

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 943**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2019** **PCT/PT2019/000001**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2019** **WO19147152**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2019** **E 19702492 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** **EP 3743726**

54 Título: **Anticuerpo L2a5 o fragmento funcional del mismo contra antígenos tumorales**

30 Prioridad:

26.01.2018 PT 2018110526

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

22.11.2024

73 Titular/es:

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA (33.3%)

Campus de Campolide

1099-085 Lisboa, PT;

INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO

PORTO FG, EPE (33.3%) y

HELMHOLTZ-ZENTRUM DRESDEN-

ROSSENDORF INSTITUTE OF

RADIOPHARMACEUTICAL CANCER RESEARCH

(33.3%)

72 Inventor/es:

VIDEIRA, PAULA ALEXANDRA QUINTELA;

NOVO, CARLOS MANUEL MENDES;

LOUREIRO, LILIANA RAQUEL RODRIGUES;

CARRASCAL, MYLÈNE ADELAIDE DO ROSÁRIO;

FERREIRA, JOSÉ ALEXANDRE RIBEIRO DE

CASTRO;

PALMA, MARÍA ANGELINA DE SÁ;

SANTOS, LÚCIO LARA;

LIMA, LUÍS CARLOS OLIVEIRA;

CHAI, WENGANG y

BACHMANN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 988 943 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

Anticuerpo L2a5 o fragmento funcional del mismo contra antígenos tumorales

5 **Campo técnico**

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos funcionales, o una sonda de los mismos dirigidos contra un grupo de antígenos identificados en cáncer.

10 **Estado de la técnica**

El sialil Tn (STn) es un antígeno de O-glucano corto, un disacárido que consiste en ácido siálico enlazado a N-acetil galactosamina, es decir, Neu5Ac α -2,6GalNAc, que a su vez se O-enlaza a residuos de serina o treonina en una cadena de polipéptidos, en una configuración alfa a través del residuo GalNAc. Su relevancia tiene que ver con el hecho de estar ausente en tejidos sanos normales pero detectada en diferentes frecuencias en casi todo tipo de carcinomas (Julien, Videira, & Delannoy, 2012). Además, STn es una diana para células cancerosas metastásicas, resistentes a fármacos y altamente malignas. Sus características motivadoras incluyen:

1) asociación de la expresión de STn con oncogénesis y capacidad metastásica de células cancerosas humanas y células iniciadoras de cáncer (Okasaki *et al.*, 2012).

2) correlación de STn con un mal pronóstico en pacientes, con supervivencia total reducida y falta de respuesta a la quimioterapia (Choi *et al.*, 2000) y 3) evasión de la protección inmunitaria (Carrascal *et al.*, 2014).

Los ácidos alfa-2,6 siálicos son habitualmente biomarcadores de cáncer de terminación. Los O-glucanos alfa 2,6 sialilados cortos se sobreexpresan en varios tipos de cáncer. En general, se implican en la metástasis y progresión de cáncer. Además, pueden contribuir a la evasión inmunitaria a través de su reconocimiento por varios receptores inmunitarios tal como las proteínas de unión a ácido siálico (Siglecs) (Crocker, Paulson & Varki, 2007; Nicoll *et al.*, 2003).

Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas que se unen específicamente a biomarcadores de cáncer. Además de la identificación específica de las células tumorales, estos anticuerpos tienen el potencial de bloquear el reconocimiento de estos ligandos por los receptores de célula hospedadora, implicados en el mecanismo subyacente a la progresión tumoral, incluida la tolerancia inmunitaria.

Hay un número relevante de anticuerpos que se han aprobado para tratar a pacientes con cáncer (<https://www.cancer.org/>). Comprenden:

1. Anticuerpos monoclonales (mAb) que se dirigen a antígenos específicos (asociados) de cáncer. El mAb humanizado recombinante anti-HER2 trastuzumab (HerceptinTM) se describe en diferentes publicaciones científicas, por ejemplo, Cancer Res., 1998, 58: 2825-2831. Se dirige a los receptores HER2 expresados en casi 30 % de las pacientes con cáncer de mama. La patente WO0105425 describe una composición antitumoral que comprende una antraciclina alquilante acoplada al anticuerpo anti-HER2 trastuzumab. Sin embargo, estos tratamientos solo están disponibles para un número limitado de pacientes (30 % de las pacientes con cáncer de mama). También, las proteínas HER2 a las que se dirige el anticuerpo trastuzumab también se expresan en células normales relevantes, tal como células cardíacas, lo que explica la cardiotoxicidad asociada. La presente invención permite desarrollar anticuerpos recombinantes que se dirigen a una lista más amplia de receptores más allá de HER2, expresados por diferentes tipos de cáncer, que se decoran con STn o un grupo de glucanos terminados por ácidos alfa-2,6 siálicos. Esto permitirá potencialmente el desarrollo de terapias para un grupo más amplio de pacientes con cáncer. Puesto que tanto STn como los glucanos terminados por ácidos alfa-2,6 siálicos están altamente sobreexpresados por las células cancerosas, también tiene el potencial de mayor especificidad y toxicidad reducida.

2. MAb que bloquean las moléculas que detienen el funcionamiento de sistema inmunitario. Se llaman inhibidores de punto de control inmunitario e incluyen fármacos que bloquean CTLA-4, PD-1 y PD-L1. Ejemplos de inhibidores de PD-1 son Pembrolizumab (Keytruda) y Nivolumab (Opdivo) que están aprobados para tratar melanoma de piel, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cánceres de cabeza y cuello y linfoma de Hodgkin. Sin embargo, los puntos de control inmunitario no proporcionan una respuesta antitumoral inmediata y habitualmente, se usan como terapia adyuvante. También, los inhibidores de punto de control inmunitario pueden permitir que el sistema inmunitario ataque algunos órganos normales en el cuerpo, que puede provocar efectos secundarios graves en algunas personas.

3. MAb que bloquean la señalización celular necesaria para que las células cancerosas se dividan. Estos incluyen el Bevacizumab (Avastin®) que se dirige a VEGF que afecta el crecimiento de vasos sanguíneos y el Cetuximab (Erbix®), un anticuerpo que se dirige a una proteína celular llamada EGFR, que es importante para el crecimiento celular. Sin embargo, estos anticuerpos, que bloquean la señalización celular, también influyen en los mecanismos fisiológicos y se asocian con la toxicidad, tal como presión arterial alta, sangrado, coágulos sanguíneos y daño renal.

Hay algunos documentos de patente (EP 2014302 A1; WO 2015053871 A4; US 7423126 B2; EP 2993184 A1) que reivindican los ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos humanos para antígenos de carbohidratos asociados a tumores; sin embargo, ninguno de los anticuerpos dentro de los documentos de patente mencionados anteriormente reconoce el antígeno STn, que es la diana del anticuerpo de la presente invención.

La solicitud de patente EP2680004 (A2) reivindica los anticuerpos contra glucanos sialilados, incluido el antígeno STn que contiene ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) o ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc), en tanto que la presente invención se refiere a un anticuerpo que es específico para el antígeno STn principalmente con NeuAc y para un grupo de glucanos terminados por ácidos alfa-2,6 siálicos.

Las solicitudes de patente WO 1998046246 A1 y WO 1995029927 A3 reivindican métodos para producir glucos conjugados o glucósidos α -O-enlazados de antígenos de carbohidratos asociados a tumores, que incluyen el antígeno 2,6 sialil T. En tanto que se menciona la posibilidad de usarse para desarrollar anticuerpos para tratar cáncer, ninguna de estas solicitudes de patente proporciona una secuencia de anticuerpos para detectar el antígeno 2,6-sialil T, ni el grupo de antígenos que contienen ácido 2,6-siálico relacionados que son objeto de la presente patente.

Varias solicitudes de patente han reivindicado anticuerpos que se unen a residuos de ácido siálico, tal como CA 2743032 A1, que caracterizan un anticuerpo IgM que reconoce residuos de ácido siálico, incluido NeuGc, o US 20160184450 A1 y US 8148335 B2 que reivindican anticuerpos que se unen específicamente a un ácido siálico des-N-acetilado, o solicitudes de patente EP 2302390 A1 y US 20120142903 A1 que incluyen anticuerpos que reconocen la estructura de NeuGc; en tanto que, la presente invención reivindica un anticuerpo que reconoce no solo NeuAc unido a GalNAc (antígeno STn) sino también la estructura de NeuAc dentro de un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa-2,6-enlazados.

La solicitud de patente EP 2261255 A1 describió la producción de anticuerpos en pollos que reconocen el monosacárido NeuAc y la solicitud de patente US 20110034676 A1 reivindica la producción y purificación de anticuerpos policlonales contra las estructuras Neu5Ac y Neu5Gc. Sin embargo, la presente invención reivindica ácidos nucleicos que codifican para mAb producidos en ratón que se dirigen al antígeno STn de oligosacáridos y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa-2,6-enlazados. Esto es una ventaja, ya que la presente invención permitirá distinguir glucanos asociados a tumores, y no solo el monosacárido NeuAc, que también se expresa en células normales.

Además, la solicitud de patente US 2010/0034825 A1 reivindica la producción de anticuerpos contra la glucoproteína MUC1, usando la inmunización con glucopéptidos de repetición en tándem Tn- o STn-MUC1 largos. Este trabajo difiere de la presente invención, ya que la estructura objetivo es diferente, es decir, se dirige a la glucoproteína MUC1 y no a estructuras de glucano, STn ni glucanos terminados por ácidos siálicos alfa-2,6-enlazados.

Liliana Loureiro et al. "Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens", BIOMOLECULES, vol. 5, no. 3, 11 de agosto de 2015, páginas 1783-1809 se refiere al desarrollo de anticuerpos contra los antígenos de carbohidratos Tn y STn.

WO2017/040529A1 proporciona composiciones para terapias celulares adoptivas para cánceres que expresan el glucopéptido STn en TAG-72.

