB $_{\Delta S106/\Delta T107/E108D}$  que SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$ ). Por el contrario, el mutante de delección SubB $_{\Delta T107/\Delta E108}$  no sólo se unió a glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-6 y glicanos de ácido N-glicolilneuramínico ligado a  $\alpha$ 2-3, sino también glicanos Neu5Ac, tales como Neu5Ac- $\alpha$ 2-6-lac y Neu5Ac- $\alpha$ 2-3-lac, que no están unidos de forma detectable por SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$ .

Estos mutantes SubB mejorados ofrecen una nueva herramienta para la prueba de muestras biológicas, en particular suero y otros fluidos de individuos con cáncer o con sospechas de tener cáncer.

#### Métodos

##### Modelado estructural de SubB.

La estructura tridimensional de los mutantes SubB se modeló utilizando Phyre2<sup>24</sup>. Neu5GCα2-6Galβ1-3Glc se adquirió de PDB ID: 4EN8<sup>25</sup> y se modeló en las estructuras mutantes SubB y SubB manualmente utilizando Coot<sup>26</sup>.

##### Construcción y expresión de mutantes SubB.

Las mutaciones se introdujeron en la secuencia codificante de la *subB* (cerca del extremo 3') mediante PCR directa de alta fidelidad utilizando el cebador sentido pETSubBF y los cebadores antisentido específicos de las mutaciones respectivos enumerados en la Tabla 2. Los productos de la PCR se clonaron en los sitios *BamHI* y *Xhol* de pET-23(+) (Novagen) y se transformaron en *E. coli* BL21(DE3). Los derivados SubB se expresaron y purificaron como proteínas de fusión etiquetadas con His<sub>6</sub> mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA, tal y como se ha descrito previamente<sup>4</sup>. Las proteínas tenían una pureza superior al 95 %, según se juzgó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

##### Resonancia de plasmón superficial de SubB y mutantes de SubB modificados por ingeniería.

La resonancia de plasmón superficial (SPR) se llevó a cabo utilizando el sistema Biacore T100 (GE), tal y como se ha descrito anteriormente<sup>27</sup>. Brevemente, SubB, mutantes SubB e IgY anti-Neu5Gc (SiaMab; anteriormente Sialix/GC-Free Inc., San Diego, CA, EE. UU.) se inmovilizaron en la celda de flujo 2-4 de un chip sensor CMS serie S (GE) utilizando el kit de captura NHS y la celda de flujo 1 se utilizó como una inmovilización en blanco. Los monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y la glicoproteína  $\alpha$ 1 ácida de origen humano y bovino (Sigma-Aldrich; véase la Tabla 1) se pasaron a 0,01-100  $\mu$ M en los experimentos iniciales de determinación del rango. Las concentraciones se ajustaron y todos los datos se analizaron mediante cinética de ciclo único utilizando el software Biacore T100 Evaluation.

##### Análisis espectroscópico de masas de la glicoproteína $\alpha$ 1 ácida.

La AGP del plasma humano (Sigma-Aldrich G9885) y del plasma bovino (Sigma-Aldrich G3643) (1 mg en cloruro de guanidinio 6M, Tris-HCl 50 mM pH 8) se redujo y alquiló con ditiotreitol 10 mM y acrilamida 25 mM, respectivamente. A continuación, se precipitó la proteína añadiendo 4 volúmenes de metanol:acetona 1:1, incubando a -20 °C durante 16 h y centrifugando después (18,000 rcf, 10 min) para recoger el precipitado. La proteína precipitada se resuspendió en 50  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM pH8 y se digirió (37 °C, 16 h) con 1  $\mu$ g de tripsina (Trypsin Gold, Promega). A continuación, los péptidos digeridos se desalaron con C18 ZipTips (Millipore).

##### Análisis ELISA de SubB y el mutante SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$ modificado por ingeniería.

Los pozos de las placas NUNC Maxisorp negras de 96 pozos se recubrieron con proteína SubB o SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  diluida dos veces en serie en un amortiguador de recubrimiento de bicarbonato/carbonato 100 mM (pH 9,6) comenzando con 1,25  $\mu$ g de proteína durante una noche a 4 °C. Los pozos se lavaron 3 veces con disolución salina tamponada con fosfato, Tween-20 al 0,05 %(PBS-T) antes de añadir disolución amortiguadora (BSA al 3 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas del suero humano normal y del suero bovino se marcaron con fluorescencia combinando suero puro con 100  $\mu$ M de tinte FITC (Peirce) e incubando en hielo durante 1 hora. El exceso de tinte se eliminó utilizando una columna de centrifugación de exclusión por tamaño de 1 kDa. Se añadieron 100  $\mu$ l de suero humano normal o bovino marcado con FITC a los pozos recubiertos con SubB o SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$  y se incubaron los pozos durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron 3 veces con PBS-T. Se añadieron 100  $\mu$ l de PBS a cada pozo antes de medir la fluorescencia a 485/535 nm. Los valores de las unidades de fluorescencia se muestran como la media de duplicados +/- SD, restando las unidades de fluorescencia medias obtenidas para los pozos que contienen todos los reactivos excepto las proteínas SubB. Cualquier valor negativo se consideró 0.

*Experimentos de superposición de SubB.*

La SubB<sub>ΔS106/ΔT107</sub> purificada se etiquetó con biotina utilizando el kit de biotinilación EZ-Link® Sulfo-NHS (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Glicoproteína α-1 ácida humana y bovina purificada (No. de cat. Sigma: G9885 y G3643) se disolvieron en agua a 5 mg/ml y se aplicaron como manchas volúmenes de 5 µl de diluciones dobles seriadas en filtros de nitrocelulosa y se secaron al aire a 37 °C durante la noche. A continuación, los filtros se bloquearon con leche desnatada al 5 % en disolución salina amortiguada con Tris con Tween 20 al 0,05 % (TTBS) durante 2 h. Despues de lavarlos tres veces en TTBS, los filtros se recubrieron con 1 µg/ml de biotina-SubB<sub>ΔS106/ΔT107</sub> en TTBS y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. A continuación, los filtros se lavaron tres veces en TTBS y la biotina-SubB<sub>ΔS106/ΔT107</sub> unida se detectó utilizando el conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche). Los filtros se revelaron utilizando un sistema cromogénico de sustrato de tetrazolio nitroazul/X-fosfato (Roche).

*Análisis de matrices de glicanos de SubB y de mutantes de SubB modificados por ingeniería.*

Para los datos mostrados en la Tabla 3, los portaobjetos de las matrices de glicanos se imprimieron en sustratos activados con SuperEpoxy 3 (Arrayit) utilizando una impresora de contacto Arrayit Spotbot Extreme como se describió previamente<sup>28</sup>. Para cada submatriz se precomplejaron 2 µg de proteínas SubB con anticuerpo anti-etiqueta His (Señalización celular) y anticuerpos secundarios y terciarios Alexa555 (conejo anti-ratón; cabra anti-conejo) en una relación de 2: 1:0,5:0,25 en un volumen final de 500 µl. Este complejo proteico de anticuerpos de 500 µl se añadió a un marco genético de 65 µl (Thermo Scientific) sin un cubreobjetos. El lavado y el análisis se realizaron como se ha descrito previamente<sup>27</sup>.

*Matrices de glicanos Neu5Ac/Neu5Gc*

Los datos mostrados en las Figuras 6-9, las matrices de glicanos Neu5Ac/Neu5Gc se obtuvieron de Z-biotech (<http://www.zbiotech.com/neu5gc-xenoantigen-microarray.html>). Las matrices se preformaron según las instrucciones del fabricante con un total de 2 µg de proteína aplicada a cada una de las áreas de la matriz. La detección se realizó con IgG anti-His de ratón (relación molar 1: 1 con proteína), IgG de conejo anti-ratón Alexa 555 (0,5 de cantidad molar de IgG de ratón) e IgG de cabra anti-conejo Alexa 555 (0,5 de cantidad molar de IgG de conejo). Las proteínas se incubaron durante 1 hora y se lavaron 3 veces en 1xPBS. Los portaobjetos se escanearon en un Innoscan 1100AL utilizando láseres de 488, 532 y 647. Las matrices se analizaron con el software Mapix. Todos los datos se tomaron del canal láser 532 y en el análisis se utilizó la fluorescencia con sustracción de fondo.

Referencias

1. Beddoe, T., Paton, A.W., Le Nours, J., Rossjohn, J. y Paton, J.C. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends Biochem Sci* 35, 411-8 (2010).
2. Petr, T. et al. Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for in situ detection with special emphasis to acetone pre-extraction. *Eur J Histochem* 54, e23 (2010).
3. Kenworthy, A.K., Petranova, N. y Edidin, M. High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell* 11, 1645-55 (2000).
4. Paton, A.W., Srimanote, P., Talbot, U.M., Wang, H. y Paton, J.C. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxicogenic Escherichia coli. *J Exp Med* 200, 35-46 (2004).
5. Paton, A.W. et al. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* 443, 548-52 (2006).
6. Backer, J.M. et al. Chaperone-targeting cytotoxin and endoplasmic reticulum stress-inducing drug synergize to kill cancer cells. *Neoplasia* 11, 1165-73 (2009).
7. Martin, S. et al. Targeting GRP78 to enhance melanoma cell death. *Pigment Cell Melanoma Res* 23, 675-82 (2010).
8. Byres, E. et al. Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature* 456, 648-52 (2008).
9. Inoue, S., Sato, C. y Kitajima, K. Extensive enrichment of N-glycolylneuraminic acid in extracellular sialoglycoproteins abundantly synthesized and secreted by human cancer cells. *Glycobiology* 20, 752-62 (2010).
10. Malykh, Y.N., Schauer, R. y Shaw, L. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie* 83, 623-34 (2001).
11. Marquina, G. et al. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 56, 5165-71 (1996).
12. Samraj, A.N., Laubli, H., Varki, N. y Varki, A. Involvement of a non-human sialic Acid in human cancer. *Front Oncol* 4, 33 (2014).
13. Varki, N.M. y Varki, A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 87, 851-7 (2007).
14. Lofting, J.C., Paton, A.W., Varki, N.M., Paton, J.C. y Varki, A. A dietary non-human sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome. *Kidney Int* 76, 140-4 (2009).
15. Yin, J. et al. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res* 66, 2937-45 (2006).
16. Dennis, J.W., Laferte, S., Yagel, S. y Breitman, M.L. Asparagine-linked oligosaccharides associated with metastatic cancer. *Cancer Cells* 1, 87-92 (1989).
17. Padler-Karavani, V. et al. Human xeno-autoantibodies against a non-human sialic acid serve as novel serum

