

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/30 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01) **C12R 1/91** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01)

(22) Data de pedido: **2018.01.26**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2019.07.26**

(45) Data e BPI da concessão: **2021.01.29**
24/2021

(73) Titular(es):

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
CAMPUS DE CAMPOLIDE 1099-085 LISBOA PT
INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO
PORTO FG, EPE PT
HELMOHOLTZ - ZENTRUM DRESDEN-
ROSSENDORF - INSTITUTE OF
RADIOPHARMACEUTICAL CANCER RESEARCH
DE

(72) Inventor(es):

PAULA ALEXANDRA QUINTELA VIDEIRA PT
CARLOS MANUEL MENDES NOVO PT
LILIANA RAQUEL RODRIGUES LOUREIRO PT
MYLENE ADELAIDE DO ROSÁRIO CARRASCAL PT
JOSÉ ALEXANDRE RIBEIRO DE CASTRO FERREIRA PT

(74) Mandatário:

JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA
RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPO, FRAGMENTO FUNCIONAL OU SONDA DO MESMO CONTRA ANTIGÉNIOS TUMORAIS**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO FORNECE UM ANTICORPO OU FRAGMENTOS FUNCIONAIS DE UM ANTICORPO, OU UMA SONDA DO MESMO DIRIGIDO(S)/DIRIGIDA CONTRA UM GRUPO ÚNICO DE ANTIGÉNIOS IDENTIFICADOS EM CANCRO. A PRESENTE INVENÇÃO COMPREENDE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DERIVADAS DO ANTICORPO MONOCLONAL L2A5. O ANTICORPO OU FRAGMENTO FUNCIONAL DO ANTICORPO, OU SONDA DO MESMO INCLUI UM DOMÍNIO VARIÁVEL DAS CADEIAS PESADAS E UM DOMÍNIO VARIÁVEL DAS CADEIAS LEVES COM UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS FORNECIDA NO PRESENTE DOCUMENTO. ESTA CONJUGAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA/AMINOÁCIDOS É ÚNICA E NUNCA FOI DESCRITA ANTERIORMENTE. A PRESENTE INVENÇÃO FORNECE AINDA UM ANTICORPO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO ANTICORPO OU UM CONJUGADO OU UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE ÚTIL NA DETECÇÃO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS HUMANAS, INCLUINDO O CANCRO.

RESUMO

ANTICORPO, FRAGMENTO FUNCIONAL OU SONDA DO MESMO CONTRA ANTIGÉNIOS TUMORAIS

Esta invenção fornece um anticorpo ou fragmentos funcionais de um anticorpo, ou uma sonda do mesmo dirigido(s)/dirigida contra um grupo único de antigénios identificados em cancro. A presente invenção compreende sequências nucleotídicas derivadas do anticorpo monoclonal L2A5. O anticorpo ou fragmento funcional do anticorpo, ou sonda do mesmo inclui um domínio variável das cadeias pesadas e um domínio variável das cadeias leves com uma sequência de aminoácidos fornecida no presente documento. Esta conjugação de sequências de DNA/aminoácidos é única e nunca foi descrita anteriormente. A presente invenção fornece ainda um anticorpo ou um fragmento funcional do anticorpo ou um conjugado ou uma proteína recombinante útil na deteção, tratamento e prevenção de doenças humanas, incluindo o cancro.

DESCRIÇÃO

ANTICORPO, FRAGMENTO FUNCIONAL OU SONDA DO MESMO CONTRA ANTIGÉNIOS TUMORAIS

Área técnica

A presente invenção fornece um anticorpo ou fragmentos funcionais do referido anticorpo, ou uma sonda do referido anticorpo dirigido(s)/dirigida contra um grupo de antigénios identificados em cancro.

Estado da técnica

O sialil-Tn (STn) é um antigénio O-glicano curto, um dissacarídeo que consiste em ácido siálico ligado a N-acetilgalactosamina, isto é, Neu5Ac α -2,6GalNAc, que por sua vez está O-ligado a resíduos de serina ou treonina numa cadeia polipeptídica, numa configuração alfa através do resíduo GalNAc. A sua relevância está relacionada com o facto deste estar ausente em tecidos saudáveis normais, mas de ser detetado com várias frequências em quase todos os tipos de carcinomas (Julien, Videira, & Delannoy, 2012). Para além disso, o STn é um alvo para células cancerígenas metastáticas, resistentes a fármacos e altamente malignas. As suas características motivadoras incluem:

- 1) a associação da expressão do STn com a oncogénese e a capacidade metastática das células cancerígenas humanas, e células iniciadoras de tumores (Okasaki *et al.*, 2012).
- 2) a correlação do STn com um mau prognóstico em doentes, com uma sobrevivência global reduzida e falta de resposta à quimioterapia (Choi *et al.*, 2000) e

3) a evasão do sistema imunitário (Carrascal *et al.*, 2014). Os ácidos siálicos alfa-2,6 são tipicamente biomarcadores terminais no cancro. Os O-glicanos sializados alfa-2,6 curtos são sobreexpressos em vários tipos de cancro. Eles estão geralmente envolvidos na progressão do cancro e metástases. Para além disso, eles podem contribuir para a evasão imune através do seu reconhecimento por parte de um certo número de recetores imunes tais como as proteínas de ligação ao ácido siálico (Siglecs) (Crocker, Paulson, & Varki, 2007; Nicoll *et al.*, 2003).

Assim, a presente invenção fornece um anticorpo, fragmentos funcionais de um anticorpo ou sondas que se ligam de forma específica a biomarcadores do cancro. Para além da identificação específica das células tumorais, estes anticorpos têm o potencial de bloquear o reconhecimento de tais ligandos por recetores de células hospedeiras, envolvidos no mecanismo subjacente à progressão tumoral, incluindo a tolerância imune.