Los anticuerpos de patente WO2016057916A1 reconocen el antígeno STn y no los glucanos terminados por ácidos siálicos alfa-2,6-enlazados.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, los antígenos tumorales frecuentemente no son específicos de tumores debido a su expresión concurrente en células normales. Por lo tanto, las terapias objetivo habitualmente muestran toxicidad asociada debido a efectos fuera de diana. Los antígenos tumorales no son antígenos pan-tumorales y se limitan a tipos o grados específicos de cánceres. Por lo tanto, las terapias objetivo habitualmente se limitan a subconjuntos específicos de cánceres.

En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos funcionales, o sondas de los mismos dirigidos contra un grupo único de antígenos solo identificados en células cancerosas.

Es muy importante una secuencia de ácido nucleico única que permita producir un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos funcionales o una sonda de los mismos para dirigirse a glucanos sialilados tal como STn, 2,6-sialil T, disialil T y 2,6-sialo-N-acetilactosamina, que se sobreexpresan en diferentes tipos y subtipos de células cancerosas.

La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos que codifican para mAb contra STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa-2,6-enlazados. Estos antígenos son glucanos de cadena corta que se sobreexpresan en el cáncer pero que no son expresados por células normales. Estos antígenos también son ligandos para los receptores inmunitarios y amortiguan la actividad del sistema inmunitario contra las células tumorales, por lo que también se pueden considerar ligandos para los puntos de control inmunitario.

Descripción

El anticuerpo monoclonal (mAb) se refiere a un anticuerpo que se produce por un clon de células B individual. Los mAb también se pueden producir por un hibridoma, que es un híbrido entre una célula B y una célula de mieloma, o líneas de células que expresan ADN recombinante que codifica para la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina y por lo tanto, producirán un anticuerpo individual y específico.

Los anticuerpos se expresan en el medio extracelular y entonces se purifican a partir de allí.

La especificidad de un anticuerpo es su capacidad para reaccionar con un antígeno o un grupo de antígenos que comparten un cierto epítipo. Un epítipo, también conocido como determinante antigénico, es la parte de un antígeno que se reconoce por el anticuerpo.

Un anticuerpo pertenece a la clase de proteínas de inmunoglobulina y es un montaje de dos cadenas pesadas idénticas (~ 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras idénticas (~ 25 kDa). En el extremo amino de cada cadena pesada o ligera hay una secuencia de 100-130 aminoácidos que codifican para la región variable. En el extremo carboxilo de cada cadena pesada o ligera hay una secuencia que codifica para la región constante.

Cada anticuerpo se une dos veces al mismo antígeno, es decir, es bivalente.

El fragmento de unión a antígeno (Fab) es el fragmento de anticuerpo que se une a los antígenos. Cada Fab se compone de un dominio constante y uno variable de cada cadena pesada y ligera del anticuerpo. La región de fragmento cristizable (Fc) se compone de 2 o 3 dominios del extremo carboxi de las dos cadenas pesadas. En tanto que el Fab asegura la unión al antígeno, la región Fc asegura que cada anticuerpo genere una respuesta inmune efectora. La región Fc se une a diferentes receptores celulares, tal como receptores Fc y otras moléculas, tal como proteínas de complemento, mediando diferentes efectos fisiológicos que incluyen opsonización para facilitar la fagocitosis por fagocitos, lisis celular por células asesinas naturales y desgranulación de células cebadas, basófilos y eosinófilos.

El término "dominio variable" o "región variable" es la parte amino-terminal de las cadenas ligeras o pesadas de un anticuerpo que interactúa con el antígeno. Tiene una longitud de aproximadamente 120 a 130 aminoácidos en la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera. Las secuencias de cada una de las regiones variables son sustancialmente variadas, en particular en las regiones determinantes de complementariedad (CDR), responsables de la interacción con el antígeno específico. Las CDR se flanquean por regiones marco (FR) menos variadas. Las CDR de cada una de las cadenas ligera y pesada son tres. Las CDR L1, L2 y L3 están dentro de la cadena ligera. Las CDR H1, H2 y H3 están dentro de la cadena pesada.

La expresión "fragmento o sonda de anticuerpo funcional" es una parte del anticuerpo que incluye la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo, o incluye la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera del anticuerpo. El fragmento o sonda de anticuerpo funcional retiene la mayor parte o toda la actividad de unión del anticuerpo inicial del cual se derivó el fragmento o sonda. Estos fragmentos o sondas de anticuerpos funcionales pueden incluir el Fv de cadena individual (scFv), diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo y minicuerpo.

El término "secuencias de nucleótidos" se refiere a una secuencia de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos.

La secuencia de nucleótidos se puede transcribir para producir ARNm, que entonces se traduce en un polipéptido y/o un fragmento del mismo.

El tratamiento potencial derivado de la presente invención se refiere al uso en el tratamiento, manejo o mejora de una enfermedad asociada con la expresión de STn o un grupo de glucanos alfa-2,6 sialilados. En las presentes realizaciones, un posible tratamiento se refiere a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o sonda derivada de la invención, en su forma nativa o modificada.

También se puede incluir un posible tratamiento en la presente invención en combinación con un agente que se conoce que es útil para, o se ha usado o se está usando actualmente para el tratamiento, manejo o mejora de una enfermedad.

- 5 El uso potencial como agente de diagnóstico se refiere a una sustancia que cuando se administra a un sujeto ayudará en el diagnóstico de una enfermedad. Estas sustancias se pueden usar para detectar y/o definir la localización de una enfermedad de un proceso que se deriva de la progresión de la enfermedad. También incluye una sustancia que puede ayudar a predecir la respuesta a un cierto tratamiento o el pronóstico de una enfermedad. En ciertas realizaciones, el uso de un agente de diagnóstico implica la conjugación del anticuerpo o fragmento o sonda de anticuerpo funcional de la presente invención con una molécula indicadora, tal como fluorescencia, enzima o anticuerpo secundario.

- 15 El sialil Tn, también conocido como, STn, sialosil Tn, Tn sialilado, Neu5Ac- α 2, 6GalNAc α -O-Ser/Thr o también referido como CD175s por la nomenclatura de "cúmulo de diferenciación" es el O-glucano tipo mucina sialilado más simple. El STn es un O-glucano truncado que contiene un ácido siálico (Neu5Ac) α -2,6 enlazado (mediante carbono 6) a N-acetil-galactosamina (GalNAc) alfa-O-enlazado a una serina/treonina (Ser/Thr) (Neu5Ac- α 2, 6GalNAc α -O-Ser/Thr). La sialilación evita la formación de diferentes estructuras núcleo que de otro modo se encontrarían en los O-glucanos tipo mucina.

- 20 STn se asocia con un resultado adverso y mal pronóstico en pacientes con cáncer. La biosíntesis del antígeno STn se ha relacionado con la expresión de la sialiltransferasa ST6GalNAc1 y con mutaciones o pérdida de heterocigosidad del gen *COSMC*.

- 25 STn se expresa en más de 80 % de los carcinomas humanos y se relaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer.

- La invención proporciona secuencias de nucleótidos que codifican para una cadena pesada o ligera de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo funcional o una sonda del mismo, donde la cadena pesada o ligera de anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional o sonda del mismo codificado por la secuencia de nucleótidos de la invención tiene una o más de las CDR enumeradas en las tablas 1 y 2. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional o sonda del mismo que incluye una o más de las CDR puede unirse específicamente a STn o un grupo de glucanos alfa-2,6 sialilados. La unión específica incluye la especificidad, afinidad y/o avidéz como se proporciona en el ejemplo I.

- 35 En otro aspecto, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo codificado por los polinucleótidos de la invención puede incluir la actividad de citotoxicidad dependiente de complemento y/o actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

- 40 El método para la producción del anticuerpo de la invención puede incluir la fusión entre dos células que producen un hibridoma, introducción de una secuencia de nucleótidos de la invención en una célula hospedadora, cultivo de la célula hospedadora bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para producir la cadena pesada y/o ligera codificada de un anticuerpo o fragmento funcional de la invención, y la purificación de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo o fragmento funcional.

- 45 La expresión recombinante de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional o sonda del mismo de la invención que se une a STn o un grupo de antígenos alfa-2,6 sialilados puede incluir la construcción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional o sonda del mismo de la invención.

- 50 El vector se puede producir por tecnología de ADN recombinante. Estos vectores también pueden incluir otras secuencias de nucleótidos codificadoras, que originan una secuencia quimérica. Por ejemplo, puede incluir la secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de la molécula de anticuerpo (WO 86/05807 y WO 89/01036) que permite la expresión de una proteína quimérica que contiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o sonda del mismo de la presente invención seguido de toda la cadena pesada, o y ligera, o tanto toda la cadena pesada como ligera.

- 55 El vector de expresión se puede transferir a una célula hospedadora por técnicas de transfección/transducción y las células resultantes producen el anticuerpo o fragmento funcional del mismo de la invención. Por lo tanto, la invención incluye células hospedadoras que contienen secuencias de nucleótidos que codifican para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional o sonda del mismo de la invención.

La célula hospedadora se puede elegir para modificar las características del producto derivado de las secuencias de nucleótidos insertadas.

En una realización, estas células hospedadoras pueden adicionar sitios de glucosilación o fosforilación u otras modificaciones a las proteínas codificadas. En otra realización, las células hospedadoras pueden proporcionar el procesamiento correcto y tráfico/secreción celular de las proteínas.

Un anticuerpo variable de fragmento de cadena individual (scFv) se refiere a un fragmento de anticuerpo funcional que contiene solo las regiones VL y VH, que se unen mediante un ligador, formando un sitio de unión a antígeno monovalente. Los diacuerpos, tribocuerpos y tetracuerpos son anticuerpos que incluyen dímeros, trímeros o tetrámeros de scFv, es decir, que contienen dos, tres y cuatro cadenas de polipéptidos, respectivamente, y que forman dos, tres y cuatro sitios de unión a antígeno, respectivamente, que pueden ser los mismos o diferentes.

El anticuerpo resultante, los fragmentos de anticuerpos funcionales o las sondas de los mismos de esta invención pueden tener uno o más sitios de unión. Si contiene más de un sitio de unión, estos sitios pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. En caso de dos sitios de unión diferentes, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o sonda se nombra anticuerpo "biespecífico".