- biomarkers and immunotherapeutics in cancer. *Cancer Res* 71, 3352-63 (2011).
18. Pham, T. et al. Evidence for a novel human-specific xeno-auto-antibody response against vascular endothelium. *Blood* 114, 5225-35 (2009).
19. Murayama, T. et al. Colon carcinoma glycoproteins carrying alpha 2,6-linked sialic acid reactive with Sambucus nigra agglutinin are not constitutively expressed in normal human colon mucosa and are distinct from sialyl-Tn antigen. *Int J Cancer* 70, 575-81 (1997).
- 5 20. Sata, T., Roth, J., Zuber, C., Stamm, B. y Heitz, P.U. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with Sambucus nigra and Maackia amurensis lectins. *Am J Pathol* 139, 1435-48 (1991).
- 10 21. Hedlund, M., Ng, E., Varki, A. y Varki, N.M. alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Res* 68, 388-94 (2008).
22. Imre, T. et al. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 40, 1472-83 (2005).
- 15 23. Nakano, M., Kakehi, K., Tsai, M.H. y Lee, Y.C. Detailed structural features of glycan chains derived from alpha1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiology* 14, 431-41 (2004).
24. Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. y Sternberg, M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10, 845-58 (2015).
- 20 25. Yamashita, S. et al. Carbohydrate recognition mechanism of HA70 from Clostridium botulinum deduced from X-ray structures in complexes with sialylated oligosaccharides. *FEBS Lett* 586, 2404-10 (2012).
26. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. y Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 486-501 (2010).
27. Shewell, L.K. et al. The cholesterol-dependent cytolsins pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, E5312-20 (2014).

Tabla 1. Análisis de resonancia de plasmón superficial de proteínas de unión a Neu5Gc

Variante/anticuerpo SubB	AGP α1 humana	AGP α1 bovina	Neu5 Ac-α2-3-lac	Neu5 Gc-α2-3-lac	Neu5 Ac-α2-6-lac	Neu5 Gc-α2-6-lac	Neu5 Ac libre	Neu5 Gc libre	Ma nS	maltosa	Lactosa	GT2	Condroitina 6 sulfato
Anticuerpo anti-NeuSGc (IgY IgY)	n.t.	n.t.	249 ±46 μM	2,34±0,85 μM	n.t.	n.t.	NCDI	35,7±4,2 μM	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
SubB de tipo silvestre	2,12±0,56 μM (Rmáx= 125)	155,8±22 nM (Rmáx= 525)	2,24±0,93 μM	6,62±2,17n M	NCDI	NCDI	NCDI	18,1±5,9 nM	NC DI	NCD I	NCD I	NCDI	NCDI
S106A/T107A	723±129 nM (Rmáx= 142)	164±10 nM (Rmáx= 499)	489±171 nM	1,52 ±0,50 nM	348±52 nM	8,05±0,14 nM	3,27±0,29 μM	6,61±1,6 nM	NC DI	NCD I	NCD I	8,97 ±2,2 μM	33,0 ±7,6 μM
T107A	n.t.	n.t.	4,18±1,6 μM	15,2±0,02n M	NCDI	208±123 nM	NCDI	16,8±0,99 nM	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
ΔS106/ΔT107	1,65±0,42 μM (Rmáx= 7)	115±37 nM (Rmáx= 299)	NCDI	15,3±5,8 nM	NCDI	8,53±0,15 nM	NCDI	17,8±4,0 nM	NC DI	NCD I	NCD I	NCDI	NCDI
ΔS106/ΔT1071 E108D	2,82±0,15 μM (Rmáx= 165)	32,5±2,6 nM (Rmáx= 276)	371±64 nM	7,39±0,72n M	NCDI	3,45±0,87 nM	NCDI	45,1±1,2 nM	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
AT107/AE108	308±24 nM (Rmáx= 542)**	98,8±43 nM (Rmáx= 865)**	9,65±0,70 nM	4,32±0,65 nM	4,94±0,35 nM	3,71±0,41 nM	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
ΔS106/ΔT1071 AE108*	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

\*Insoluble en proteína \*\* Realizado en otra ocasión. Capturó 3 veces más proteína que la proteína anterior.

# ES 2 983 352 T3

Leyenda de la Tabla 1: Las afinidades de unión de la SubB de tipo silvestre, de varios derivados mutantes y de un anticuerpo IgY anti-Neu5Gc, a tri- y monosacáridos purificados y/o a la glicoproteína  $\alpha$ 1 ácida (AGP) humana o bovina, se determinaron mediante SPR, tal y como se describe en los Materiales y Métodos. NCDI indica que no se observó ninguna interacción dependiente de la concentración con concentraciones de hasta 100  $\mu$ M; ND: No realizado; Rmáx: la cantidad total de unidades de respuesta (RU) del analito unido a la proteína (cuanto mayor sea el número, mayor será la unión del glicano/glicoproteína a la SubB inmovilizada).

5

**Tabla 2. Oligonucleótidos**

Cebador	Secuencia 5'-3'
pETSubBF	TTGTAAGGATCCGGAGGTGCATATGACG (SEQ ID NO:4)
pETSubB <sub>T107R</sub>	GATTATCTCGAGTGAGTTCTTTCCTGTCAGGACAAACATTCTGCCGATG TGGTGCAGGTTG (SEQ ID NO:5)
pETSubB <sub>S106A/T107R</sub>	GATTATCTCGAGTGAGTTCTTTCCTGTCAGGACAAACATTCTGCCGCT GTGGTGCAGGTTG (SEQ ID NO:6)
pETSubB <sub>ΔS106/ΔT107R</sub>	GATTATCTCGAGTGAGTTCTTTCCTGTCAGGACAAACATTCTGTGGTGC AGGTTGATAACCC (SEQ ID NO:7)
pETSubB <sub>ΔS106/ΔT107/E108D</sub> R	GATTATCTCGAGTGAGTTCTTTCCTGTCAGGACAAACAGTCTGTGGTGC CAGGTTGATAACCC (SEQ ID NO:8)

10

**Tabla 3. Códigos de glicanos para las Figuras 7-9**

ID de Glicano Gc	Glicanos Neu5Gc	ID de Glicano Ac	Glicanos Neu5Ac
GC-1	N002G	AC-1	N002
GC-2	N003G	AC-2	N003
GC-3	N005G	AC-3	N005
GC-4	N012G	AC-4	N012
GC-5	N013G	AC-5	N013
GC-6	N015G	AC-6	N015
GC-7	N022G	AC-7	N022
GC-8	N023G	AC-8	N023
GC-9	N025G	AC-9	N025
GC-10	N032G	AC-10	N032
GC-11	N033G	AC-11	N033
GC-12	N042G	AC-12	N042
GC-13	N043G	AC-13	N043
GC-14	N045G	AC-14	N045
GC-15	N052G	AC-15	N052
GC-16	N053G	AC-16	N053
GC-17	N055G	AC-17	N055
GC-18	N112G	AC-18	N112
GC-19	N113G	AC-19	N113
GC-20	N115G	AC-20	N115
GC-21	N122G	AC-21	N122
GC-22	N123G	AC-22	N123
GC-23	N125G	AC-23	N125

# ES 2 983 352 T3

<b>ID de Glicano Gc</b>	<b>Glicanos Neu5Gc</b>	<b>ID de Glicano Ac</b>	<b>Glicanos Neu5Ac</b>
GC-24	N133G	AC-24	N133
GC-25	N134G	AC-25	N134
GC-26	N135G	AC-26	N135
GC-27	N 144G	AC-27	N144
GC-28	N145G		
GC-29	N155G	AC-29	N155
GC-30	N212G	AC-30	N212
GC-31	N213G	AC-31	N213
GC-32	N215G	AC-32	N215
GC-33	N222G	AC-33	N222
GC-34	N223G	AC-34	N223
GC-35	N225G	AC-35	N225
GC-36	N233G	AC-36	N233
GC-37	N235G		
GC-38	N245G		
GC-39	N255G	AC-39	N255
GC-40	N003G1		
GC-41	N003G2		