Existem números consideráveis de anticorpos que foram aprovados para tratar doentes com cancro (<https://www.cancer.org/>). Eles compreendem:

1. Anticorpos monoclonais (mAb) que têm como alvo antígenos específicos do (associados ao) cancro. O mAb humanizado recombinante anti-HER2 trastuzumab (Herceptin™) é descrito em várias publicações científicas, por exemplo em *Cancer Res.*, 1998, 58: 2825-2831. Este tem como alvo os recetores HER2 expressos em cerca de 30% dos doentes com cancro da mama. A patente WO0105425 descreve uma composição antitumoral que compreende uma antraciclina alquilante acoplada ao anticorpo anti-HER2 trastuzumab. No entanto, estes tratamentos estão disponíveis apenas para um número

limitado de doentes (30% dos doentes com cancro da mama). Da mesma forma, a proteína HER2 que é reconhecida pelo anticorpo trastuzumab também é expressa em células normais relevantes, tais como células cardíacas, estando isto associado à sua cardiotoxicidade. A presente invenção permite o desenvolvimento de anticorpos recombinantes que têm como alvo uma lista mais ampla de recetores para além dos HER2, expressos por diferentes tipos de cancro, que possuem o STn ou um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos alfa-2,6. Isto irá potencialmente permitir o desenvolvimento de terapias para um grupo mais amplo de doentes com cancro. Uma vez que tanto o STn como os glicanos terminados com ácidos siálicos alfa-2,6 são altamente sobreexpressos pelas células cancerígenas, estes também têm o potencial de uma maior especificidade e toxicidade reduzida.

2. MAbs que bloqueiam moléculas que fazem com que o sistema imune pare de trabalhar. Eles são denominados inibidores dos pontos de controlo imunes e incluem fármacos que bloqueiam o CTLA-4, PD-1 e PD-L1. Exemplos de inibidores de PD-1 são o Pembrolizumab (Keytruda) e o Nivolumab (Opdivo), que estão aprovados para tratar o melanoma da pele, cancro do pulmão de células não pequenas, cancro renal, cancro da bexiga, cancros da cabeça e pescoço, e linfoma de Hodgkin. No entanto, os pontos de controlo imunes não fornecem uma resposta antitumoral imediata e são tipicamente usados como terapia adjuvante. Da mesma forma, os inibidores dos pontos de controlo imunes podem permitir que o sistema imune ataque alguns órgãos normais no corpo, o que pode levar a efeitos secundários graves em algumas pessoas.
3. MAbs que bloqueiam a sinalização celular necessária para

que as células cancerígenas se dividam. Estes incluem o Bevacizumab (Avastin®) que tem como alvo o VEGF que afeta o crescimento dos vasos sanguíneos e o Cetuximab (Erbix®), um anticorpo que tem como alvo uma proteína celular denominada EGFR, importante para o crescimento celular. No entanto, estes anticorpos, que bloqueiam a sinalização celular, também influenciam mecanismos fisiológicos e estão associados a toxicidade, tal como tensão arterial elevada, hemorragia, coágulos de sangue, e lesão renal.

Existem alguns documentos de patentes (EP 2014302 A1; WO 2015053871 A4; US 7423126 B2; EP 2993184 A1) que reivindicam os ácidos nucleicos que codificam anticorpos humanos para antígenos de hidratos de carbono associados a tumores; no entanto, nenhum dos anticorpos nos documentos de patentes acima mencionados reconhece o antígeno STn, que é o alvo do anticorpo da presente invenção.

O pedido de patente EP2680004 (A2) reivindica os anticorpos contra glicanos sialilados, incluindo o antígeno STn que contém ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) ou ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc), enquanto que a presente invenção diz respeito a um anticorpo que é específico para o antígeno STn, principalmente com o NeuAc, e para um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos alfa-2,6.

Os pedidos de patente WO 1998046246 A1 e WO 1995029927 A3 reivindicam métodos para produzir glicoconjugados α -O-ligados ou glicosídeos de antígenos de hidratos de carbono associados a tumores, os quais incluem o antígeno 2,6-sialil-T. Embora mencionem a possibilidade de ser usados para desenvolver anticorpos para tratar o cancro, nenhum destes pedidos de patentes fornece uma sequência de

anticorpos para detetar o antigénio 2,6-sialil-T, nem o grupo de antigénios contendo ácidos siálicos-2,6 relacionados que são assunto da presente patente.

Vários pedidos de patentes reivindicaram anticorpos que se ligam a resíduos de ácido siálico, tais como o CA 2743032 A1, que caracteriza um anticorpo IgM que reconhece resíduos de ácido siálico, incluindo o NeuGc, ou o US 20160184450 A1 e o US 8148335 B2 que reivindicam anticorpos que se ligam de forma específica a um ácido siálico de-N-acetilado, ou os pedidos EP 2302390 e US 20120142903 A1 que incluem anticorpos que reconhecem a estrutura NeuGc; enquanto que a presente invenção reivindica um anticorpo que reconhece não apenas o NeuAc ligado a GalNAc (antigénio STn), mas também a estrutura do NeuAc num grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6.

O pedido de patente EP 2261255 A1 descreveu a produção de anticorpos em galinhas que reconhecem o NeuAc monossacarídico e o pedido de patente US 20110034676 reivindica a produção e purificação de anticorpos policlonais contra as estruturas tanto Neu5Ac como Neu5Gc. No entanto, a presente invenção reivindica ácidos nucleicos que codificam mAbs produzidos em ratinhos, e que têm como alvo o antigénio STn de oligossacarídeos e um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6. Isto é uma vantagem, uma vez que a presente invenção irá permitir a distinção de glicanos associados a tumores, e não apenas o NeuAc monossacarídico, o qual também é expresso em células normais.