La mutagénesis dirigida al sitio y mediada por PCR que da por resultado sustituciones de aminoácidos se puede usar para introducir mutaciones en las regiones CDR que mejoran la afinidad, en tanto que se conserva la especificidad del anticuerpo de la invención.

En algunas realizaciones, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o sonda de la invención se conjuga o fusiona con uno o más agentes de diagnóstico, o agente terapéutico o cualquier otra molécula deseada. El anticuerpo conjugado, fragmento de anticuerpo funcional o sonda resultante puede ser útil para monitorear o diagnosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o severidad de una enfermedad asociada con la expresión de STn o glucanos alfa-2,6 sialilados.

Como ejemplo, pero no limitado a, el anticuerpo se puede conjugar con un agente terapéutico para inducir la muerte celular u otro efecto. Un agente terapéutico puede ser un fármaco quimioterapéutico; un taxano; un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un agente antimitótico, una hormona, un análogo de nucleósido, un inhibidor de cinasa, un ion metálico radiactivo, una toxina, una citocina o un agente antiangiogénico.

El anticuerpo o fragmento funcional de la invención también se puede usar para detectar la expresión de STn o glucanos alfa-2,6 sialilados en cualquier muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos o inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA), citometría de flujo e inmunotransferencia.

El anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o sonda del mismo de la invención se puede incluir solo o conjugado o en combinación en una composición farmacéutica, proporcionada en una concentración efectiva, para ejercer un efecto terapéuticamente útil, con efectos secundarios mínimos.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones 1-15.

La presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo, como se reivindica, que se une específicamente a sialil Tn (STn) y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa 2,6-enlazados.

El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo funcional del mismo, se une al sitio de unión a antígeno. Un ejemplo de secuencias de nucleótidos que codifican para las cadenas pesada y ligera variables, son SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente.

El anticuerpo se obtuvo después de la inmunización de ratones con mucinas que contienen sialil Tn (STn). Las secuencias de nucleótidos se derivaron del anticuerpo monoclonal L2A5. Una secuencia de nucleótidos proporciona la cadena pesada variable (VH) (SEQ ID NO. 1) y comprende la H-CDR1 (GGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTAC, SEQ ID NO. 12 de aminoácidos), H-CDR2 (ATAAAGTACGACGGTAGCAAT, SEQ ID NO. 14 de aminoácidos) y H-CDR3 (GCAAGAGGGGGGGACTAC, SEQ ID NO. 16 de aminoácidos). Una secuencia de nucleótidos proporciona una cadena ligera variable (VL) (SEQ ID NO. 2) que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR): L-CDR1 (TCAAGTGTAAGTTAC, SEQ ID NO. 6 de aminoácidos), L-CDR2 (GACACATCC, SEQ ID NO. 8 de aminoácidos), y L-CDR3 (CAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCCATGCTCAGC, SEQ ID NO. 10 de aminoácidos).

La combinación de la L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 de la cadena ligera y la H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 de la cadena pesada genera secuencias únicas que codifican para secuencias peptídicas que reconocen no solo el antígeno STn disacárido, sino que inesperadamente, también reconoce un grupo de glucanos terminados por ácidos alfa-2,6 siálicos también sobreexpresados en cáncer. Estas secuencias peptídicas se usan para generar

anticuerpos adicionales, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas. Este grupo total de glucanos reconocidos por los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas comprende el

Sialil Tn:

NeuAc α -6GalNAc α β 1-

2,6-sialil T:

Gal β 1-3GalNAc α 1-

|

NeuAc α 2-6

disialil T:

NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-

|

NeuAc α 2-6

2,6-sialo-N-acetil-lactosamina:

NeuAc α 2-6Gal β 1-4Glc β 1-

Los anticuerpos con esta especificidad son particularmente interesantes debido a su alta especificidad tumoral y su baja o nula reactividad a las células normales, a diferencia de los anticuerpos actuales y las terapias anti-cáncer basadas en anticuerpos.

El polinucleótido aislado como se divulga en la presente también puede incluir una secuencia de ácido nucleico proporcionada en la presente, donde la secuencia de ácido nucleico codifica para el dominio de cadena pesada y ligera variable del anticuerpo, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas. Los ejemplos de la secuencia de ácido nucleico son SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo, como se reivindica, que se une específicamente a STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa 2,6-enlazados para usarse en medicina, o para usarse en el tratamiento de cáncer, incluido un método para detectar un tumor en un sujeto.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo, o fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo, como se reivindica, y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención puede proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas que bloquean las interacciones célula-célula o receptor-ligando.

La invención proporciona una composición farmacéutica de la invención como se reivindica para usarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad en un sujeto en necesidad, cuyo tratamiento puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de la invención.

Esta divulgación presenta dibujos anexos de realizaciones ilustradas para una comprensión más fácil.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el título y unión del anticuerpo L2A5 a mucinas animales usando ELISA indirecto. La titulación de anticuerpos se realizó usando diferentes concentraciones de recubrimiento de mucinas submaxilares bovinas (BSM) previamente tratadas o no con sialidasa. Se usó amortiguador de fosfato como control negativo y unión del anticuerpo anti-STn B72.3 a BSM como control positivo. Se detectó la unión de mAb L2A5 con IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante.

La figura 2 muestra la unión de L2A5 a la superficie celular de células tumorales. La unión del anticuerpo L2A5 se valoró por citometría de flujo y usando líneas de células cancerosas transducidas o no (tipo silvestre) con el gen ST6GalNAc1 y por lo tanto, sobreexpresan el antígeno STn. La figura muestra un histograma representativo del conteo celular relativo del anticuerpo L2A5 en la línea de células de cáncer de mama STn positivo y WT MDA-MB-231. Se usaron anticuerpos 3F1 (anticuerpos anti-STn) o el anticuerpo secundario anti-Ig de ratón-FITC (perfil gris). Para valorar la especificidad de unión a antígenos

sialilados, las líneas de células que expresan STn se desialilaron por tratamiento con sialidasa. Las líneas continuas y discontinuas representan los histogramas para sialidasa no tratada y la célula tratada, respectivamente. El eje X representa la fluorescencia, relacionada con la expresión de STn.

La figura 3 muestra la reactividad del anticuerpo L2A5 a proteínas unidas a membrana y a mucina 1 humana recombinante (MUC1). Análisis de transferencia Western de anticuerpos anti-STn 3F1 y L2A5 que se unen a extractos de membrana de la línea de células MDA-MB-231 que expresa STn y a la proteína quimérica de MUC1 fuertemente decorada con STn más la región Fc de Ig humana. Los extractos de membrana MDA-MB-231 STn⁺ (A) y la proteína quimérica MUC1 STn-IgG (B) se tiñeron con anticuerpos 3F1 y L2A5. Además de la transferencia de extractos de membrana no tratados y proteína quimérica (NT), las muestras de extractos de membrana se desialilaron usando sialidasa (T) o se usó proteína MUC1 STn-IgG no glucosilada (Ung).

La figura 4 muestra la reactividad del anticuerpo L2A5, medida por inmunohistoquímica en cánceres de vejiga incrustados en parafina a) La tinción de L2A5 (izquierda) presenta una alta extensión y fuerte intensidad, en tanto que los mAb B72.3 (medio) y TKH2 (derecha) que se unen solo a STn, muestran menos sensibilidad, transducidos a baja intensidad y extensión reducida de la tinción específica. b) Sensibilidad de L2A5 en comparación con los anticuerpos disponibles. L2A5 (izquierda) reconoce una cantidad reducida de antígeno (flechas), a diferencia de B72.3 (centro) y TKH2 (derecha) que presentan diferente reactividad en las mismas regiones. c) Efecto del tratamiento con sialidasa de tejidos cancerosos en la reactividad de anticuerpos. Después del tratamiento con sialidasa e incubación con L2A5, la tinción otorgada por L2A5 desaparece por completo. Izquierda: sin sialidasa; Derecha: con sialidasa.

La figura 5 muestra la reactividad del anticuerpo L2A5, medida por inmunohistoquímica en cánceres colorrectales incrustados en parafina. La figura muestra la reactividad de L2A5 en comparación con los anticuerpos contra el antígeno STn. L2A5 (izquierda) presenta reactividad incrementada en términos de extensión e intensidad en comparación con la reactividad de B72.3 (centro) y TKH2 (derecha).

La figura 6 muestra la reactividad del anticuerpo L2A5, por inmunohistoquímica en cánceres de vejiga incrustados en parafina. Las figuras muestran evidencias inmunohistoquímicas de alta especificidad del anticuerpo L2A5 en comparación con los anticuerpos anti-STn B72.3 y TKH2, a) - Especificidad tumoral de L2A5 en la muestra de cáncer de vejiga metastásico. L2A5 está presente principalmente en las células tumorales (flechas), no existe tinción en la población linfocítica, vasos y tejidos conectivos. b) - reactividad de los anticuerpos L2A5 (izquierda) y B72.3 (derecha) en tejidos colorrectales normales. L2A5 presenta reactividad débil con enterocitos (flecha, izquierda) en tanto que B72.3 reacciona con células caliciformes (derecha).

La figura 7 muestra las secuencias de antígeno de glucano unidas por el anticuerpo L2A5. La especificidad de glucano se determinó por medio del análisis de micromatrices de glucanos.

La figura 8 muestra la capacidad antitumoral *in vivo* de un módulo diana (TM) compuesto de una porción que contiene aminoácidos codificados por los ácidos nucleicos de L2A5, objeto de la presente invención. El TM derivado de L2A5 es un fragmento de anticuerpo y tiene la misma reactividad que el L2A5, es decir, TM anti-STn. La aniquilación de las células positivas para STn mediante las células T UniCAR fue específica de diana y estrictamente dependiente de la presencia de TM.