# ES 2 983 352 T3

Tabla 4

	Número	Experiencia	Sab8 WT	Sab851867WT87	Sab851867WT8A
Valor promedio del diliguo por muestra del suelo (± desviación estándar de la media)					
1			-0,002	0,119	0,230
2			-0,533	0,117	0,058
3			0,060	0,167	0,109
4			0,006	0,253	0,168
5			-0,010	0,531	0,445
6			0,004	0,154	0,249
7			0,002	0,183	0,046
8			-0,001	0,156	0,767
9			0,001	0,118	0,748
10			0,006	0,153	0,423
11			-0,011	0,103	0,119
12			0,016	0,172	0,122
13			-0,003	0,372	0,300
14			0,021	0,086	0,056
15			0,002	0,205	0,237
16			0,001	0,178	0,231
17			-0,036	0,151	0,149
18			-0,002	0,123	0,027
19			0,232	0,195	0,118
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					
61					
62					
63					
64					
65					
66					
67					
68					
69					
70					
71					
72					
73					
74					
75					
76					
77					
78					
79					
80					
81					
82					
83					
84					
85					
86					
87					
88					
89					
90					
91					
92					
93					
94					
95					
96					
97					
98					
99					
100					
101					
102					
103					
104					
105					
106					
107					
108					
109					
110					
111					
112					
113					
114					
115					
116					
117					
118					
119					
120					
121					
122					
123					
124					
125					
126					
127					
128					
129					
130					
131					
132					
133					
134					
135					
136					
137					
138					
139					
140					
141					
142					
143					
144					
145					
146					
147					
148					
149					
150					
151					
152					
153					
154					
155					
156					
157					
158					
159					
160					
161					
162					
163					
164					
165					
166					
167					
168					
169					
170					
171					
172					
173					
174					
175					
176					
177					
178					
179					
180					
181					
182					
183					
184					
185					
186					
187					
188					
189					
190					
191					
192					
193					
194					
195					
196					
197					
198					
199					
200					
201					
202					
203					
204					
205					
206					
207					
208					
209					
210					
211					
212					
213					
214					
215					
216					
217					
218					
219					
220					
221					
222					
223					
224					
225					
226					
227					
228					
229					
230					
231					
232					
233					
234					
235					
236					
237					
238					
239					
240					
241					
242					
243					
244					
245					
246					
247					
248					
249					
250					
251					
252					
253					
254					
255					
256					
257					
258					
259					
260					
261					
262					
263					
264					
265					
266					
267					
268					
269					
270					
271					
272					
273					
274					
275					
276					
277					
278					
279					
280					
281					
282					
283					
284					
285					
286					
287					
288					
289					
290					
291					
292					
293					
294					
295					
296					
297					
298					
299					
300					
301					
302					
303					
304					
305					
306					
307					
308					
309					
310					
311					
312					
313					
314					
315					
316					
317					
318					
319					
320					
321					
322					
323					
324					
325					
326					

ES 2 983 352 T3

# ES 2 983 352 T3

146	Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2	0,085	0,187	0,144
147	Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3	0,003	0,162	0,380
150	3-O-Su-Galβ1-3GalNAcβ-sp3	0,003	0,146	0,372
153	6-O-Su-Galβ1-3GalNAcβ-sp3	0,009	0,118	0,387
152	3-O-Su-Galβ1-4Galβ-sp2	0,008	0,360	0,086
154	6-O-Su-Galβ1-4Galβ-sp2	0,000	0,130	0,279
155	3-O-Su-Galβ1-3GalNAcβ-sp3	-0,014	0,219	0,838
157	3-O-Su-Galβ1-4GalNAcβ-sp3	-0,003	0,206	0,330
159	4-O-Su-Galβ1-4GalNAcβ-sp3	0,007	0,193	0,765
161	6-O-Su-Galβ1-3GalNAcβ-sp3	0,004	0,129	0,146
163	6-O-Su-Galβ1-4GalNAcβ-sp3	-0,020	0,161	0,646
176	3-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2	-0,007	0,110	0,102
177	3-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3	-0,427	0,188	0,868
178	6-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)Glcβ-sp2	-0,022	0,424	0,873
179	6-O-Su-Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3	0,884	0,166	0,076
180	6-O-Su-Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2	0,003	0,057	0,613
181	3,4-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	-0,002	0,140	0,301
182	3,6-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	0,018	0,218	0,950
183	4,6-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	0,058	0,262	0,133
184	4,6-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	-0,003	0,396	1,760
185	3,6-O-Su-Galβ1-4(6-Su)GlcNAcβ-sp2	-0,041	0,438	4,455
201	3,4-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	-0,009	0,112	0,885
203	Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3	-0,015	0,360	3,457
220	Galα1-3Galβ1-4Glcβ-sp2	-0,002	0,216	0,242
222	Galβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	0,014	0,132	0,357
224	Galβ1-4Galβ1-4Glcβ-sp3	-0,062	0,077	0,130
225	Galβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	0,020	0,218	0,936

# ES 2 983 352 T3

228	Gaffi-3Carb1-4CnNAc-3p <sup>2</sup>	-0,075	0,091	0,678
229	Gaffi-3Carb1-4CnNAc-3p <sup>2</sup>	0,002	0,210	0,230
231	Gaffi-3Carb1-4CnNAc-3p <sup>2</sup>	0,000	0,206	0,742
232	Gaffi-3Carb1-4CnNAc-3p <sup>2</sup>	0,008	0,168	0,640
254	Gaffi-3GlcNAc1-4GulNAc-3p <sup>2</sup>	-0,007	0,285	0,832
362	Gaffi-3GluNAc1-4Gal-3p <sup>2</sup>	-0,045	0,169	0,102
363	Gaffi-4Glu1-4GluNAc-3p <sup>2</sup>	0,013	0,174	0,876
373	Gaffi-4Glu1-4GluNAc1-4Gal-3p <sup>2</sup>	0,012	0,184	0,395
375	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GluNAc-3p <sup>2</sup>	-0,009	0,649	0,260
376	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4Glu-3p <sup>2</sup>	0,098	0,231	0,381
377	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	0,001	0,184	0,069
378	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	-0,001	0,214	0,824
379	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	-0,014	0,251	0,434
380	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	0,028	0,258	0,683
381	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	0,140	0,258	0,613
382	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	0,387	0,168	0,438
383	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	-0,070	0,114	0,078
384	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	0,277	0,115	0,125
385	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	0,033	0,373	0,076
386	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	0,038	0,152	0,229
387	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	-0,006	0,280	0,821
388	Gaffi-4GluNAc1-4Gal1-4GlcNAc-3p <sup>2</sup>	-0,056	0,107	0,042
504	(A-GlNAc)-3,6-M-Glc-3p <sup>2</sup>	-0,020	0,352	0,398
1A	Gaffi-3Glc-3Ac	-0,023	0,263	0,523
1B	Gaffi-3Glc-3Ac	-0,013	0,178	0,775
1C	Gaffi-3Gal	-0,022	0,199	0,458
1D	Gaffi-3GlcNAc	-0,020	0,352	0,398
1E	Gaffi-3GlcNAc	-0,013	0,178	0,775
1F	Gaffi-3GlcNAc1-4Glc-3Ac	0,081	0,395	0,131

# ES 2 983 352 T3

16	Gaff1-3Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,091	0,114
18	Gaff1-4Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,086	0,148
11	Gaff1-4Gaff1-Gaff1-4Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,070	0,220
11	Gaff1-4Gaff1-Gaff1-4Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,064	0,273
1K	Gaff1-4Gaff1-4Gaff1	-0,026	0,121
1L	Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,082	0,662
1M	Gaff1-3Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,030	0,192
1N	Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,026	0,408
1O	Gaff1-3Gaff1-4Gaff1-Gaff1	-0,003	0,217
1P	Gaff1-3Gaff1-4Gaff1	-0,010	0,291
1A	Gaff1-3Gaff1-4Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,089	0,159
1B	Gaff1-4Gaff1-Gaff1	0,321	0,104
1C	Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,000	0,326
1D	Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,045	0,125
1E	Gaff1-4Gaff1-4Gaff1-Gaff1	0,017	0,524
1F	Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,084	0,324
1G	Gaff1-3Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,001	0,113
1H	Gaff1-3Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,075	0,100
1I	Gaff1-3Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,016	0,142
1K	Gaff1-4Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,091	0,208
1L	Gaff1-4Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,035	0,201
1M	Gaff1-4Gaff1	0,011	0,382
1N	Gaff1-Gaff1	0,080	0,093
		Sub 885 18627102	0,185
		Sub 885 18627103	0,015
101	Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,148	0,015
102	Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,012	0,103
103	Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,067	0,177

## N-oxalylglutamimic terminal

101	Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	0,015	0,148
102	Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,012	0,103
103	Gaff1-Gaff1-Gaff1-Gaff1	-0,067	0,177

ES 2 983 352 T3

ES 2 983 352 T3

# ES 2 983 352 T3

7B	GaP1- <i>Acetyl-3Glu1-3Glu1-4Glc</i>	0,017	0,006
7C	GaP1- <i>Acetyl-3Glu1-3Glu1-4Glc</i>	0,001	0,305
7D	Fuc1-2Gal1-4Fuc1-3Glu1-3Glu1-4Glc	0,002	-0,029
7E	GaP1-3Glu1-4Glu1-3Glu1-3Glu1-4Glc	0,000	0,120
7F	Fuc1-2Gal1	-0,217	-0,589
7G	Fuc1-2Gal1-4Glc	0,409	0,452
7H	GaP1-4Fuc1-3Glc	-0,009	0,356
7I	GaP1-4Fuc1-3Glc1-3G	-0,002	0,370
7J	GaP1-3Glu1-4Glc1-3G	-0,010	0,189
7K	Gal1-4Glc1-3Glc1-3Glc	0,016	0,360
7L	Fuc1-2Gal1-4Fuc1-3Glc	-0,012	0,165
7M	GaP1-2Fuc1-3Glc	0,030	0,832
7N	Fuc1-2Gal1-4Fuc1-3Glc1-3Glc	0,012	0,170
7O	Fuc1-2Gal1-3Glc1-3G	-0,003	0,342
7P	Fuc1-2Gal1-3Glc1-4Glc1-3G	0,008	0,223
7A	SO <sub>4</sub> -3Gal1-4Fuc1-4Glc1-3G	0,011	0,169
7B	SO <sub>4</sub> -3Gal1-4Fuc1-3Glc1-3G	0,024	0,192
7C	GaP1-3Glc1-3Glu1-3Glc1-4Fuc1-3Glc1-4Glc	0,004	0,104
7D	GaP1-4Fuc1-3Glc1-3Glu1-3Glc1-3Glc1-4Glc	0,005	0,265
7E	GaP1-3Glu1-3Glc1-3Glc1-3Glc1-3Glc1-4Glc	0,004	0,309
7F	GaP1-4Fuc1-3Glc1-3Glc1-3Glc1-3Glc1-4Glc	0,012	0,445
7G	GaP1-4Glc1-3Gal1-4Fuc1-3Glc	0,016	0,183
7H	Fuc1-2Gal1-4Fuc1-3Glc1-3Glc1-4Glc	0,013	0,690
7I	Fuc1-2Gal1-4Fuc1-3Glc1-3Glc1-4Fuc1-3Glc	0,008	0,243
7J	Fuc1-2Gal1-4Fuc1-3Glc1-3Glc1-4Fuc1-3Glc	0,011	0,133
7K	GaP1-4Fuc1-3Glc1-3Gal1-4Glc1-3Glc1-4Glc	0,023	0,243
7L	GaP1-4Fuc1-3Glc1-3Gal1-4Fuc1-3Glc1-3Glc1-4Glc	0,020	0,216