Para além disso, o pedido de patente US 2010/0034825 A1 reivindica a produção de anticorpos contra a glicoproteína MUC1, utilizando a imunização com longos glicopeptídeos de repetição em tandem Tn- ou STn-MUC1. Este trabalho difere da

presente invenção, uma vez que a estrutura-alvo é diferente, isto é, tem-se como alvo a glicoproteína MUC1, e não estruturas de glicanos, STn ou glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6.

Os anticorpos da patente WO2016057916A1 reconhecem o antigénio STn e não os glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6.

De acordo com o acima mencionado, os antigénios tumorais são frequentemente não específicos de tumores devido à sua expressão simultânea em células normais. Por conseguinte, as terapias direcionadas mostram tipicamente toxicidade associada devido a efeitos de reconhecimento de outras moléculas para além das moléculas-alvo. Os antigénios tumorais não são antigénios pan-tumorais e estão confinados a tipos específicos ou graus de cancros. Por conseguinte, as terapias direcionadas estão tipicamente confinadas a subconjuntos específicos de cancros.

Consequentemente, há necessidade de desenvolver anticorpos ou fragmentos funcionais de anticorpos, ou sondas dos mesmos dirigidos/dirigidas contra um único grupo de antigénios apenas identificados em células cancerígenas.

Uma sequência única de ácidos nucleicos que permita a produção de um anticorpo ou de fragmentos funcionais de um anticorpo ou sonda do mesmo para alvejar glicanos sialilados tais como o STn, 2,6-sialil-T, dissialil-T e 2,6-sialo-N-acetil-lactosamina, que são sobreexpressos em diferentes tipos e subtipos de células cancerígenas, é muito importante.

A presente invenção refere-se a sequências nucleotídicas que codificam mAbs contra o STn e um grupo de glicanos terminados

com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6. Estes antigénios são glicanos de cadeia curta que são sobreexpressos no cancro, mas que não são expressos por células normais. Estes antigénios também são ligados para recetores imunes e atenuam a atividade do sistema imune contra células tumorais, podendo assim também ser considerados como ligados para pontos de controlo imunes.

Descrição

Anticorpo monoclonal (mAb) refere-se a um anticorpo que é produzido por um único clone de células B. Os mAbs também podem ser produzidos por um hibridoma, que é um híbrido entre uma célula B e uma célula de mieloma, ou por linhas celulares que expressam DNA recombinante que codifica a cadeia pesada e leve das imunoglobulinas, e que, por conseguinte, irão produzir um anticorpo único e específico.

Os anticorpos são expressos no meio extracelular e de seguida purificados a partir daí.

A especificidade de um anticorpo consiste na sua capacidade para reagir com um antigénio ou com um grupo de antigénios que partilham um certo epítopo. Um epítopo, também conhecido como determinante antigénico, é a parte de um antigénio que é reconhecida pelo anticorpo.

Um anticorpo pertence à classe de imunoglobulinas de proteínas, e consiste numa associação de duas cadeias pesadas idênticas (~ 50-70 kDa) e duas cadeias leves idênticas (~25 kDa). Na região amino-terminal de cada cadeia pesada ou leve há uma sequência de 100-300 aminoácidos que codificam a região variável. No terminal carboxilo de cada cadeia pesada

ou leve há uma sequência que codifica a região constante. Cada anticorpo liga-se duas vezes ao mesmo antigénio, isto é, é bivalente.

O fragmento que se liga ao antigénio (Fab) é o fragmento do anticorpo que se liga aos antigénios. Cada Fab é composto por um domínio constante e um variável de cada cadeia pesada e leve do anticorpo. A região do fragmento cristalizável (Fc) é composta por 2 ou 3 domínios do terminal carboxi das duas cadeias pesadas. Enquanto que o Fab assegura a ligação ao antigénio, a região Fc assegura que cada anticorpo gera uma resposta imune efetora. A região Fc liga-se a vários recetores celulares tais como recetores de Fc, e a outras moléculas tais como proteínas do complemento, mediando efeitos fisiológicos diferentes que incluem a opsonização para facilitar a fagocitose pelos fagócitos, a lise celular por células Matadoras Naturais, e a desgranulação de mastócitos, basófilos e eosinófilos.

O termo "domínio variável" ou "região variável" é a parte do amino-terminal das cadeias leves ou pesadas de um anticorpo que interage com o antigénio. Ela tem um comprimento de cerca de 120 a 130 aminoácidos na cadeia pesada e de cerca de 100 a 110 aminoácidos na cadeia leve. As sequências de cada uma das regiões variáveis são substancialmente variadas, em particular nas regiões determinantes da complementaridade (CDR), responsáveis pela interação com o antigénio específico. As CDR são flanqueadas por regiões estruturais menos variadas (FR). As CDR de cada uma das cadeias leves e pesadas são três. As CDR L1, L2 e L3 encontram-se nas cadeias leves. As CDR H1, H2 e H3 encontram-se nas cadeias pesadas.

A expressão "fragmento funcional do anticorpo ou sonda" é uma parte do anticorpo que inclui a região variável das cadeias pesadas e leves do anticorpo, ou que inclui a região

variável das cadeias pesadas ou a região variável das cadeias leves do anticorpo. O fragmento funcional do anticorpo ou sonda retém a maior parte ou toda a atividade de ligação do anticorpo inicial do qual o fragmento ou sonda foi derivado/derivada. Esses fragmentos funcionais do anticorpo ou sondas podem incluir o Fv de cadeia única (scFv), diacorpo, triacorpo, tetracorpo e minicorpo.

O termo "sequência nucleotídica" refere-se a uma sequência de nucleotídeos de qualquer comprimento, desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, ou análogos dos mesmos.

A sequência nucleotídica pode ser transcrita para produzir mRNA, que é depois traduzido num polipeptídeo e/ou num fragmento do mesmo.

O potencial tratamento derivado da presente invenção refere-se ao uso no tratamento, gestão ou melhoria de uma doença associada à expressão do STn ou de um grupo de glicanos sialilados alfa-2,6. Nas presentes formas de realização, um possível tratamento refere-se a um anticorpo, fragmento funcional de um anticorpo ou sonda derivado/derivada da invenção, na sua forma nativa ou modificada.