La figura 9 muestra la capacidad antitumoral *in vivo* de un módulo diana (TM) compuesto de una porción que contiene aminoácidos codificados por los ácidos nucleicos de L2A5, objeto de la presente invención. El TM derivado de L2A5 es un fragmento de anticuerpo y tiene la misma reactividad que el L2A5, es decir, TM anti-STn. La transferencia adoptiva de las células T anti-STn TM y UniCAR (Koristka et al 2014) a un modelo animal que expresa tumores STn⁺ muestra erradicación efectiva y dependiente de TM de tumores positivos para STn. La figura 8 muestra que el uso de células T UniCAR armadas con TM específicos para el antígeno STn aniquila las células tumorales. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA unidireccional con prueba de comparación múltiple de Bonferroni (**p<0.01).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo, como se reivindica, que se une específicamente a STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa 2,6-enlazados.

El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo funcional del mismo, se une al sitio de unión a antígeno. Un ejemplo de secuencias de nucleótidos que codifican para las cadenas pesada y ligera variables, son SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente.

El polinucleótido aislado como se divulga en la presente también puede incluir una secuencia de ácido nucleico proporcionada en la presente, donde la secuencia de ácido nucleico codifica para el dominio de cadena pesada y ligera variable del anticuerpo, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas.

5 La presente invención proporciona además composiciones como se reivindican. Estas se pueden usar para producir un anticuerpo, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas de los mismos que se unen específicamente a STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa 2,6-enlazados.

10 Las composiciones incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o sondas. Las composiciones incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para las cadenas pesada y ligera variables.

15 El polinucleótido aislado como se divulga en la presente también puede incluir una secuencia de ácido nucleico proporcionada en la presente, donde la secuencia de ácido nucleico codifica para el dominio de cadena pesada y ligera variable del anticuerpo, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas.

La invención puede proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican para el anticuerpo, o fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo, como se reivindica y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 El método comprende los siguientes pasos:

25 a) Teñir una muestra biológica obtenida de un sujeto que posiblemente tiene un tumor con un anticuerpo que se une específicamente a STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa 2,6-enlazados, en el cual la tinción mencionada se realiza bajo condiciones adecuadas para la unión específica del anticuerpo, o fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas de los mismos a STn, 2,6-sialil T, disialil T o 2,6-sialolactosamina;

30 b) Y donde la presencia o ausencia de la unión del anticuerpo es indicativa de la presencia o ausencia de células tumorales que expresan STn de superficie celular, 2,6-sialil T, disialil T o 2,6-sialolactosamina.

La muestra biológica, como se usa en la presente, comprende células aisladas, o tejido, o proteínas derivadas de tumor.

35 Los glucanos sialilados se sobreexpresan en varios tipos de células cancerosas en comparación con las células sanas coincidentes, donde su expresión fue insignificante. Las frecuencias más altas de STn se encuentran en los cánceres de páncreas, colorrectal y ovario, donde casi 100 % de las células cancerosas expresan STn (Julien et al 2012). La frecuencia en los cánceres de vejiga es 75 % (Ferreira et al 205). El adenocarcinoma de pulmón expresa casi 80 % y el cáncer de cuello uterino, colangiocarcinoma, cáncer de esófago, colon y mama tienen frecuencias entre 50 y 70 %. Además, la sobreexpresión de STn se presenta antes en la carcinogénesis y la pérdida de diferenciación celular, que frecuentemente participa en una clasificación de alto grado histológico, modula positivamente la expresión de STn (Julien et al).

45 Los glucanos sialilados pueden ser dirigidos por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas con alta afinidad y especificidad. La presente invención proporciona además composiciones para producir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas que se unen a STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos alfa-2,6 siálicos.

50 Estas composiciones se obtuvieron por inmunización de ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad con mucinas séricas ovinas, usando métodos tal como aquellos descritos en el ejemplo I.

Se seleccionó suero de ratones que muestra reactividad para líneas de células positivas para STn, mucinas positivas para STn o productos lisados celulares, por medio de los métodos, tal como aquellos descritos en los ejemplos II o III o VI. Los esplenocitos de aquellos ratones inmunizados que muestran suero con reactividad para STn, se cosecharon y fusionaron con una célula de mieloma (Sp2/0) para obtener una célula de hibridoma inmortalizada que expresa anticuerpos.

Los métodos para la técnica de hibridoma, tal como los descritos en el ejemplo IV se describen bien en la técnica.

60 Los sobrenadantes de hibridoma se examinaron para la presencia de anticuerpos contra STn por métodos, tal como aquellos descritos en los ejemplos II o III o VI. Los hibridomas seleccionados se expandieron para la producción y caracterización de anticuerpos. De los varios mAb anti-STn obtenidos, el mAb L2A5 se seleccionó como candidato principal y se usó para análisis adicional. Se determinó la reactividad contra proteínas de mucina con un alto contenido de STn y el título de anticuerpos de mAb L2A5 al usar métodos como se describe en el ejemplo II y se representa en la figura 1. Además, se realizó la desialilación por medio del tratamiento con sialidasa para valorar el reconocimiento de estructuras sialiladas por el anticuerpo L2A5. Como se muestra en la figura 1, la

reactividad del mAb L2A5 incrementa con las concentraciones de mAb de manera logarítmica. Se observó una alta inmunorreactividad a BSM, alcanzando el título de punto final de 6 000. Además, el tratamiento con sialidasa demostró claramente una reducción de la reactividad de este anticuerpo a BSM, mostrando la unión específica y dependiente a estructuras sialiladas. Cabe destacar que, en métodos similares a aquellos descritos en el ejemplo II, pero donde las proteínas de mucina que portan STn se reemplazaron por mucinas desialiladas (asialo), el anticuerpo L2A5 no mostró reactividad.

Los glucanos sialilados se sobreexpresan en células cancerosas y pueden ser dirigidos por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas con alta afinidad y especificidad.

La presente invención proporciona composiciones para producir un anticuerpo, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas de los mismos que se unen a STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos alfa-2,6 siálicos.

La glucosilación es fundamental para la calidad y desarrollo de mAb terapéuticos. Los patrones de glucosilación cambian con el sistema de expresión seleccionado o las condiciones de cultivo con un impacto significativo en su farmacocinética y farmacodinámica. Por lo tanto, el control de la glucosilación es esencial para asegurar la seguridad y eficacia de las moléculas. Para el direccionamiento terapéutico de células cancerosas, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y apoptosis directa de células son fundamentales para la eficacia.

Los mAb producidos en la línea de células de mieloma murino SP2/0 pueden adicionar azúcares que no se encuentran naturalmente en la IgG humana normal con impacto en términos de inmunogenicidad.

Los cambios en la composición de glucanos de la molécula de IgG se pueden realizar en los sitios de glucosilación Asn88 y Asn297 a través de la manipulación de los residuos de manosa, ácidos siálicos, fucosa y galactosa a fin de incrementar la eficacia del anticuerpo terapéutico (revisión en Liming Liu 2015).

Los anticuerpos no humanos se pueden humanizar, lo que se refiere a la construcción de inmunoglobulinas quiméricas, que contienen la secuencia de aminoácidos de interés derivada del anticuerpo no humano original (por ejemplo, el anticuerpo de ratón) incluido en una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor). En los anticuerpos humanizados, los residuos de aminoácidos de CDR del anticuerpo humano se reemplazan por residuos de las CDR de una especie no humana (por ejemplo, el anticuerpo de ratón) que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán al menos uno, y habitualmente dos dominios variables, en los cuales todas o casi todas las regiones CDR corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano y todas o parte de las regiones FR son aquellas de una inmunoglobulina humana.

Las células inmunitarias tal como las células T se pueden modificar para expresar el anticuerpo (todo o parte) o receptores que se unen a un anticuerpo, es decir, un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los CAR son moléculas que combinan la especificidad de anticuerpo para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con un dominio intracelular de activación de receptor de células T para generar un receptor quimérico que exhibe una actividad inmunitaria celular antitumoral específica. El dominio de reconocimiento de antígeno de estas células T modificadas puede unirse a un antígeno asociado a tumor. Puede estar relacionado con la transferencia de células adoptivas de células T modificadas para expresar un CAR.

El CAR se puede producir usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluido, pero no limitado al uso de endonucleasas guiadas por ARN, en particular el sistema Cas9/CRISPR, para células T modificadas específicamente para expresar los CAR (WO 2014191128 A1). Se puede usar un módulo diana compuesto de una porción de unión específica para una cierta proteína de superficie celular humana y una etiqueta, donde la etiqueta se deriva de cualquier proteína nuclear humana, preferentemente de la proteína La nuclear humana (WO2016030414 A1).

También, el anticuerpo o fragmento funcional de la invención se puede enlazar a nanopartículas, insertarse en la membrana de liposomas a fin de usarse como vector específico para administrar compuestos tóxicos in situ que inducen apoptosis, así como iones metálicos útiles para la terapia de hipertermia.

Las composiciones para producir un anticuerpo, fragmentos de anticuerpos funcionales o sondas de los mismos de la presente invención se obtuvieron por inmunización de ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad con mucinas séricas ovinas, usando métodos tal como aquellos descritos en el ejemplo I. Se seleccionó suero de ratones que muestra reactividad para líneas de células positivas para STn, mucinas positivas para STn o productos lisados celulares, por medio de los métodos, tal como aquellos descritos en los ejemplos II o III o VI. Los esplenocitos de aquellos ratones inmunizados que muestran suero con reactividad para STn, se cosecharon y fusionaron con una célula de mieloma a fin de obtener una célula de hibridoma inmortalizada que expresa anticuerpos anti-STn. Los métodos para la técnica de hibridoma, tal como los descritos en el ejemplo IV se describen bien en la técnica. Los sobrenadantes de hibridoma se examinaron para la presencia de anticuerpos

contra STn por métodos, tal como aquellos descritos en los ejemplos II o III o VI. Los hibridomas seleccionados se expandieron para la producción y caracterización de anticuerpos. De los varios mAb anti-STn obtenidos, el mAb L2A5 se seleccionó como candidato principal y se usó para análisis adicional. Se determinó la reactividad contra proteínas de mucina con un alto contenido de STn y el título de anticuerpos de mAb L2A5 al usar métodos como se describe en el ejemplo II y se representa en la figura 1. Además, se realizó la desialilación por medio del tratamiento con sialidasa para valorar el reconocimiento de estructuras sialiladas por el anticuerpo L2A5. Como se muestra en la figura 1, la reactividad del mAb L2A5 incrementa con las concentraciones de mAb de manera logarítmica.