ES 2 983 352 T3

# ES 2 983 352 T3

206	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	1,248	0,253	0,278
209	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,168	0,266	0,316
320	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,330	0,308	0,478
322	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	2,972	1,838	2,394
324	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,300	1,135	2,798
326	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	-0,105	0,119	0,161
328	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	-0,003	0,459	0,930
330	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,807	0,201	0,919
332	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,037	0,182	0,125
334	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,010	0,559	0,105
336	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,017	0,198	0,399
338	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,326	0,166	0,116
340	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	-0,295	0,160	0,071
342	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,316	1,021	2,703
344	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	-0,036	0,124	0,212
421	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	-0,105	0,194	0,468
423	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,843	0,150	0,603
425	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,141	0,196	0,116
426	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,118	0,193	0,067
428	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,066	0,063	0,091
429	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,753	0,143	0,132
431	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,079	0,144	0,034
433	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,401	0,068	0,377
435	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,769	0,103	2,216
436	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,198	0,082	0,111
438	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	-0,021	0,114	0,072
439	<chem>Na[Al(OH)4][Al(OH)4]2</chem>	0,653	0,345	0,181

ES 2 983 352 T3

# ES 2 983 352 T3

	<i>Manuf.-24KtAu-esp3</i>	<i>0,015</i>	<i>0,105</i>	<i>0,086</i>
139	<i>Manuf.-35KtAu-esp3</i>	<i>0,063</i>	<i>0,076</i>	<i>0,377</i>
140	<i>Manuf.-45KtAu-esp3</i>	<i>-0,006</i>	<i>0,110</i>	<i>0,112</i>
141	<i>Manuf.-45KtAu-esp4</i>	<i>0,426</i>	<i>0,133</i>	<i>0,065</i>
142	<i>Manuf.-65KtAu-esp3</i>	<i>0,035</i>	<i>0,233</i>	<i>0,213</i>
143	<i>Manuf.-65KtAu-esp4</i>	<i>0,033</i>	<i>0,119</i>	<i>0,058</i>
144	<i>Manuf.-24KtAu-esp4</i>	<i>0,039</i>	<i>0,663</i>	<i>0,291</i>
145	<i>Manuf.-35KtAu-esp4</i>	<i>0,360</i>	<i>0,077</i>	<i>0,137</i>
146	<i>Manuf.-45KtAu-esp4</i>	<i>0,580</i>	<i>0,106</i>	<i>0,338</i>
147	<i>36KtAu-esp3-24KtAu</i>	<i>0,411</i>	<i>0,176</i>	<i>0,070</i>
148	<i>36KtAu-esp4-24KtAu</i>	<i>-0,002</i>	<i>0,133</i>	<i>0,059</i>
149	<i>Manuf.-24KtAu</i>	<i>-0,008</i>	<i>0,389</i>	<i>0,154</i>
150	<i>Manuf.-35KtAu</i>	<i>0,021</i>	<i>0,384</i>	<i>0,407</i>
151	<i>Manuf.-45KtAu</i>	<i>0,007</i>	<i>0,220</i>	<i>0,306</i>
152	<i>Manuf.-65KtAu-35KtAu</i>	<i>0,034</i>	<i>0,059</i>	<i>0,121</i>
153	<i>Manuf.-65KtAu-35KtAu-65KtAu</i>	<i>-0,001</i>	<i>0,207</i>	<i>0,019</i>
		<i>Substance Wt</i>	<i>Substance wt%</i>	<i>Substance Amt%</i>
	<i>N-acetylglucosaminid terminal</i>			
154	<i>GlcNAcP-35KtAu-esp3</i>	<i>0,000</i>	<i>0,146</i>	<i>0,060</i>
155	<i>GlcNAcP-35KtAu-esp4</i>	<i>0,186</i>	<i>0,267</i>	<i>0,018</i>
156	<i>GlcNAcP-45KtAu-esp3</i>	<i>-0,008</i>	<i>0,232</i>	<i>-0,007</i>
157	<i>GlcNAcP-45KtAu-esp4</i>	<i>0,004</i>	<i>0,159</i>	<i>0,015</i>
158	<i>GlcNAcP-65KtAu-esp3</i>	<i>-0,005</i>	<i>0,132</i>	<i>0,146</i>
159	<i>GlcNAcP-45KtAu-esp4-esp2</i>	<i>0,006</i>	<i>0,138</i>	<i>0,483</i>
160	<i>GlcNAcP-45KtAu-35KtAu-35KtAu</i>	<i>-0,003</i>	<i>0,138</i>	<i>0,048</i>
161	<i>GlcNAcP-35KtAu-35KtAu-35KtAu</i>	<i>-0,001</i>	<i>0,118</i>	<i>0,026</i>
162	<i>GlcNAcP-20KtAu-35KtAu-35KtAu</i>	<i>-0,006</i>	<i>0,080</i>	<i>0,414</i>
163	<i>GlcNAcP-35KtAu-35KtAu-esp3</i>	<i>-0,015</i>	<i>0,126</i>	<i>0,341</i>

# ES 2 983 352 T3

348	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq2)</i>	-0,007	0,007	0,004
293	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq2)</i>	-0,020	0,133	0,278
283	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq2)</i>	-0,002	0,071	0,210
282	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq2)</i>	-0,001	0,103	0,351
253	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq2)</i>	-0,005	0,103	0,302
246	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq2)</i>	-0,009	0,123	0,303
245	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq2)</i>	-0,012	0,225	0,746
398	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq2)</i>	-0,015	0,067	0,076
602	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,005	0,124	0,175
503	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,001	0,230	0,511
505	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,007	0,129	0,091
524	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,007	0,189	0,150
438	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,001	0,230	0,230
426	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,003	0,095	0,062
425	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,001	0,113	0,227
420	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,009	0,089	0,045
381	<i>Desacido monomero de la glicerofosfatidil-4-GlcNAc</i>	-0,010	0,071	0,051
427	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,002	0,190	0,046
183	<i>6-O-Ser-GlcNAc</i>	0,014	0,184	0,591
183	<i>GlcNAc</i>	Same wt	Same wt	Same wt
183	<i>GlcNAc</i>	Same wt	Same wt	Same wt
146	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,016	0,065	0,121
114	<i>Gaq1-qGaq1-qGaq1</i>	-0,005	0,114	0,089
112	<i>Gaq1-qGaq1-qGaq1</i>	-0,002	0,080	0,573
164	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,010	0,136	0,564
165	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	0,005	0,262	0,075
166	<i>ObsA(q1-qGaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	0,007	0,156	0,181
249	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,014	0,060	0,110
243	<i>(Gaq1-qGaq1-qGaq1)</i>	-0,007	0,144	0,507

# ES 2 983 352 T3

190	<i>Closo-4-Alf-3P<sub>4</sub></i>	-0,001	0,104	0,069
191	<i>Closo-4-Alf-3P<sub>4</sub></i>	-0,016	0,130	0,094
492	<i>Closo-4-Alf-3P<sub>4</sub></i>	0,029	0,102	0,451
502	<i>Closo-4-Alf-3P<sub>4</sub></i>	-0,017	0,135	0,229
181	<i>C<sub>6</sub>A</i>	-0,005	0,193	-0,072
183	<i>6-O-C<sub>6</sub>A-3P<sub>4</sub>C<sub>6</sub>C</i>	0,000	0,244	0,026
193	<i>C<sub>6</sub>A-C<sub>6</sub>B<sub>3</sub>C<sub>6</sub></i>	0,013	0,121	0,184
198	<i>C<sub>6</sub>A-C<sub>6</sub>B<sub>3</sub>C<sub>6</sub>-4-C<sub>6</sub>P<sub>3</sub>C<sub>3</sub></i>	-0,002	0,220	0,361
	<i>S<sub>6</sub>A-B<sub>6</sub>W<sub>1</sub></i>	<i>S<sub>6</sub>A-S<sub>6</sub>A-B<sub>6</sub>W<sub>1</sub></i>	<i>S<sub>6</sub>A-S<sub>6</sub>A-B<sub>6</sub>W<sub>1</sub></i>	<i>S<sub>6</sub>A-S<sub>6</sub>A-B<sub>6</sub>W<sub>1</sub></i>
12A	Caracteres y síntesis de compuestos de bajo peso molecular			
12A	<i>Neocarboranato-4,3-d-O-metilo (Ne<sup>+</sup>)</i>	-0,001	0,087	0,156
13B	<i>Neocarboranato-4,3-O-metilo (Ne<sup>+</sup>)</i>	0,063	0,217	0,216
13C	<i>Neocarboranato-3,4,3,3,3,3-O-metilo (Ne<sup>+</sup>)</i>	-0,007	0,098	0,498
13D	<i>Neocarboranato-4,3,3,3,3,3-O-metilo (Ne<sup>+</sup>)</i>	-0,017	0,087	0,027
12E	<i>Neocarboranato-4,3,3,3,3,3-O-metilo (Ne<sup>+</sup>)</i>	-0,016	0,230	0,266
12F	<i>Neocarboranato-4,3,3,3,3,3-O-metilo (Ne<sup>+</sup>)</i>	0,001	0,283	0,532
12G	<i>M<sub>3</sub>A-3S-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-C<sub>6</sub>S</i>	-0,009	0,120	0,377
12H	<i>M<sub>3</sub>A-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S</i>	-0,002	0,219	0,239
12I	<i>M<sub>3</sub>A-3S-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S</i>	0,072	0,101	0,014
12J	<i>M<sub>3</sub>A-3S-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S</i>	-0,007	0,229	0,169
12K	<i>M<sub>3</sub>A-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S-S</i>	0,017	0,146	0,031
12L	<i>M<sub>3</sub>A-3S-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S</i>	-0,009	0,272	0,154
12M	<i>M<sub>3</sub>A-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S</i>	-0,004	0,075	0,471
12N	<i>M<sub>3</sub>A-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S-S (Data Bz-4S)</i>	0,001	0,125	0,166
12O	<i>M<sub>3</sub>A-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S (Data Bz-4S)</i>	-0,007	0,156	0,148
12P	<i>M<sub>3</sub>A-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S-S (Data Bz-4S)</i>	0,004	0,192	0,209
12A	<i>M<sub>3</sub>A-3S-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S-S (Data Bz-4S)</i>	-0,002	0,599	0,064
12B	<i>M<sub>3</sub>A-3S-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>S-S-S (Data Bz-4S)</i>	-0,001	0,167	0,226