Um possível tratamento pode também ser incluído na presente invenção em combinação com um agente bem conhecido como sendo útil, ou que foi ou está presentemente a ser usado, para o tratamento, gestão ou melhoria de uma doença.

A potencial utilização como agente de diagnóstico refere-se a uma substância que quando administrada a um sujeito irá ajudar no diagnóstico de uma doença. Essas substâncias podem ser utilizadas para detetar e/ou definir a localização de

uma doença de um processo que derive da progressão da doença. Elas incluem também uma substância que possa ajudar a prever a resposta a um certo tratamento ou que possa ajudar no prognóstico de uma doença. Em certas formas de realização, a utilização de um agente de diagnóstico implica a conjugação do anticorpo ou do fragmento funcional do anticorpo ou sonda da presente invenção a uma molécula-repórter tal como uma molécula fluorescente, enzima, ou anticorpo secundário.

O sialil-Tn, também conhecido como STn, sialosil-Tn, Tn sialilado, Neu5Ac- α 2,6GalNAc α -O-Ser/Thr ou também referido como CD175s pela nomenclatura de "cluster de diferenciação" é o O-glicano sialilado mais simples do tipo mucina. O STn é um O-glicano truncado que contém um ácido siálico (Neu5Ac) ligado α -2,6 (através do carbono 6) a N-acetil-galactosamina (GalNAc) ligado alfa-O a uma Serina/Treonina (Ser/Thr) (Neu5Ac- α 2,6GalNAc α -O-Ser/Thr). A sialilação previne a formação de várias estruturas centrais de outra forma encontradas em O-glicanos do tipo mucina.

O STn está associado a um efeito adverso e a um mau prognóstico em doentes com cancro. A biossíntese do antigénio STn tem sido associada à expressão da sialiltransferase ST6GalNAc1, e a mutações ou perda de heterozigosidade do gene *COSMC*.

O STn é expresso em mais de 80% dos carcinomas humanos e está relacionado com um mau prognóstico em doentes com cancro.

A invenção fornece sequências nucleotídicas que codificam as cadeias pesadas ou leves de um anticorpo ou o fragmento funcional do referido anticorpo ou uma sonda do referido anticorpo, em que as cadeias pesadas ou leves do anticorpo ou fragmento do referido anticorpo ou sonda do referido

anticorpo codificadas pela sequência nucleotídica da invenção têm uma ou mais das CDR listadas nas Tabelas 1 e 2. Um anticorpo ou fragmento funcional de anticorpo ou sonda do mesmo que inclua uma ou mais das CDR pode ligar-se de forma específica ao STn ou a um grupo de glicanos sialilados alfa-2,6. A ligação de forma específica inclui a especificidade, afinidade e/ou avides tais como fornecidas no Exemplo I.

Num outro aspeto, um anticorpo ou fragmento funcional do referido anticorpo codificado pelos polinucleotídeos da invenção pode incluir a atividade de citotoxicidade dependente do complemento e/ou a atividade de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC).

O método para a produção do anticorpo da invenção pode incluir a fusão entre duas células, produzindo um hibridoma, a introdução de uma sequência nucleotídica da invenção numa célula hospedeira, a cultura da célula hospedeira sob condições e durante um tempo suficiente para produzir as cadeias pesadas e/ou leves codificadas de um anticorpo ou fragmento funcional da invenção, e a purificação das cadeias pesadas e/ou leves de um anticorpo ou fragmento funcional.

A expressão recombinante de um anticorpo ou do fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo da invenção que se liga ao STn ou a um grupo de antigénios sialiados alfa-2,6 pode incluir a construção de um vetor de expressão contendo uma sequência nucleotídica que codifica as cadeias pesadas e/ou leves de um anticorpo ou fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo da invenção.

O vetor pode ser produzido por tecnologia de DNA recombinante. Esses vetores também podem incluir outras sequências nucleotídicas codificadoras, originando uma sequência quimérica. Por exemplo, eles podem incluir a

sequência nucleotídica que codifica a região constante da molécula de anticorpo (WO 86/05807 e WO 89/01036), permitindo a expressão de uma proteína quimérica contendo a sequência de aminoácidos do anticorpo, fragmento funcional do anticorpo ou sonda do mesmo da presente invenção seguida das cadeias pesadas completas, e ou leves, ou das cadeias completas tanto pesadas como leves.

O vetor de expressão pode ser transferido para uma célula hospedeira por técnicas de Transfeção/Transdução e as células resultantes produzem o anticorpo ou fragmento funcional do mesmo da invenção. Assim, a invenção inclui células hospedeiras contendo sequências nucleotídicas que codificam o anticorpo ou fragmento funcional do anticorpo ou sonda do mesmo da invenção.

A célula hospedeira pode ser escolhida de modo a modificar as características do produto derivado das sequências nucleotídicas inseridas.

Numa forma de realização, estas células hospedeiras podem adicionar sítios de glicosilação ou fosforilação ou outras modificações às proteínas codificadas. Numa outra forma de realização, as células hospedeiras podem fornecer o processamento correto e o tráfico/secreção celular das proteínas.

Um anticorpo de fragmento variável de cadeia única (scFv) refere-se ao fragmento funcional de um anticorpo contendo apenas as regiões VL e VH, as quais são ligadas por meio de uma sequência conetora, formando um sítio monovalente de ligação ao antigénio. Os diacorpos, triacorpos e tetracorpos são anticorpos que incluem dímeros, trímeros ou tetrâmeros do scFv, isto é, que contêm duas, três e quatro cadeias polipeptídicas, respetivamente, e que formam dois, três e

quatro sítios de ligação aos antigénios, respetivamente, que podem ser o mesmo ou diferentes.

O anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo resultantes desta invenção pode(m) ter um ou mais sítios de ligação. Se contiverem mais de um sítio de ligação, estes sítios podem ser idênticos uns aos outros ou podem ser diferentes. No caso de dois sítios de ligação diferentes, o anticorpo, fragmento funcional de anticorpo ou sonda denomina-se um anticorpo "biespecífico".

A mutagénesse sítio-dirigida e mediada por PCR que resulta em substituições de aminoácidos pode ser usada para introduzir mutações nas regiões CDR que melhoram a afinidade, ao mesmo tempo que preservam a especificidade do anticorpo da invenção.

Em algumas formas de realização, o anticorpo, fragmento funcional do anticorpo ou sonda da invenção é conjugado/conjugada ou fundido/fundida a um ou mais agentes de diagnóstico, ou agente terapêutico ou qualquer outra molécula desejada. O anticorpo, fragmento funcional do anticorpo ou sonda conjugado/conjugada resultante pode ser útil para monitorizar ou diagnosticar o surgimento, desenvolvimento, progressão e/ou gravidade de uma doença associada à expressão do STn ou de glicanos sialilados alfa-2,6.

Como exemplo, mas sem se limitar ao mesmo, o anticorpo pode ser conjugado a um agente terapêutico para induzir a morte de células ou outro efeito. Um agente terapêutico pode ser um fármaco quimioterápico; um taxano; um antimetabolito, um agente alquilante, um antibiótico, um agente antimitótico, uma hormona, um análogo de nucleosídeo, um inibidor de

quinases, um ião metálico radioativo, uma toxina, uma citocina, ou um agente antiangiogénico.

O anticorpo ou fragmento funcional da invenção também pode ser usado para detetar a expressão do sTn ou de glicanos sialilados alfa-2,6 em qualquer amostra biológica usando métodos imuno-histológicos clássicos ou imunoensaios, tais como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e o radioimunoensaio (RIA), citometria de fluxo, e *immunoblotting*.

O anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo da invenção pode ser incluído/incluída isoladamente ou conjugado/conjugada ou em combinação numa composição farmacêutica, fornecido/fornecida numa concentração eficaz, de modo a exercer um efeito terapêuticamente útil, com efeitos secundários mínimos.

Resumo da invenção

A presente invenção fornece um anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo que se ligam de forma específica ao sialil-Tn (STn) e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6.

O anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo liga(m)-se ao sítio de ligação ao antigénio. Um exemplo de sequências nucleotídicas que codificam as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves, são as SEQ ID N° 1 e 2, respetivamente.

O anticorpo foi obtido após imunização de ratinhos com

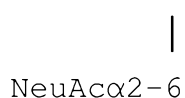
mucinas contendo sialil-Tn (STn). As sequências nucleotídicas foram derivadas do anticorpo monoclonal L2A5. Uma sequência nucleotídica fornece a região variável das cadeias pesadas (VH) (SEQ ID N° 1) e compreende a H-CDR1 (GGCTACTCCATCACCCAGTGGTTATTAC, SEQ ID N° 12 de aminoácidos), H-CDR2 (ATAAACTACGACGGTAGCAAT, SEQ ID N° 14 de aminoácidos), e H-CDR3 (GCAAGAGGGGGGGACTAC, SEQ ID N° 16 de aminoácidos). Uma sequência nucleotídica fornece uma região variável das cadeias leves (VL) (SEQ ID N° 2) que compreende as regiões determinantes da complementaridade (CDR): L-CDR1 (TCAAGTGTAAGTTAC, SEQ ID N° 6 de aminoácidos), L-CDR2 (GACACATCC, SEQ ID N° 8 de aminoácidos), e L-CDR3 (CAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCCATGCTCACG, SEQ ID N° 10 de aminoácidos).

A combinação da L-CDR1, L-CDR2, e L-CDR3 das cadeias leves e da H-CDR1, H-CDR2, e H-CDR3 das cadeias pesadas gera sequências únicas que codificam sequências peptídicas que reconhecem não apenas o antigénio dissacarídico STn, mas inesperadamente, reconhece também um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos alfa-2,6, também sobreexpressos no cancro. Estas sequências peptídicas são usadas para gerar outros anticorpos, fragmentos funcionais de anticorpos ou sondas. Este grupo global de glicanos reconhecidos pelos anticorpos, fragmentos funcionais dos anticorpos ou sondas compreende o

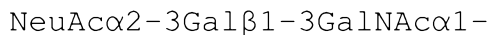
Sialil-Tn:



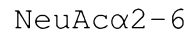
2,6-sialil-T:



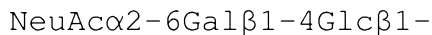
dissialil-T:



|



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



Os anticorpos com tal especificidade são particularmente interessantes por causa da sua alta especificidade para tumores e reatividade baixa ou ausente com células normais, ao contrário dos anticorpos e terapias anticancerígenas à base de anticorpos existentes.

O polinucleotídeo isolado da invenção também pode incluir uma sequência de ácidos nucleicos aqui fornecida, em que a sequência de ácidos nucleicos codifica os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo, fragmentos funcionais do anticorpo ou sondas. Exemplos da sequência de ácidos nucleicos são as SEQ ID N° 1 e 2, respetivamente.

Num outro aspeto, a presente invenção fornece um anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo que se liga(m) de forma específica ao STn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6 para uso num método de deteção de um tumor num sujeito.

Em algumas formas de realização, a invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem o anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Numa outra forma de realização, a invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem o anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo que bloqueiam interações célula-célula ou recetor-ligando.

Em algumas formas de realização, a invenção fornece um método para tratar ou prevenir uma doença num sujeito com necessidade, por meio da administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica da invenção.

Sem intenções de limitar a divulgação do presente documento, esta divulgação apresenta figuras em anexo de formas de realização ilustradas para uma compreensão mais fácil.