Se observó una alta inmunorreactividad a BSM, alcanzando el título de punto final de 6 000. Además, el tratamiento con sialidasa demostró claramente una reducción de la reactividad de este anticuerpo a BSM, mostrando la unión específica y dependiente a estructuras sialiladas. Cabe destacar que, en métodos similares a aquellos descritos en el ejemplo II, pero donde las proteínas de mucina que portan STn se reemplazaron por mucinas desialiladas (asialo), el anticuerpo L2A5 no mostró reactividad.

Se confirmó la unión de mAb L2A5 a células cancerosas MDA-MB-231 viables al usar métodos como se describe en el ejemplo III. Como modelo, se usaron células cancerosas MDA-MB-231 que expresan el antígeno STn, debido a la sobreexpresión del gen ST6GalNAc1. Como se muestra en la figura 2, el mAb L2A5 muestra una alta reactividad a 80 a 88 % de las células STn⁺. La reactividad disminuyó considerablemente después del tratamiento de las líneas de células cancerosas con sialidasa. Como también se muestra en la figura 2, el L2A5 no presentó unión a células cancerosas MDA-MB-231 tipo silvestre, que no expresan el antígeno STn. En conjunto, estos resultados confirmaron la especificidad y selectividad del mAb L2A5 contra el antígeno STn presentado en una superficie de célula cancerosa. Como también se representa en la figura 2, otros anticuerpos anti-STn, que también reaccionan con STn, muestran perfiles de unión ligeramente distintos, en relación con la línea de células cancerosas MDA-MB-231.

Para confirmar la especificidad de unión de mAb L2A5 a proteínas de membrana que portan STn, se realizaron ensayos como aquellos descritos en el ejemplo VI. Como se muestra en la figura 3, el mAb L2A5 reaccionó con proteínas derivadas de la línea de células MDA-MB-231 que sobreexpresa el ST6GalNAc1 y por lo tanto, el STn. El perfil mostró reactividad a proteínas con pesos moleculares superiores a 245 kDa y aproximadamente 160, 85, 50 y 40 kDa. Tras la desialilación de las proteínas de membrana, se observa una disminución o abolición de la reactividad, que confirma la unión del mAb L2A5 a las proteínas sialiladas. Las proteínas de membrana derivadas de las células cancerosas tipo silvestre, que no expresan el antígeno STn, no proporcionaron reactividad positiva con el mAb L2A5. Como se muestra también en la figura 3, L2A5 demostró una unión robusta a MUC1 STn-IgG (aproximadamente 180 kDa) pero no a MUC1 STn-IgG no glucosilado. En conjunto, los resultados indican que el mAb L2A5 reconoce el antígeno STn en extractos de membrana de células cancerosas que expresan STn, así como en proteínas portadoras de STn tal como MUC1.

Una serie de 30 casos con 15 tumores de vejiga (ocho cistectomías y siete metástasis) y 15 tumores colorrectales (adenocarcinomas y adenomas) se tiñeron con L2A5 y dos mAb anti-STn. Como se muestra en la figura 4, todos los tumores de vejiga fueron positivos para todos los mAb analizados, con respecto a los casos de metástasis. Tres de ellos fueron positivos y tres fueron negativos para los mAb L2A5, B72.3 y TKH2. Un caso presenta una tinción reducida con L2A5 y no con los otros mAb. Se señala una sensibilidad ligeramente mayor de detección de antígeno para L2A5. Como se muestra en la figura 4, en tanto que TKH2 y B72.3, muestran reactividad similar, el L2A5 revela una mayor reactividad en los casos de cáncer de vejiga. Esta especificidad y sensibilidad se anuló después del tratamiento enzimático del tejido canceroso con sialidasa.

Como se muestra en la figura 5, todos los casos de cáncer colorrectal fueron positivos para mAb anti-STn y para L2A5, pero exhibieron diferentes patrones en términos de extensión e intensidad. La unión de L2A5 (izquierda) muestra una intensidad y extensión similares para la mayoría de los tejidos patológicos (aproximadamente 70 %), en comparación con el patrón de tinción de B72.3 (centro) o TKH2 (derecha).

Como se muestra en la figura 6 a), en la muestra de cáncer de vejiga metastásico, el L2A5 es principalmente reactivo con las células tumorales y no con la población linfocítica, vasos o tejidos conectivos. En la figura 6 b), tejidos normales de cáncer colorrectal, el L2A5 (izquierda) presenta tinción inespecífica en los enterocitos, en tanto que B72.3 (derecha) reacciona con las células caliciformes.

En el modelo de tumor de vejiga, la tinción con L2A5 es exclusivamente tumoral. L2A5 presenta una tinción específica en las células tumorales uroteliales, incluidas manchas adicionales en sitios invasivos y de metástasis con baja densidad de STn.

En las muestras colorrectales, L2A5 reacciona con tejidos cancerosos, pero también con tejido no patológico. La tinción se ubica esencialmente en los enterocitos, en tanto que la tinción inespecífica obtenida con B72.3 o TKH2 está presente en las células caliciformes. En las muestras colorrectales, no hay una ubicación específica de tinción, aunque L2A5 fue capaz de detectar la presencia de tinción débil en el tejido displásico con L2A5.

Para examinar la especificidad de unión a carbohidratos con más detalle, se analizaron los anticuerpos usando micromatrices de glucano compuestas por sondas de glucano estructuralmente diversas impresas en una superficie sólida adecuada. Los resultados confirmaron la especificidad con el reconocimiento selectivo del STn, pero también se observó unión a:

Sialil Tn:

NeuAc α -6GalNAc α 1/ β 1

2,6-sialil T:

Gal β 1-3GalNAc α 1-

|

NeuAc α 2-6

di-sialil T:

NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-AO

|

NeuAc α 2-6

2,6-sialolactosamina:

NeuAc α 2-6Gal β 1-4Glc β 1

y ausencia virtual de unión a otras secuencias de antígeno que estaban presentes en la micromatriz. Las secuencias unidas se resumen en la figura 7.

Para determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables CDR (SEQ ID NO. 6, 8, 10, 12, 14, 16) y FR (SEQ ID NO. 5, 7, 9, 11, 13, 15) de las cadenas ligeras y pesadas del mAb L2A5 se usó un método descrito en el ejemplo IX.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan meramente como ilustrativos de diferentes aspectos de la presente divulgación y no se deben interpretar para limitar la divulgación de ninguna manera. Se relacionan con la caracterización, selección y producción de anticuerpos.

EJEMPLO I

Producción de anticuerpos - Inmunizaciones

Se proporcionan métodos de ejemplo para producir anticuerpos, pero se puede usar cualquier otro método estándar.

La producción de anticuerpos monoclonales (mAb) se realizó de acuerdo con la tecnología de hibridoma. Se inmunizaron ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad (Harlan, Reino Unido) de manera intraperitoneal con 10 μ g de mucina submaxilar ovina (OSM) emulsionada 1:1 (V/V) con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) seguido de 2 inyecciones adicionales de OSM emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) con intervalos de 21 días. Se recolectaron muestras de sangre de la mejilla de ratones y se examinó el suero recolectado para especificidad de unión a STn por ELISA. Si el suero mostraba la respuesta inmune deseada y específica, se realizaría una inyección de refuerzo final a los ratones correspondientes tres días antes de aniquilar y cosechar el bazo.

EJEMPLO II

ELISA

Las titulaciones de suero de ratón y el examen de sobrenadantes de hibridoma se determinaron por ELISA contra mucina submaxilar bovina (BSM), una proteína que expresa STn. Los pozos de una placa de 96 pozos se recubrieron con 50 μ l de BSM (3 pg/ml) disuelto en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Para valorar la unión específica de los sobrenadantes de hibridoma examinados a estructuras sialiladas, se adicionaron 50 μ l de sialidasa, de *Clostridium perfringens* (Roche) a 25 mU/ml diluida en

amortiguador de sialidasa (Na_2HPO_4 10 mM, pH=6.0) a un subconjunto de pozos y se incubaron durante 90 min a 37 °C. Después del tratamiento con sialidasa, las placas se lavaron tres veces con PBS que contiene Tween 20 al 0.05 % (PBS-T), seguido de bloqueo con leche desnatada en polvo al 5 %, durante 60 min. Después de los lavados con PBS-T, se adicionaron sueros de ratón diluidos o sobrenadantes de hibridoma a los pozos y se incubaron durante 90 min. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS-T, seguido de incubación con Ig anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:1000) (BD Pharmingen) durante 60 min. Después de tres pasos de lavado adicionales, se adicionaron 50 µl de sustrato de tetrametilbencidina (ThermoFisher Scientific) a cada pozo, las placas se incubaron en la oscuridad y la reacción se detuvo al adicionar 50 µl de HCl 1M. La densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de microplacas. El ratón que produce el título más alto de anticuerpos de interés se seleccionó para fusión. Para examinar la producción de anticuerpos de células de hibridoma, se implementó el mismo procedimiento.

EJEMPLO III

Análisis y preparación de citometría de flujo

La unión de los anticuerpos o sobrenadantes de hibridoma se determinó por citometría de flujo usando líneas de células de vejiga y mama humanas que expresan de forma estable STn y células parentales que no expresan STn. Se cosecharon aproximadamente 3×10^5 células por condición y se resuspendieron en amortiguador PBS. Para valorar la unión específica de los sobrenadantes de hibridoma examinados y los anticuerpos a las estructuras sialiladas, las muestras se trataron con sialidasa a 100 mU/ml, durante 90 min a 37 °C. Después del tratamiento con sialidasa, las células se lavaron y se incubaron durante 30 min a 4 °C con mAb anti-STn B72.3, 3F1, TKH2 y sobrenadantes de hibridoma. Se realizaron pasos de lavado posteriores y se detectaron anticuerpos primarios con Ig anti-ratón conjugada con FITC (Dako; dilución 1:10) durante 15 min en la oscuridad. Después del lavado, los datos de cada muestra se adquirieron usando un citómetro de flujo para cada muestra.