# ES 2 983 352 T3

33C	AAA-3S-Catálogo-4S-05 (Webb Observatory)	0,381	0,132	0,087
33D	AAA-3S-Catálogo-4S-Delta-Delta-05	-0,007	0,115	0,087
33E	AAA-Gesamt-Delta-Delta-05	0,080	0,117	0,102
33F	AAA->2S-Catálogo	-0,147	0,092	0,125
33G	AAA->Catálogo	0,027	0,100	0,232
33H	AAA->Catálogo	0,012	0,143	0,418
33I	AAA->Catálogo	-0,011	0,143	0,048
33J	AAA->Catálogo	-0,009	0,151	0,178
33K	AAA->Catálogo	-0,003	0,160	0,494
33L	AAA->Catálogo	0,004	0,162	0,802
33M	AAA->Catálogo	0,017	0,179	1,058
33N	AAA->Catálogo	0,040	0,260	0,068
33O	AAA->Catálogo	0,159	0,135	0,070
33P	AAA->Catálogo	0,467	0,202	1,857
33Q	AAA->Catálogo	-0,016	0,219	0,239
33R	AAA->Catálogo	-0,009	0,455	0,446
33S	AAA->Catálogo	-0,004	0,398	0,446
33T	AAA->Catálogo	0,006	0,094	-0,004
33U	AAA->Catálogo	0,290	0,101	0,005
33V	AAA->Catálogo	-0,012	0,132	0,030
33W	AAA->Catálogo	-0,002	0,133	0,046
33X	AAA->Catálogo	0,005	0,149	0,058
33Y	AAA->Catálogo	0,007	0,264	0,060
33Z	AAA->Catálogo	0,016	0,075	0,084

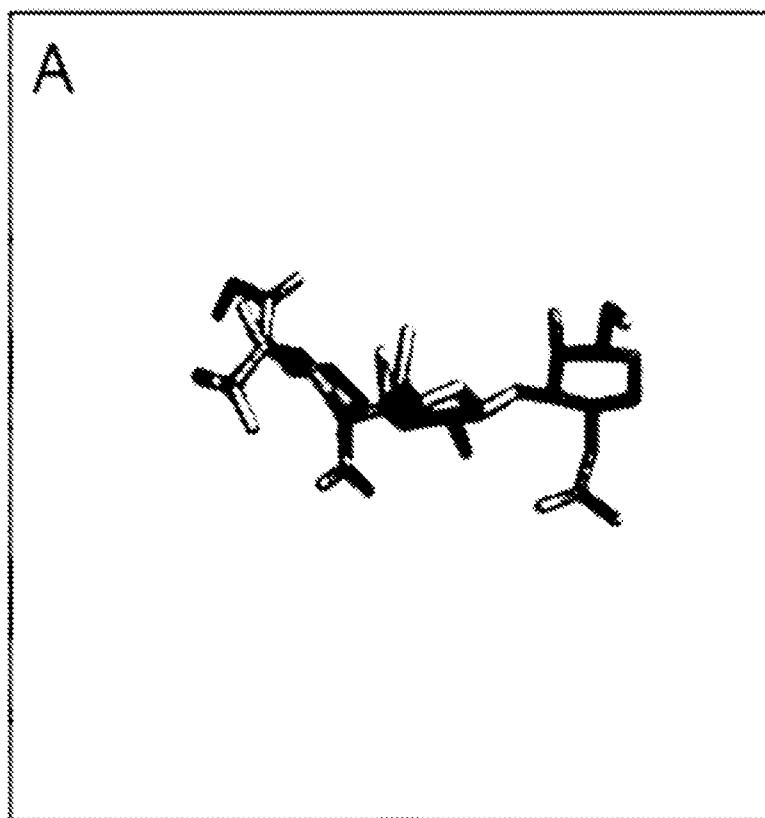
# ES 2 983 352 T3

143	$\lambda\lambda$ 210000 da 3,5 mag/au	0,586	0,082	0,104
144	$\lambda\lambda$ 1000000 da 3,5 mag/au	-0,0005	0,087	0,105
145	Saltos de frequencia magnitud	0,01278	0,053	0,106
146	Chancos 34-3	0,00477	0,094	0,110
147	Nº planetas complejos	Saltos WT	Saltos variante	Saltos variante
148	0,02051	0,095	0,112	
149	0,01818	0,088	0,113	
150	0,03915	0,099	0,126	
151	0,03848	0,101	0,135	
152	0,00745	0,103	0,134	
153	0,00316	0,103	0,136	
154	0,033284	0,103	0,172	
155	0,00056	0,104	0,175	
156	0,1E-05	0,105	0,175	

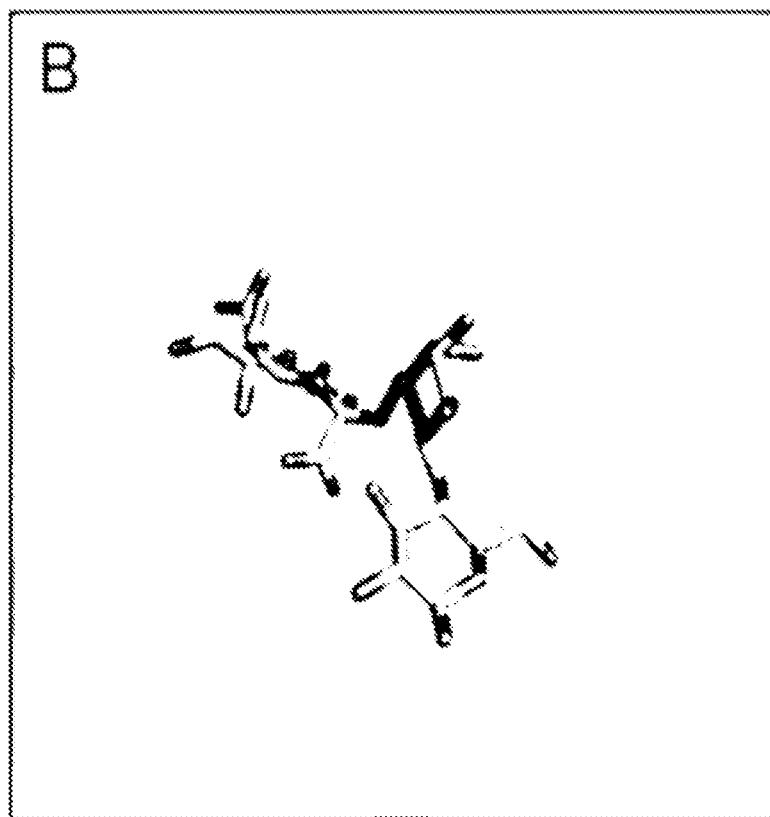
Los valores de planetas superiores a 1 indican una unión significativamente

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos TTSTE (SEQ ID NO:3), que comprende una delección de uno o más de los residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos TTSTE (SEQ ID NO:3), y en donde la proteína aislada o el fragmento de la misma es capaz de unirse a ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3y ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6.
- 5 2. La proteína aislada o fragmento de la reivindicación 1, que comprende una delección de al menos uno de los residuos subrayados de TTSTE (SEQ ID NO:3).
- 10 3. La proteína aislada o fragmento de la reivindicación 2, que comprende además una delección del residuo subrayado de TTSTE (SEQ ID NO:3).
- 15 4. La proteína aislada o fragmento de la reivindicación 2, que comprende una delección de los residuos subrayados de TTSTE (SEQ ID NO: 3).
- 20 5. La proteína aislada o fragmento de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en un 98 % en toda la longitud completa de SEQ ID NO: 1.
- 25 6. Un complejo molecular aislado que comprende la proteína aislada o el fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un glicano que comprende ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o un ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6.
7. El complejo molecular aislado de la reivindicación 6, en donde el glicano que comprende el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6 es expresado por una célula tumoral o por células sanguíneas felinas.
- 30 8. Una composición que comprende la proteína aislada o el fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. Un método para detectar el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6, en donde dicho método incluye el paso de combinar la proteína aislada o el fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición de la reivindicación 8 con una muestra para formar así un complejo detectable que comprenda la proteína aislada y el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6.
- 35 10. Un método para aislar un glicano o una célula que expresa el glicano, en donde el glicano comprende el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o un ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6, en donde dicho método incluye los pasos de: combinar la proteína o fragmento aislado de las reivindicaciones 1-5 o la composición de la reivindicación 8 con una muestra para formar así un complejo que comprenda la proteína o fragmento aislado y el glicano que comprende el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o el ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6; y aislar la proteína o célula.
- 40 11. Una proteína aislada o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o la composición de la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto para así dirigirse selectivamente a una célula cancerosa que exprese un ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6.
- 45 12. La proteína aislada o el fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o la composición de la reivindicación 8 para su uso en la detección de células tumorales que expresen ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-3 y/o ácido N-glicolilneuramínico ligado a α2-6.
- 50 13. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína aislada o el fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
14. Un constructo genético que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 13, opcionalmente en donde el constructo genético se encuentra en una célula hospedera.
- 55 15. Un kit que comprende la proteína aislada o el fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la composición de la reivindicación 8, el ácido nucleico aislado de la reivindicación 13 y/o el constructo genético de la reivindicación 14.