Descrição das figuras

A Figura 1 mostra o título e a ligação do anticorpo L2A5 a mucinas animais utilizando ELISA indireta. A titulação do anticorpo foi efetuada utilizando várias concentrações de revestimento de mucinas submaxilares bovinas (BSM) previamente tratadas ou não com sialidase. O tampão fosfato foi usado como controlo negativo e a ligação do anticorpo anti-STn B72.3 às BSM como controlo positivo. A ligação do mAb L2A5 foi detetada com IgG de cabra antirratinho conjugada a peroxidase de rábano.

A Figura 2 mostra a ligação do L2A5 à superfície celular de células tumorais. A ligação do anticorpo L2A5 foi avaliada por citometria de fluxo e usando linhas celulares cancerígenas transduzidas ou não (alelo selvagem) com o gene ST6GalNAc1 e que deste modo sobreexpressam o antigénio STn.

A figura mostra um histograma representativo da contagem relativa de células ligadas ao anticorpo L2A5 na linha celular de cancro da mama WT e STn positiva MDA-MB-231. Utilizou-se anticorpos 3F1 (anticorpos anti-STn) ou o anticorpo secundário antirratinho conjugado com FITC, Ig-FITC (perfil a cinzento). Para avaliar a especificidade da ligação a antigénios silalilados, as linhas celulares que expressam STn foram dessialiladas por tratamento com sialidase. As linhas sólidas e a tracejado representam os histogramas para células tratadas e não tratadas com sialidase, respetivamente. O eixo dos X representa a fluorescência, relacionada com a expressão do STn.

A Figura 3 mostra a reatividade do anticorpo L2A5 com proteínas ligadas à membrana e com Mucina humana recombinante 1 (MUC1). Análise por *Western blot* dos anticorpos anti-STn 3F1 e L2A5 que se ligam a extratos de membrana da linha celular MDA-MB-231 que expressa o STn e a proteína quimérica da MUC1 fortemente decorada com STn mais a região do Fc de Ig humana. Os extratos de membrana de MDA-MB-231 STn⁺ (A) e a proteína quimérica de MUC1 STn-IgG (B) foram corados com anticorpos 3F1 e L2A5. Para além do *blotting* de extratos de membrana não tratados e de proteína quimérica (NT), dessialilou-se amostras de extratos de membrana usando sialidase (T) ou usou-se proteína MUC1 STn-IgG não glicosilada (Ung).

A Figura 4 mostra a reatividade do anticorpo L2A5, medida por imuno-histoquímica em tecidos de cancro da bexiga embebidos em parafina; a) a coloração com L2A5 (esquerda) apresenta uma elevada extensão e forte intensidade, enquanto que os mAb B72.3 (meio) e TKH2 (direita) que se ligam apenas ao STn, mostram menos sensibilidade, transduzida em fraca intensidade e reduzida extensão de coloração específica. b)

Sensibilidade de L2A5 em comparação com anticorpos disponíveis. O L2A5 (esquerda) reconhece uma quantidade reduzida de antigénio (setas), ao contrário do B72.3 (meio) e TKH2 (direita) que apresentam reatividades diferentes nas mesmas regiões. c) Efeito do tratamento com sialidase de tecidos cancerígenos na reatividade do anticorpo. Após tratamento com sialidase e incubação com L2A5, a coloração conferida pelo L2A5 desaparece completamente. Esquerda: sem sialidase; Direita: com sialidase.

A Figura 5 mostra a reatividade do anticorpo L2A5, medida por imuno-histoquímica em tecidos de cancro colorretal embebidos em parafina. A figura mostra a reatividade do L2A5 em comparação com anticorpos contra o antigénio STn. O L2A5 (esquerda) apresenta um aumento da reatividade em termos de extensão e de intensidade em comparação com a reatividade do B72.3 (meio) e o TKH2 (direita).

A Figura 6 mostra a reatividade do anticorpo L2A5, por imuno-histoquímica em tecidos de cancro da bexiga embebidos em parafina. As figuras mostram evidências imuno-histoquímicas de elevada especificidade do anticorpo L2A5 em comparação com os anticorpos anti-STn B72.3 e TKH2. a) - Especificidade tumoral do L2A5 numa amostra de cancro da bexiga metastático. O L2A5 está principalmente presente em células tumorais (setas), não existindo coloração na população linfocitária, vasos e tecidos conjuntivos. b) - reatividade dos anticorpos L2A5 (esquerda) e B72.3 (direita) em tecidos colorretais normais. O L2A5 apresenta uma reatividade fraca com enterócitos (seta, esquerda), enquanto que o B72.3 reage com as células caliciformes (direita).

A Figura 7 mostra as sequências de antigénios glicanos ligados ao anticorpo L2A5. A especificidade do glicano foi

determinada por meio de análise de *microarray* de glicanos.

A Figura 8 mostra a capacidade antitumoral *in vivo* de um módulo-alvo (TM) composto por uma unidade contendo aminoácidos codificados pelos ácidos nucleicos do L2A5, objeto da presente invenção. O TM derivado do L2A5 é um fragmento de anticorpo e tem a mesma reatividade que o L2A5, isto é, TM anti-STn. A morte de células STn positivas através de células T UniCAR foi específica do alvo e estritamente dependente da presença do TM.

A Figura 9 mostra a capacidade antitumoral *in vivo* de um módulo-alvo (TM) composto por uma unidade contendo aminoácidos codificados pelos ácidos nucleicos do L2A5, objeto da presente invenção. O TM derivado do L2A5 é um fragmento de anticorpo e tem a mesma reatividade que o L2A5, isto é, TM anti-STn. A transferência adotiva do TM anti-STn e das células T UniCAR (Koristka *et al* 2014) para um modelo animal que expressa tumores STn+ mostra a erradicação eficaz e dependente do TM dos tumores STn positivos. A Figura 8 mostra que a utilização de células T UniCAR armadas com TM específicos para o antígeno STn mata células tumorais. A análise estatística foi efetuada usando a ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de Bonferroni (** $p < 0,01$).