Ejemplo IV

Producción de anticuerpos - Tecnología de hibridoma

Los esplenocitos del ratón inmunizado se mezclaron con células de mieloma Sp2/0 (ATCC, EUA) en una relación de 3:1 y se fusionaron en la presencia de polietilenglicol/dimetilsulfóxido usando un protocolo estándar. Las células entonces se colocaron en microplacas de fondo plano de 96 pozos (Orange Scientific) y se mantuvieron en medio RPMI complementado con HAT (hipoxantina 1×10^{-4} M, aminopterina 4×10^{-7} M, timidina 1.6×10^{-5} M, Sigma-Aldrich), FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, gentamicina 0.2 mg/ml (Sigma-Aldrich), piruvato de sodio 1 mM (Gibco), aminoácidos no esenciales MEM al 1 % (v/v) (Gibco) y se incubaron a 37 °C durante 7-12 días. Las células de hibridoma que producen anticuerpos reactivos contra BSM se expandieron y se examinaron por ELISA indirecto y se clonaron por el método de dilución limitada al menos tres veces para obtener líneas de células de clon individual estables. Los hibridomas seleccionados se cultivaron en el medio de selección sin suplementación con HAT a 37 °C. Se seleccionó un hibridoma L2A5 específico para las estructuras sialiladas, particularmente el STn, y se clonó por dilución limitante cuatro veces.

EJEMPLO V

Análisis de inmunohistoquímica de la expresión de STn

Se obtuvieron una serie de 30 casos con 15 tumores colorrectales (adenocarcinomas y adenomas) y 15 tumores de vejiga (ocho cistectomías y siete metástasis), de acuerdo con el comité de ética local. Además, se incluyeron cinco casos de tejido colorrectal normal adyacente al tumor. Los tejidos fijados con formalina e incrustados en parafina (FFPE) se examinaron para STn por inmunohistoquímica (IHC) usando el sistema de biotina/estreptavidina. En resumen, las secciones de tejido FFPE se desparafinaron con xileno, se rehidrataron con una serie graduada de lavados con alcohol y se sometieron a recuperación de antígeno inducida por calor usando amortiguador de citrato pH 6.0 (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 min en el microondas, después de precalentar la solución a una potencia nominal máxima durante 5 minutos. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0.3 % (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 25 min, se bloquearon con UV Block® (Thermo Scientific, Fremont, EUA) y se incubaron durante la noche a 4 °C en una cámara húmeda con mAb anti-STn B72.3, TKH2 (Kjeldsen et al., 1988) y L2A5. Después de lavar con PBS-Tween, se adicionó anticuerpo secundario a las secciones de tejido, antes de la incubación con estreptavidina. STn se visualizó por incubación con 3,3'-diaminobencidina (ImmPACT™ DAB) (Vector, Burlingame, EUA) durante 4 min. Finalmente, el núcleo se contratiñó con hematoxilina durante 1 min. La expresión de STn se valoró usando los mAb anti-STn B72.3, TKH2 y sobrenadante de cultivo de hibridoma L2A5, diluidos 1:5, 1:5 y 1:3 en BSA al 5 % en PBS, respectivamente. Las secciones de control positivo y negativo se probaron en paralelo. Las secciones de control negativo se realizaron sin anticuerpos primarios. Se usaron tejidos tumorales STn⁺ como controles positivos. Los tumores se clasificaron como positivos cuando se observó inmunorreactividad del anticuerpo anti-STn TKH2 por presencia microscópica de producto cromogénico marrón en células tumorales. La expresión de STn y la tinción de L2A5 se valoraron de manera doble ciega por dos observadores independientes y validadas por un patólogo experimentado. Siempre

que hubo un desacuerdo, se revisaron los portaobjetos y se llegó a un consenso. A fin de evaluar la especificidad de anticuerpo, se realizó el tratamiento con sialidasa después de la incubación con peróxido de hidrógeno, en el cual se remueven los ácidos siálicos del antígeno STn, perjudicando de este modo el reconocimiento por el anticuerpo. Por lo tanto, la tinción positiva después de este tratamiento enzimático (4 h a 37 °C; 0.2 U/mL) se consideró inespecífica.

EJEMPLO VI

Transferencia Western (WB)

Las proteínas de membrana se aislaron de líneas de células usando kits de extracción de proteínas de membrana, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de proteína obtenida se estimó usando kits de ensayo de proteínas, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se desnaturalizaron extractos de proteínas de membrana (50 pg) o proteínas purificadas que contienen STn (1 pg) - BSM y MUC1 STn-IgG- y se cargaron en gel de acrilamida de gradiente al 8 %, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y se transfirieron electroforéticamente a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham Hybond P 0.2 µm PVDF, GE Healthcare Life Sciences) de acuerdo con los procedimientos estándar. Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 10 % en TBS Tween al 0.1 % (TBS-T) durante 1 h, seguido de incubación con sobrenadante de anticuerpos primarios anti-STn B72.3, 3F1 o L2A5 diluido en TBS-T durante la noche a 4 °C. Después de lavar con TBS-T, las proteínas etiquetadas se revelaron usando Ig anti-ratón de cabra conjugada con HRP diluida 1:2500 en TBS-T durante 1 h. Después del lavado, las proteínas etiquetadas se revelaron por Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) y entonces se expusieron a una película de rayos X.

EJEMPLO VII

Aislamiento de ARNm y síntesis de ADNc

Se usaron entre 1×10^6 y 5×10^6 células de hibridoma para el aislamiento de ARN. Las células se centrifugaron durante 5 min a 300xg y el sobrenadante se descartó. El sedimento celular se lavó con PBS y el ARN total se aisló usando el kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma-Aldrich), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total extraído se cuantificó usando Nanodrop y se usaron hasta 2 µg para la transcripción inversa como se describe en el kit de transcripción de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). La síntesis de ADNc se realizó usando las siguientes condiciones de ciclo térmico: 25 °C durante 10 min, seguido de 37 °C durante 120 min y 85 °C durante 5 seg. Finalmente, las reacciones se mantuvieron y se enfriaron a 4 °C.

EJEMPLO VIII

Secuenciación de anticuerpos - fragmentos scFv

Los dominios variables de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) del MAb L2A5 se amplificaron a partir del ADNc usando el par de cebadores V_H directo (TTTTTGGATCCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG)/ V_H inverso (ATTGGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGATT) y V_L directo (TTTTTGAATTCTGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA)/ V_L inverso (TTTTTGGGCCCGGATACAGTTGGTGCAGCATC). Todas las PCR se realizaron con el kit Advantage HF 2 PCR (Clontech). Se usaron las siguientes condiciones de ciclo térmico: fusión inicial a 94 °C durante 3 min, seguido de 95 °C durante 45 seg, 70 °C durante 1 min y 68 °C durante 2 min. Entonces, las reacciones se mantuvieron a 68 °C durante 5 min y se enfriaron a 4 °C. Los productos de PCR purificados se clonaron adicionalmente en el vector de clonación pGEM-Teasy (Promega), de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los plásmidos se aislaron usando el kit QIAGEN plasmid plus midi (QIAGEN), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secuenciación se realizó por SeqLab (Göttingen, Alemania) usando el cebador promotor T7 para el vector pGEM-Teasy.

Estas composiciones se pueden producir con una calidad constante para aplicaciones clínicas y de diagnóstico.

EJEMPLO IX

Dominios de anticuerpos

Las secuencias de nucleótidos variables de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) que codifican para las secuencias de aminoácidos de los dominios FR y CDR del mAb L2A5 se determinaron buscando en el sistema de delineación de dominios IMGT V (base de datos internacional ImMunoGeneTics; <http://imgt.cines.fr>) usando la herramienta de análisis de secuencias IgBLAST.

Ejemplo X

Clonación de ácidos nucleicos en un módulo diana

El módulo diana anti-STn (TM) se realizó como se describe (Cartellieri et al 2016), pero reemplazando las regiones CDR por las secuencias de ácido nucleico LA25. La aniquilación tumoral mediada por células T se midió usando ensayos estándar de liberación de cromo. Las líneas de células MDA-MB-231 y MCR STn+ se incubaron con células T injertadas con el control del vector (cadena principal de vector que codifica solo para la proteína marcadora EGFP), la construcción de parada UniCAR (que carece de dominios de señalización intracelular) o la construcción de señalización α -E5B9 (UniCAR 28/ ζ) (Mitwasi 2017). Ambas líneas de células se cultivaron con las respectivas células T genéticamente modificadas en presencia o ausencia de 80 nM de anti-STn TM (a-STn TM) durante 24 h en una relación efector a diana (E:T) de 5:1.

Ejemplo XI

Actividad antitumoral in vivo

Las células MDA-MB-231 STn se transdujeron para expresar luciferasa de luciérnaga (Luc) dando por resultado células MDA-MB-231 STn-Luc. El módulo diana anti-STn (TM) se realizó como se describe (Cartellieri et al 2016), pero reemplazando las regiones CDR por las secuencias de ácido nucleico LA25. Por ratón, se mezclaron 1.5×10^6 células tumorales con 1×10^6 células T UniCAR 28/ ζ y 10 μ g de TM anti-STn. Se usaron células MDA-MB-231 STn-Luc (1.5×10^6) solas o mezcladas con 1×10^6 células T UniCAR 28/ ζ sin TM como controles no tratados. La mezcla respectiva se inyectó de manera subcutánea en ratones NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu hembra dando por resultado tres grupos de animales que consisten cada uno en cinco ratones. La imagenología de luminiscencia de los ratones anestesiados se realizaron 10 minutos después de la inyección i.p. de 200 μ l de sal de potasio de D-luciferina (15 mg/ml) comenzando en el día 0 y seguido en los días 1, 3, 6 y 8.