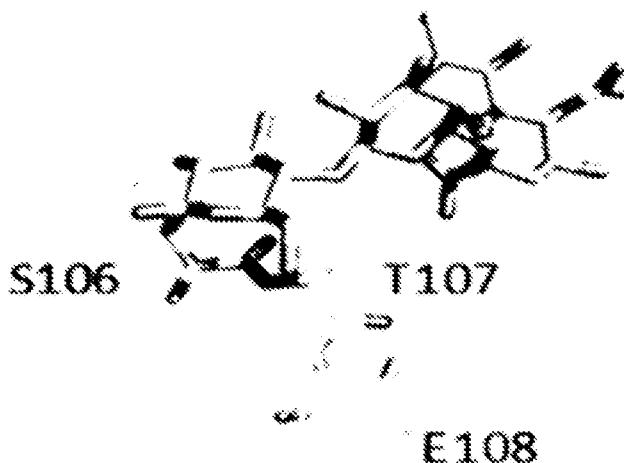


**Figura 1A**

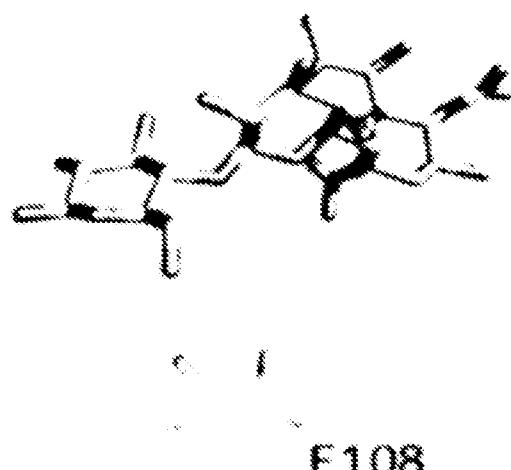


**Figura 1B**

Tipo silvestre

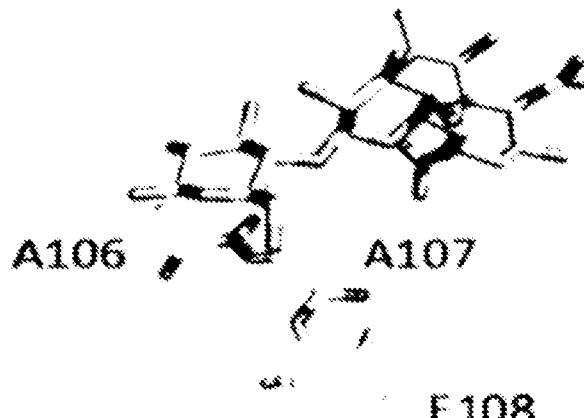


$\Delta S106/\Delta T107$



**Figura 2**

S106A/T107A



ΔS106/ΔT107/ε108D

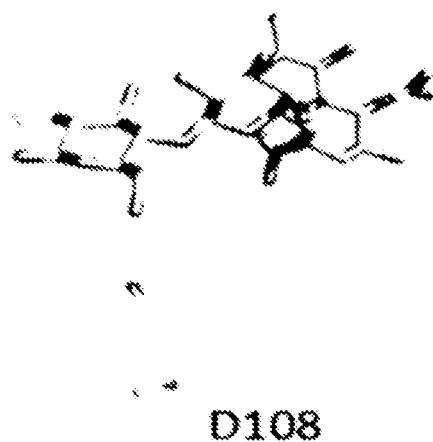
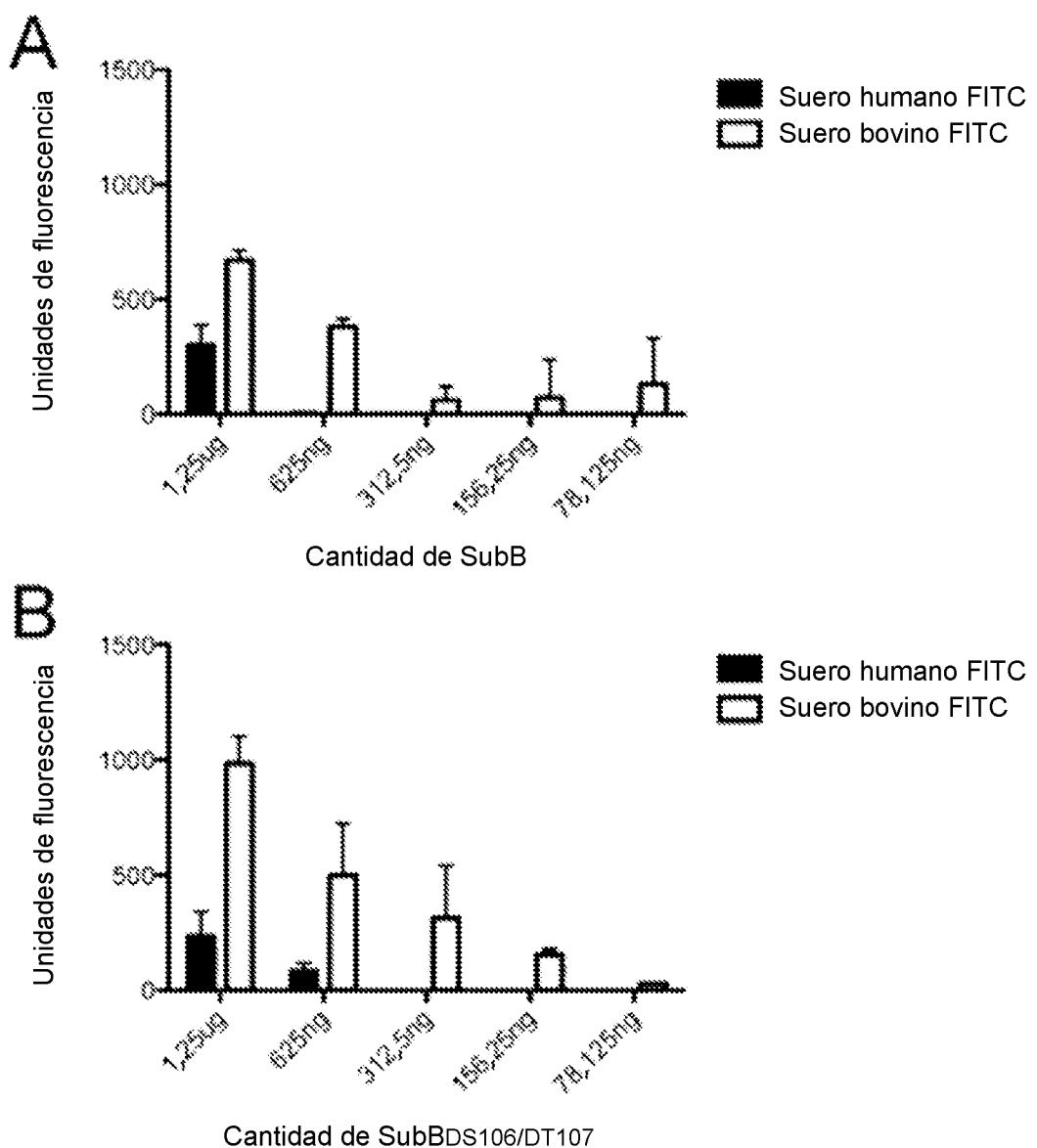
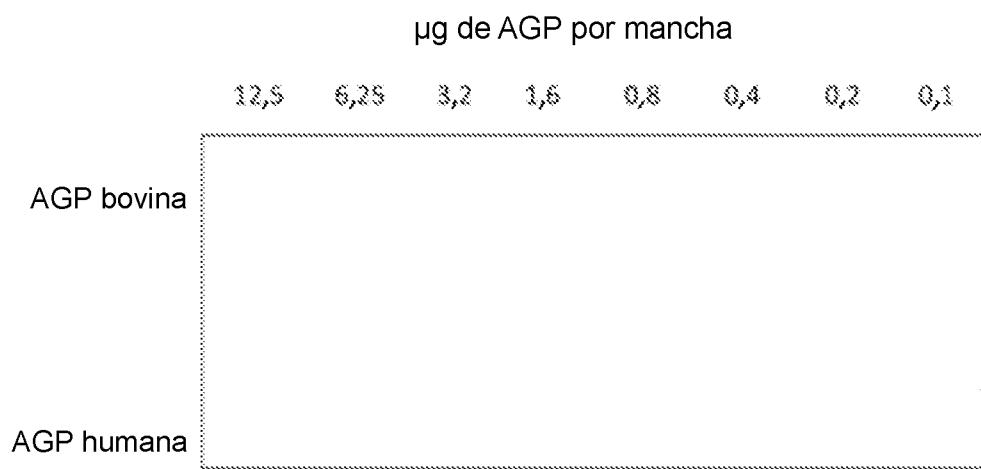
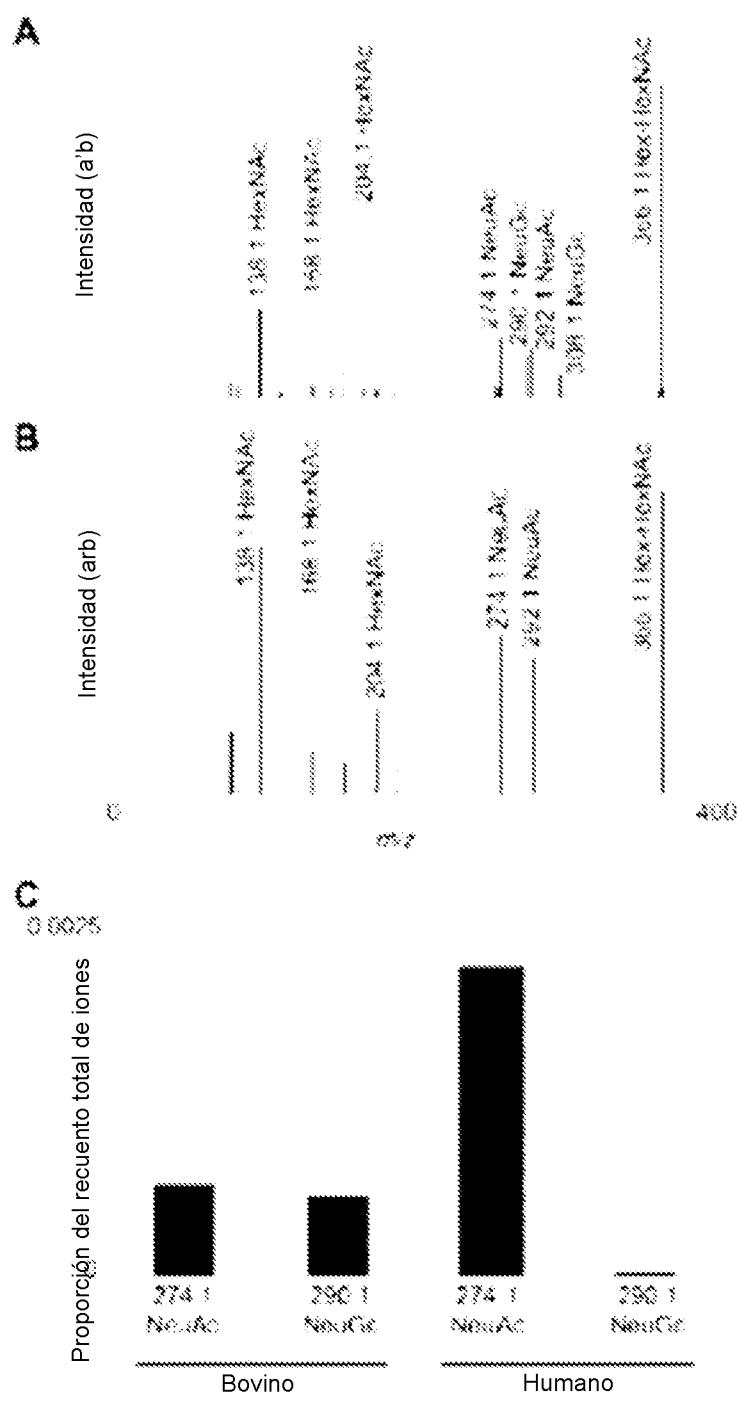