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção fornece um anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo que se ligam de forma específica ao STn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6.

O anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo liga-se ao sítio de ligação do antigénio. Um exemplo de sequências nucleotídicas que codificam as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves, são as SEQ ID N° 1 e 2, respetivamente.

O polinucleotídeo isolado da invenção também pode incluir uma sequência de ácidos nucleicos fornecida no presente documento, em que a sequência de ácidos nucleicos codifica o domínio variável das cadeias pesadas e leves do anticorpo, fragmentos funcionais do anticorpo ou sondas.

A presente invenção fornece ainda composições para produzir um anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo que se ligam de forma específica ao STn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6.

As composições incluem sequências nucleotídicas que codificam o sítio de ligação ao antigénio de um anticorpo, de um fragmento funcional de um anticorpo ou de sondas. As composições incluem sequências nucleotídicas que codificam as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves.

O polinucleotídeo isolado da invenção também pode incluir uma sequência de ácidos nucleicos fornecida no presente documento, em que a sequência de ácidos nucleicos codifica o domínio variável das cadeias pesadas e leves do anticorpo, fragmentos funcionais do anticorpo ou sondas.

Num outro aspeto, a presente invenção fornece um anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo que se liga(m) de forma específica ao STn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos

ligados em alfa-2,6 para uso num método de detecção de um tumor num sujeito.

Em algumas formas de realização, a invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem as sequências nucleotídica que codificam o anticorpo, fragmentos funcionais do anticorpo ou sondas da invenção e um veículo farmacologicamente aceitável.

Numa outra forma de realização, a invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem as sequências nucleotídicas que codificam o anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo que bloqueiam interações célula-célula ou recetor-ligando.

Em algumas formas de realização, a invenção fornece um método para tratar ou prevenir uma doença num sujeito com necessidade, por administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica da invenção.

O método compreende as seguintes etapas:

- a) Coloração de uma amostra biológica obtida de um sujeito que possui possivelmente um tumor com um anticorpo que se liga de forma específica ao STn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6, em que a coloração mencionada é feita sob condições adequadas para a ligação específica do anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo ao STn, 2,6-sialil-T, dissialil-T ou 2,6-sialolactosamina;
- b) E em que a presença ou a ausência da ligação do anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo é indicativa da presença ou da ausência de células tumorais que expressam STn, 2,6-sialil-

T, dissialil-T ou 2,6-sialolactosamina na superfície celular.

Amostra biológica, tal como utilizada no presente documento, compreende células isoladas, ou tecido, ou proteínas derivadas de tumores.

Os glicanos sialilados são sobreexpressos em vários tipos de células cancerígenas em comparação com as correspondentes células saudáveis, onde a sua expressão é negligenciável. As frequências de STn mais elevadas são encontradas nos cancros do pâncreas, colorretal e dos ovários, onde quase 100% das células cancerígenas expressam o STn (Julien *et al* 2012). A frequência em cancros da bexiga é de 75% (Ferreira *et al* 205). O adenocarcinoma dos pulmões expressa aproximadamente 80% e o cancro cervical, colangiocarcinoma, cancro esofágico, do cólon e da mama têm frequências entre 50 e 70%. Para além disso, a sobreexpressão do STn ocorre prematuramente na carcinogénese e a perda da diferenciação celular, que participa frequentemente numa classificação de grau histológico elevado, modula de forma positiva a expressão do STn (Julien *et al*).

Os glicanos sialilados podem ser alvo de direcionamento por parte de anticorpos, fragmentos funcionais de anticorpos ou sondas com alta afinidade e especificidade. A presente invenção fornece ainda composições para produzir anticorpos, fragmentos funcionais de anticorpos ou sondas que se ligam ao STn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos alfa-2,6.

Estas composições foram obtidas por imunização de ratinhos Balb/c fêmea com 6 semanas de idade com mucinas de soro ovino, utilizando métodos tais como os descritos no exemplo I.

Selecionou-se o soro de ratinhos que mostrou reatividade com linhas celulares STn positivas, mucinas STn positivas ou lisados de células, por meio de métodos tais como os descritos nos exemplos II ou III ou VI. Os esplenócitos desses ratinhos imunizados que apresentaram soro com reatividade com o STn foram colhidos e fundidos com uma célula de mieloma (Sp2/0) para se obter uma célula de hibridoma imortalizada que expressa anticorpos.

Os métodos para a técnica do hibridoma, tais como o descrito no exemplo IV, estão bem descritos na técnica.

Os sobrenadantes dos hibridomas foram testados quanto à presença de anticorpos contra o STn por meio de métodos tais como os descritos nos exemplos II ou III ou VI. Expandiu-se hibridomas selecionados para a produção e caracterização de anticorpos.

Dos vários mAb anti-STn obtidos, o mAb L2A5 foi selecionado como candidato principal e utilizado para análise adicional. A reatividade contra proteínas mucina com um teor elevado de STn e o título de anticorpo do mAb L2A5 foi determinada por utilização de métodos tais como o descrito no exemplo II e está representada na Figura 1. Para além disso, a dessialilação por meio de tratamento com sialidase foi efetuada para avaliar o reconhecimento de estruturas sialiladas pelo anticorpo L2A5. Tal como se mostra na Figura 1, a reatividade do mAb L2A5 aumenta com a concentração de mAb de forma logarítmica. Observou-se uma imunorreatividade elevada com as BSM, atingindo-se o título no ponto final de 6000. Adicionalmente, o tratamento com sialidase demonstrou de forma clara uma redução da reatividade deste anticorpo com as BSM, mostrando a ligação específica e dependente a estruturas sialiladas. É de realçar que em métodos semelhantes aos descritos no exemplo II, mas em que as

proteínas mucina que possuem STn foram substituídas por mucinas dessialiladas (asialo), o anticorpo L2A5 não apresentou qualquer reatividade.