La tabla 1 muestra un ejemplo de la secuencia de nucleótidos de las cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL) del clon L2A5 identificadas como SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente y la secuencia de aminoácidos codificada de las cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL) identificadas como SEQ ID NO. 3 y 4, respectivamente.

Tabla 1: Ejemplo de secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos codificada de las cadenas ligeras variables (VL) y pesadas variables (VH) del clon L2A5.

SEQ ID NO.	Cadena (mu)
1	Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (VH)
2	Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (VL)
3	Secuencia de aminoácidos de la cadena VH
4	Secuencia de aminoácidos de la cadena VL

La tabla 2 muestra la secuencia de aminoácidos codificada de los seis regiones marco (FR) y seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) (H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, LCDR3) para el clon L2A5 y se identifican como la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 a 16.

Tabla 2: Secuencia de aminoácidos codificada de las tres regiones marco (FR) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) (H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, LCDR3) para el clon L2A5.

SEQ ID NO.	Región
5	Secuencia de aminoácidos de L-FR1
6	Secuencia de aminoácidos de L-CDR1
7	Secuencia de aminoácidos de L-FR2
8	Secuencia de aminoácidos de L-CDR2
9	Secuencia de aminoácidos de L-FR3
10	Secuencia de aminoácidos de L-CDR3
11	Secuencia de aminoácidos de H-FR1
12	Secuencia de aminoácidos de H-CDR1
13	Secuencia de aminoácidos de H-FR2
14	Secuencia de aminoácidos de H-CDR2

SEQ ID NO.	Región
15	Secuencia de aminoácidos de H-FR3
16	Secuencia de aminoácidos de H-CD3

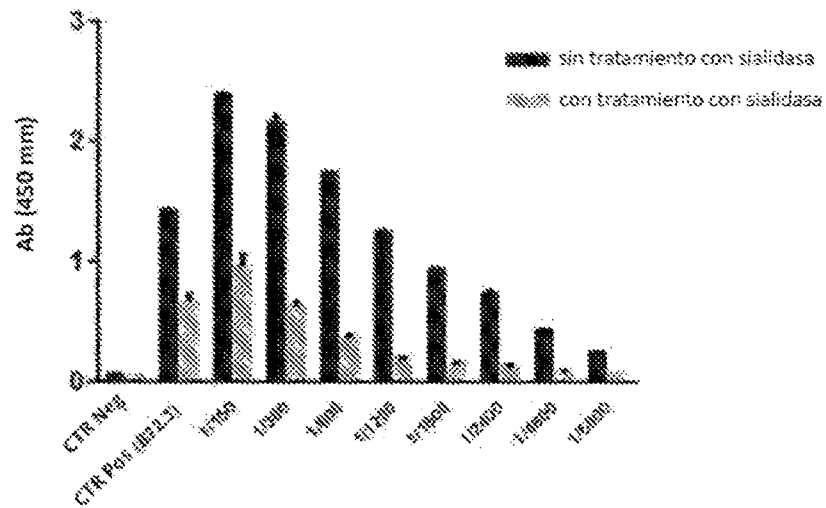
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende una combinación de una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), donde:
5 la VL comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 como se establece en SEQ ID NO. 6, 8 y 10, respectivamente; y, la VH que comprende las CDR H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 como se establece en SEQ ID NO. 12, 14 y 16, respectivamente.
- 10 2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la VL comprende SEQ ID NO. 5, 7 y 9; y la VH comprende SEQ ID NO. 11, 13 y 15.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la VL comprende SEQ ID NO. 4 y la VH comprende SEQ ID NO. 3.
- 15 4. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que se une a STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa 2,6-enlazados.
5. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde los glucanos terminados por ácidos siálicos alfa 2,6-enlazados comprenden STn, 2,6-sialil T, di-sialil T o 2,6-sialolactosamina.
- 20 6. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que está sujeto a cambios de glucanos en los sitios de glucosilación.
7. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
- 25 8. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es un fragmento de anticuerpo funcional del mismo, que se une a STn y un grupo de glucanos terminados por ácidos siálicos alfa 2,6-enlazados.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior y un portador farmacéuticamente aceptable.
10. Un método para detectar un tumor en un sujeto usando un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, el método que comprende: teñir una muestra biológica in vitro, obtenida de un sujeto, con el anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior bajo condiciones adecuadas para la unión específica del anticuerpo, donde la presencia o ausencia de unión del anticuerpo es indicativa de la presencia o ausencia de células tumorales que expresan STn de superficie celular, 2,6-sialil T, di-sialil T o 2,6-sialolactosamina, opcionalmente donde la muestra biológica comprende células aisladas, o tejido, o proteínas derivadas de tumores.
- 35 11. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, para usarse en medicina.
- 40 12. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, para usarse en el tratamiento del cáncer.
- 45 13. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica para un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, opcionalmente donde el polinucleótido comprende SEQ ID NO. 1 y/o SEQ ID NO. 2; secuencias de nucleótidos TCAAGTGTAGTTAC, GACACATCC y CAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCCATGCTCACG; o secuencias de nucleótidos GGCTACTCCATCACCGAGTGGTTATTAC, ATAACTACGACGGTAGCAAT y GCAAGAGGGGGGGGACTAC.
- 50 14. Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 13.
- 55 15. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, cuyo método comprende usar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 14.