Figura 2 (continuación)

**Figura 3**



**Figura 4**



D

glicoproteína a1 ácida  
Bovina    Humana

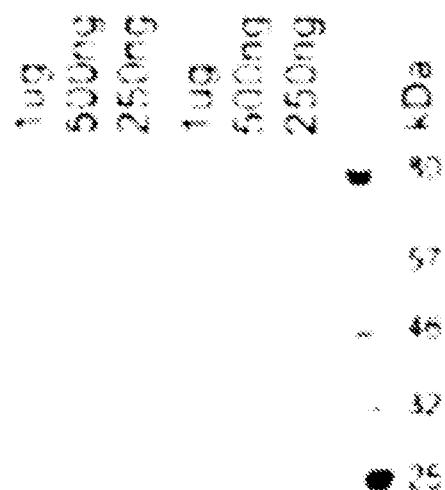
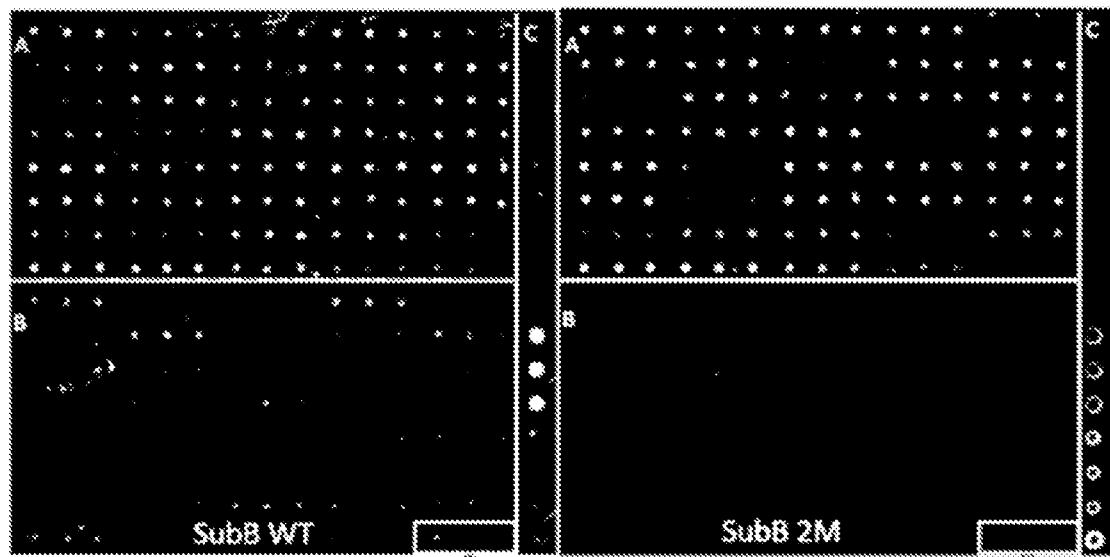


Figura 5D

ES 2 983 352 T3



**Figura 6**

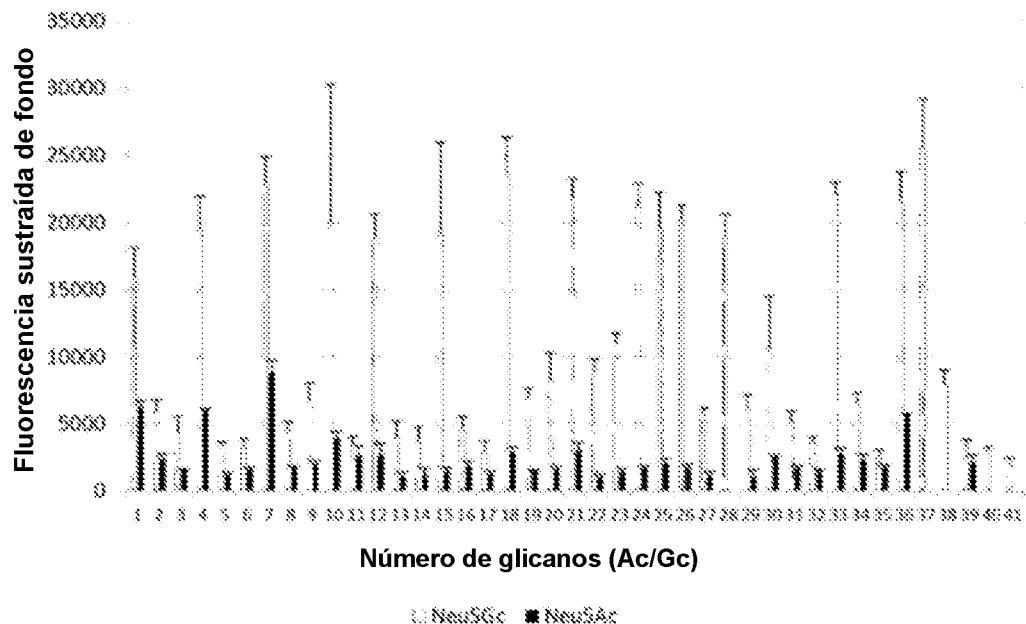
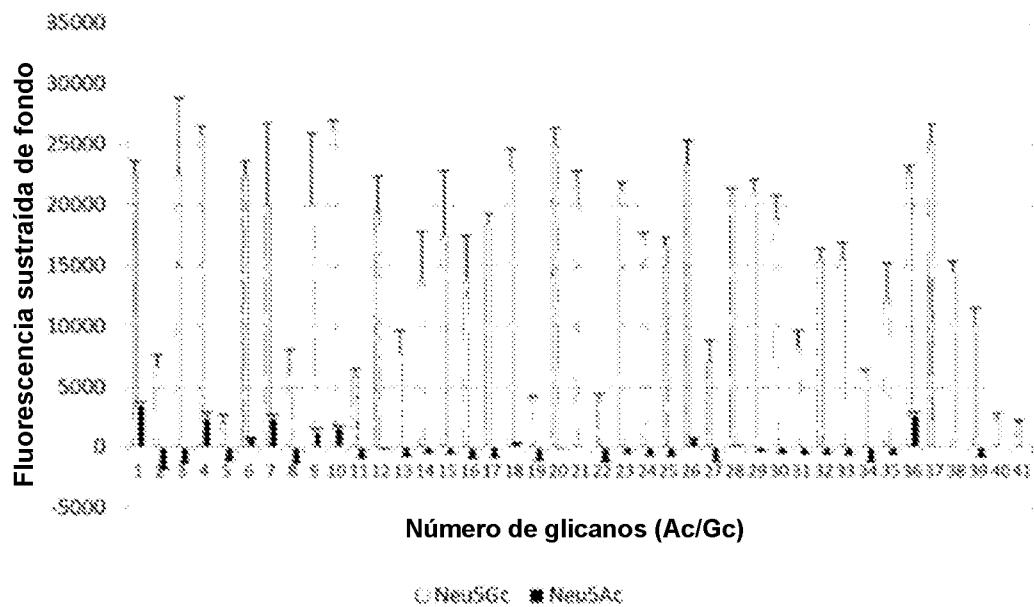