DIBUJOS

Figura 1

Titulación de L2A5



Dilución de L2A5

Figura 2

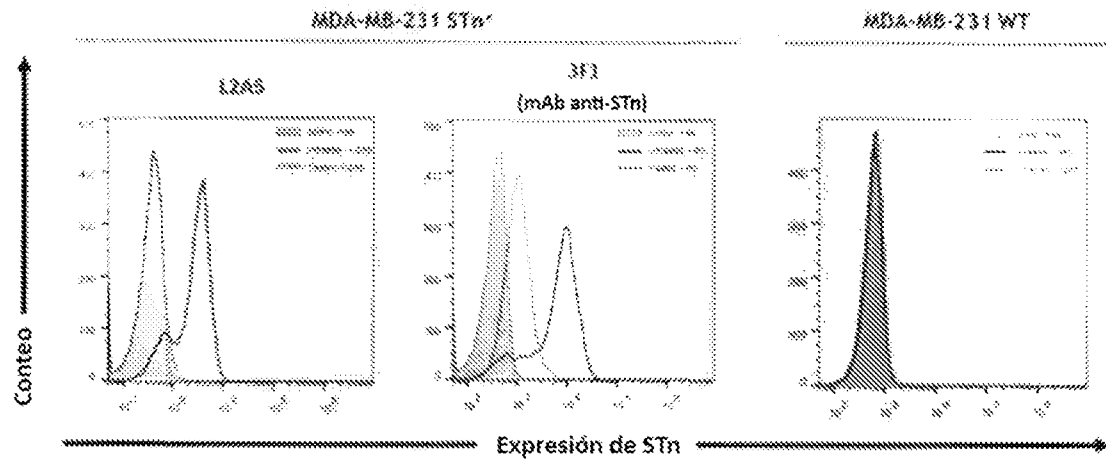


Figura 3

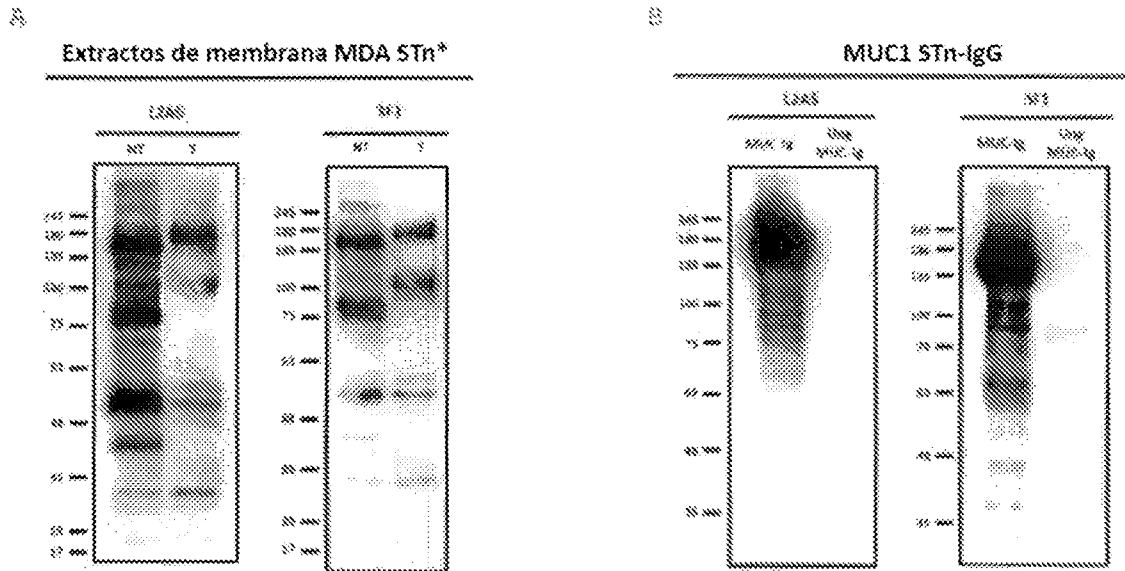


Figura 4

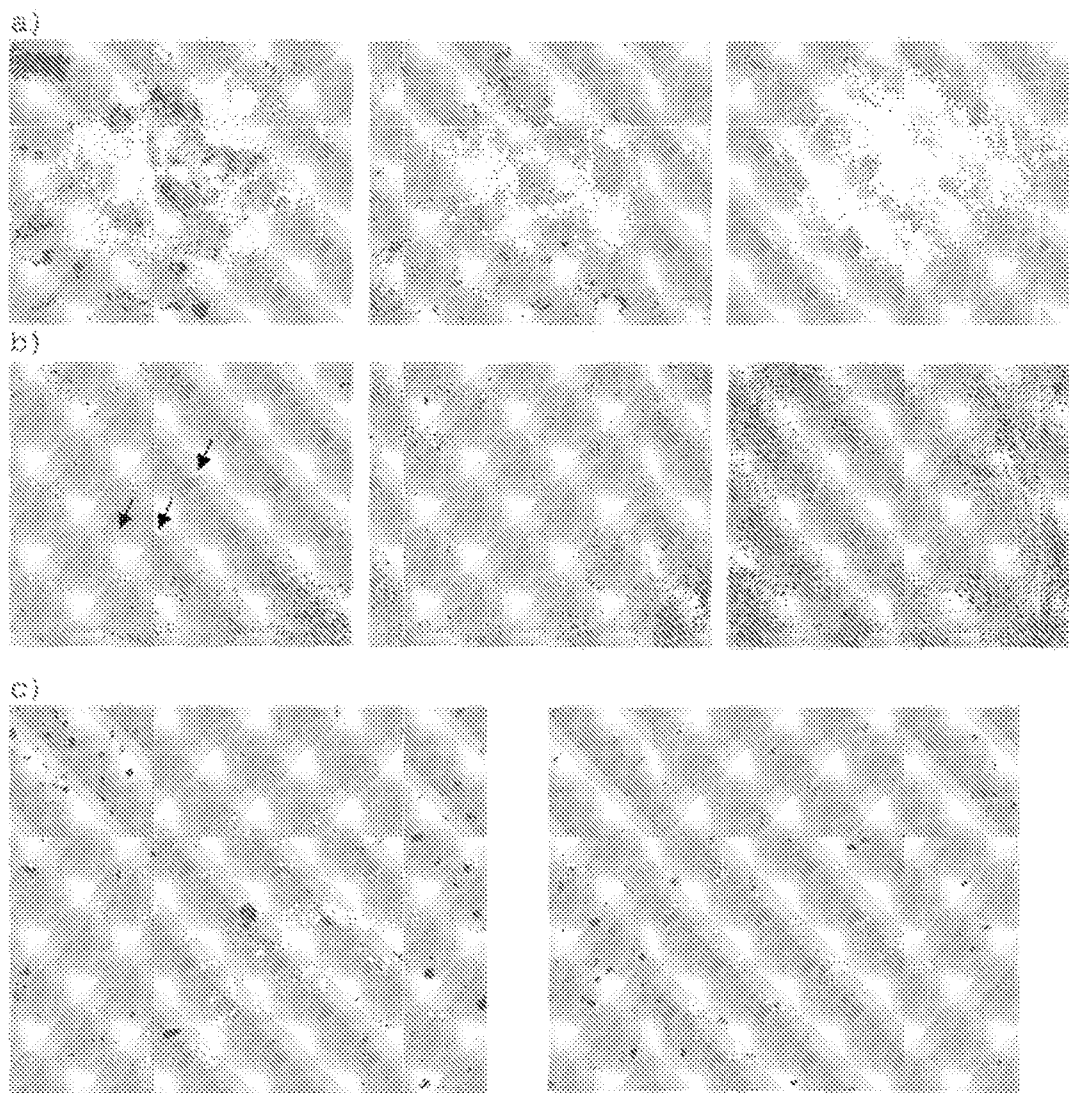


Figura 5

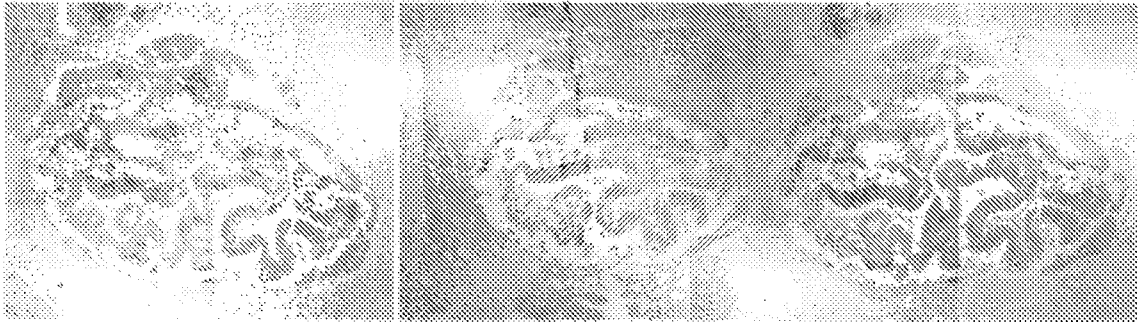


Figura 6

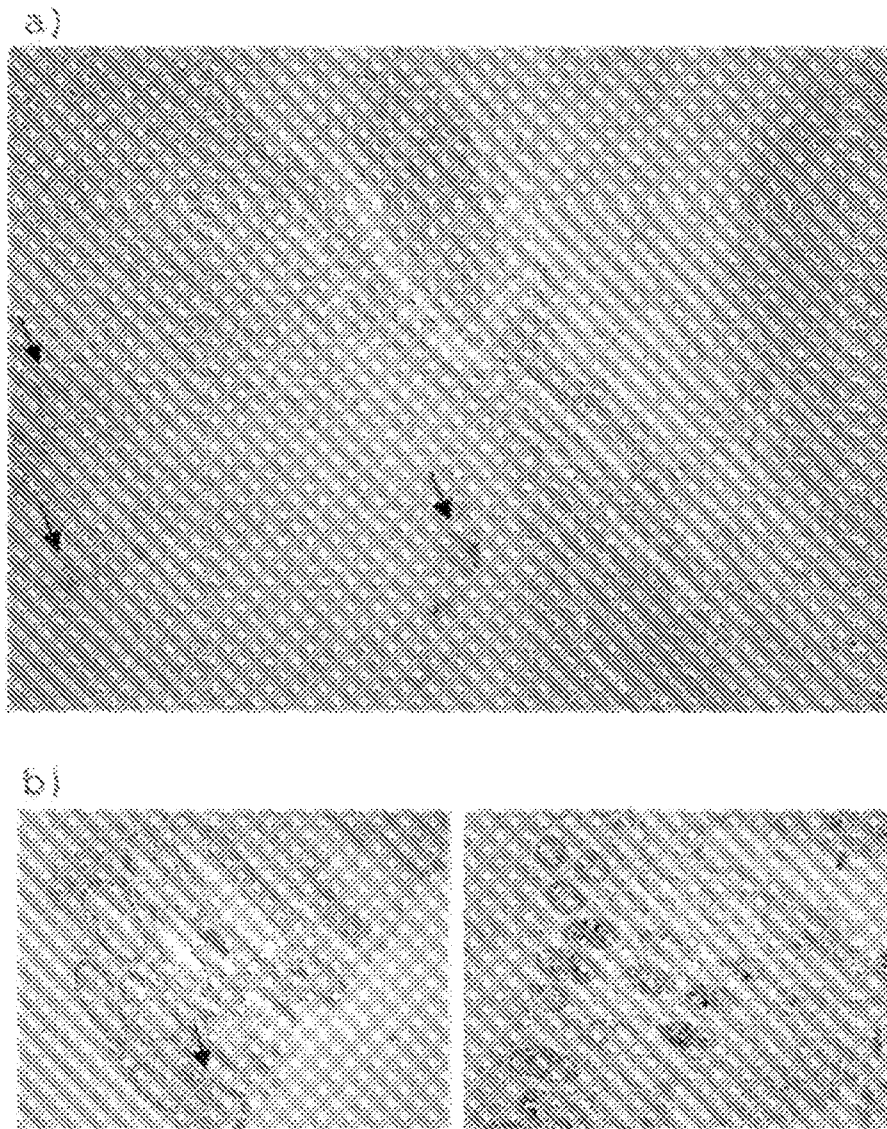


Figura 7

Sialil Tn:
 $\text{NeuAc}\alpha 2-6\text{GalNAc}\alpha 1-$ (sialil Tn)

2,6-sialil T:
 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-$
 $\quad \quad \quad |$
 $\text{NeuAc}\alpha 2-6$

disialil T:
 $\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-$
 $\quad \quad \quad |$
 $\text{NeuAc}\alpha 2-6$

2,6-sialolactosamina:
 $\text{NeuAc}\alpha 2-6\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-$

Figura 8

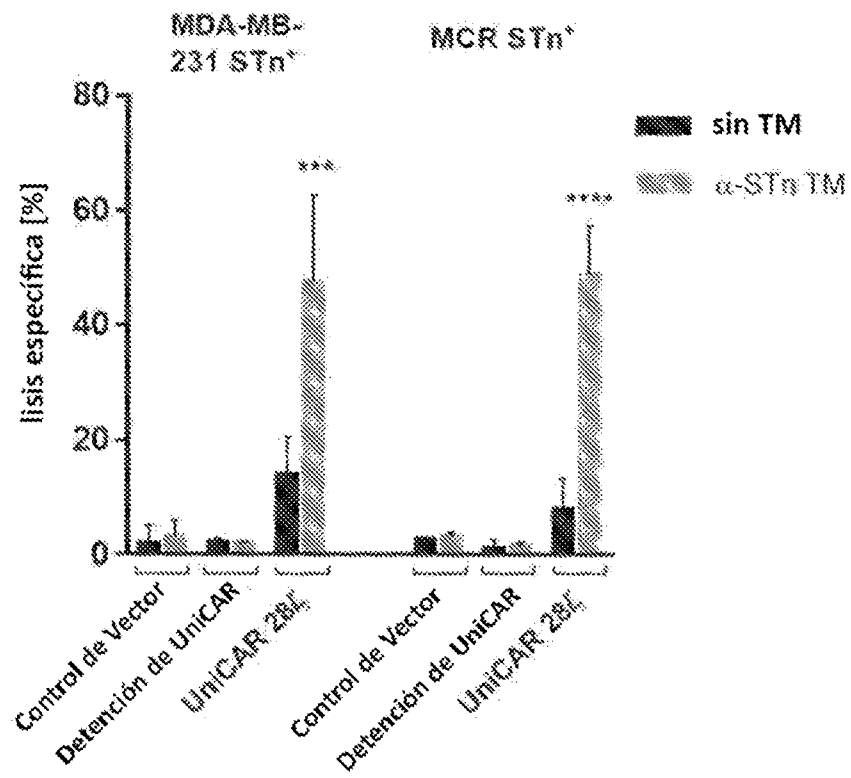


Figura 9