Figura 7

ES 2 983 352 T3



**Figura 8**

Glicanos Neu 5 Ac

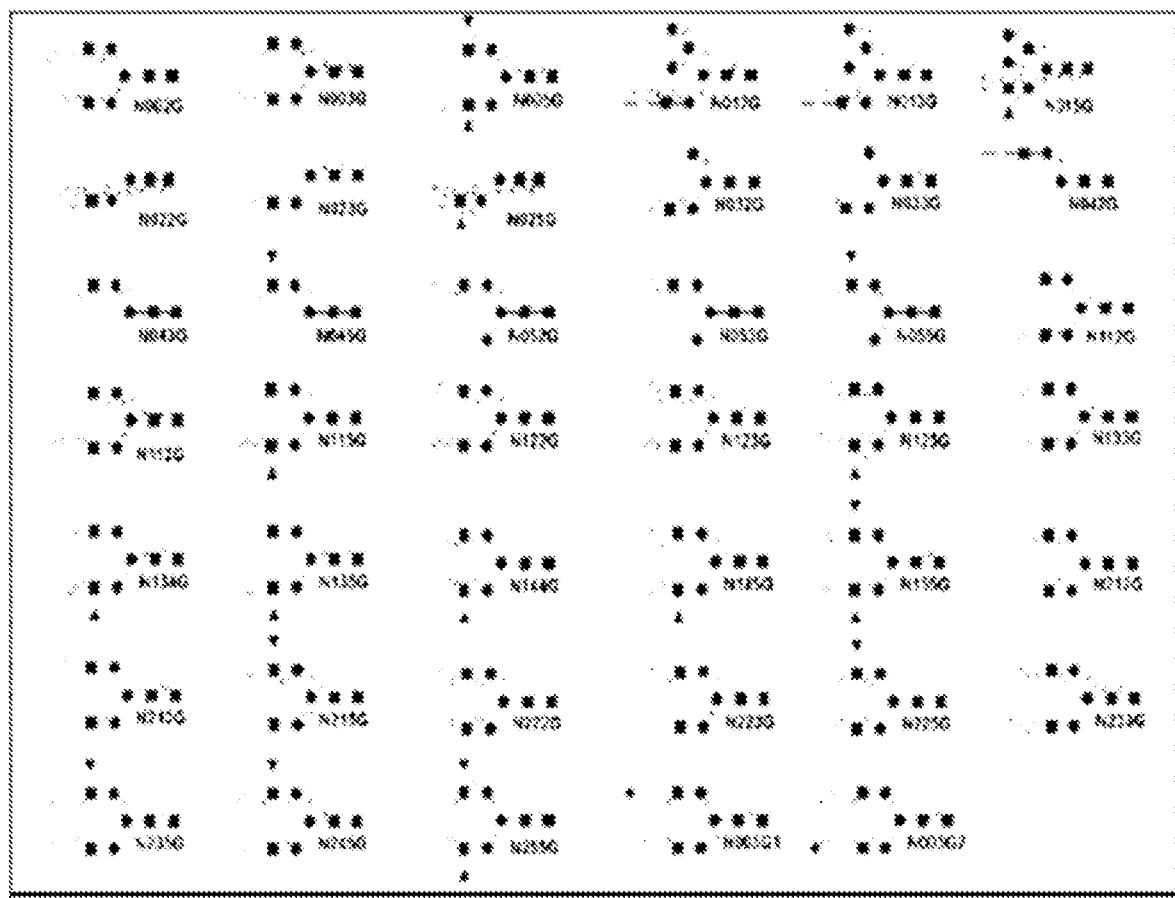
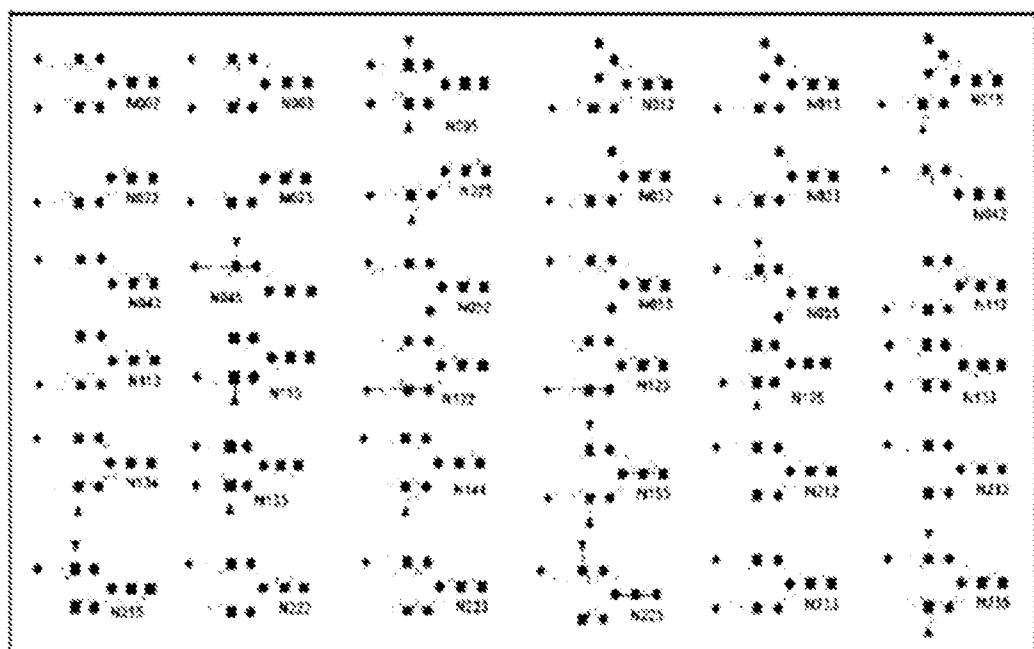


Figura 9

Glicanos Neu 5 Ac



Símbolos

- Man
- GlcNAc
- Gal
- ▲ LacNAc
- ♦ Neu5Ac
- △ Neu5Gc

Figura 9 (continuación)

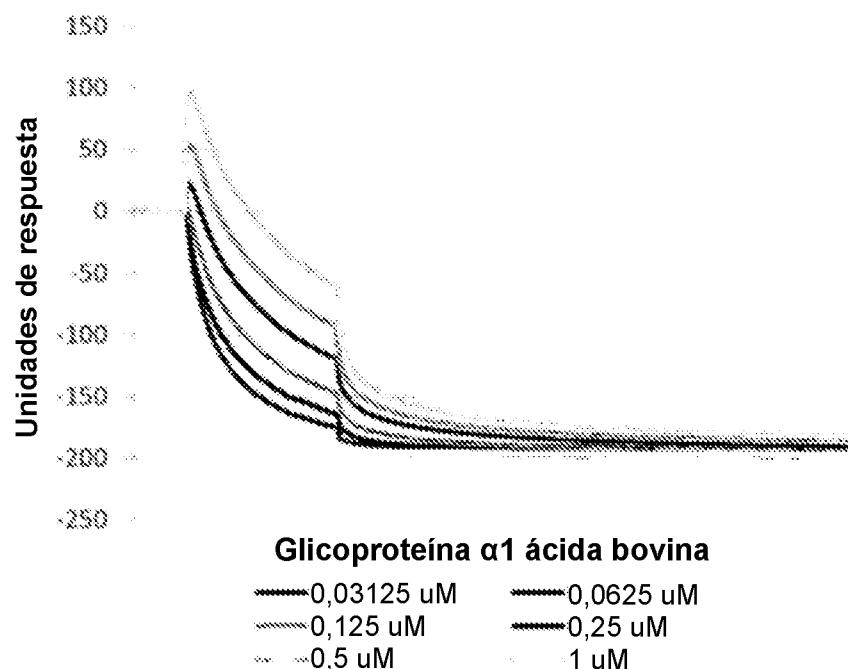
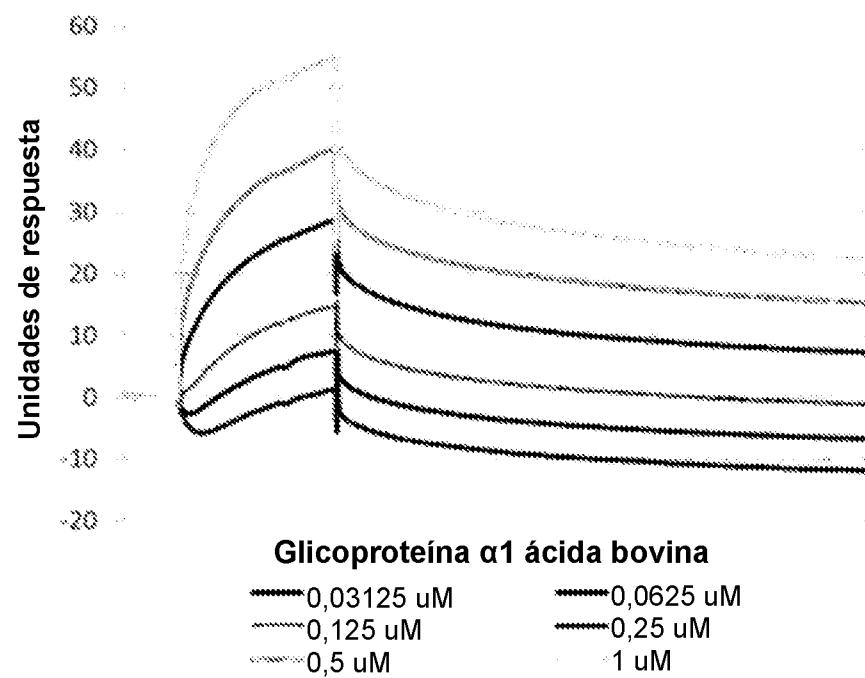


Figura 10



**Figura 11**