Os glicanos sialilados são sobreexpressos em células cancerígenas e podem ser alvo de direcionamento por parte de anticorpos, fragmentos funcionais de anticorpos ou sondas com elevada afinidade e especificidade.

A presente invenção fornece composições para produzir um anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo que se ligam ao STn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos alfa-2,6.

A glicosilação é crítica para a qualidade e o desenvolvimento de mAbs terapêuticos. Os padrões de glicosilação variam com as condições selecionadas do sistema de expressão ou cultura, com um impacto significativo na sua farmacocinética e farmacodinâmica. O controlo da glicosilação é, por conseguinte, essencial para assegurar a segurança e a eficácia das moléculas. Para o direcionamento terapêutico de células cancerígenas, a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC), fagocitose mediada por células dependente de anticorpo (ADCP) e a apoptose direta de células são críticas para a eficácia.

Os MAbs produzidos na linha celular murina de mieloma SP2/0 podem adicionar açúcares que não são encontrados naturalmente em IgG humanas normais, com impacto em termos da imunogenicidade.

Numa forma de realização da presente invenção, as mudanças na composição de glicanos de uma molécula de IgG são efetuadas nos sítios de glicosilação Asn88 e Asn297 através da manipulação dos resíduos de manose, ácidos siálicos, fucose e galactose com a finalidade de aumentar a eficácia

do anticorpo terapêutico (revisão em Liming Liu 2015).
Numa forma de realização, os anticorpos não humanos podem ser humanizados, o que se refere à construção de imunoglobulinas quiméricas que contêm a sequência de aminoácidos de interesse derivada do anticorpo não humano original (p.ex, o anticorpo de ratinho) incluída numa imunoglobulina humana (anticorpo recetor). Nos anticorpos humanizados, os resíduos de aminoácidos das CDR do anticorpo humano são substituídos por resíduos das CDR de uma espécie não humana (p.ex. o anticorpo de ratinho) com a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em geral, os anticorpos humanizados compreenderão pelo menos um, e tipicamente dois, domínio(s) variável/variáveis, no(s) qual/quais todas ou quase todas as regiões CDR correspondem às de um anticorpo não humano, e todas ou parte das regiões FR são as de uma imunoglobulina humana.

Numa forma de realização, células imunes tais como as células T são modificadas para expressar o anticorpo (todo ou parte dele) ou recetores que se ligam a um anticorpo, isto é, recetores de antigénios quiméricos (CAR). Os CAR são moléculas que combinam a especificidade de um anticorpo para um antigénio desejado (p.ex., antigénio tumoral) com um domínio intracelular ativador do recetor de uma célula T para gerar um recetor quimérico que apresenta uma atividade imune celular antitumoral específica.

Numa forma de realização, o domínio de reconhecimento do antigénio destas células T modificadas liga-se a um antigénio associado ao tumor. Numa forma de realização, refere-se à transferência celular adotiva de células T modificadas para expressar um CAR.

Um CAR pode ser produzido utilizando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo mas não se

limitando à utilização de endonucleases guiadas pelo RNA, em particular o sistema Cas9/CRISPR, células T especificamente manipuladas para expressar CAR (WO 2014191128 A1). Numa outra forma de realização, é usado um módulo-alvo composto por uma unidade de ligação específica para uma determinada proteína humana da superfície celular e uma etiqueta, em que a etiqueta é derivada de qualquer proteína nuclear humana, de preferência da proteína nuclear humana La (WO2016030414 A1).

Da mesma forma, o anticorpo ou fragmento funcional do referido anticorpo da invenção poderia estar ligado a nanopartículas, inserido na membrana de lipossomas a fim de ser usado como vetor específico para a entrega *in situ* de compostos tóxicos e induzindo a apoptose, bem como de iões metálicos úteis para a terapia de hipertermia.

As composições para produzir um anticorpo, fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo da presente invenção foram obtidas por imunização de ratinhos Balb/c fêmea com 6 semanas de idade com mucinas de soro ovino, usando métodos tais como os descritos no exemplo I. Selecionou-se o soro de ratinhos que mostrou reatividade com linhas celulares STn positivas, mucinas STn positivas ou lisados de células, por meio de métodos tais como os descritos nos exemplos II ou III ou VI. Os esplenócitos desses ratinhos imunizados que apresentaram soro com reatividade com o STn foram colhidos e fundidos com uma célula de mieloma para se obter uma célula de hibridoma imortalizada que expressa anticorpos anti-STn. Os métodos para a técnica do hibridoma, tais como o descrito no exemplo IV, estão bem descritos na técnica.

Os sobrenadantes dos hibridomas foram triados quanto à presença de anticorpos contra o STn por meio de métodos tais como os descritos nos exemplos II ou III ou VI. Expandiu-se

os hibridomas selecionados para a produção e caracterização de anticorpos.

Dos vários mAbs anti-STn obtidos, o mAb L2A5 foi selecionado como candidato principal e utilizado para análise adicional. A reatividade contra proteínas mucina com um teor elevado de STn e o título de anticorpo do mAb L2A5 foi determinada por utilização de métodos tais como os descritos no exemplo II e está representada na Figura I. Para além disso, a dessialilação por meio de tratamento com sialidase foi efetuada para avaliar o reconhecimento de estruturas sialiladas pelo anticorpo L2A5. Tal como se mostra na Figura 1, a reatividade do mAb L2A5 aumenta com a concentração de mAb de forma logarítmica.

Observou-se uma imunorreatividade elevada com as BSM, atingindo-se o título no ponto final de 6000. Adicionalmente, o tratamento com sialidase demonstrou de forma clara uma redução da reatividade deste anticorpo com as BSM, mostrando a ligação específica e dependente a estruturas sialiladas. É de realçar que em métodos semelhantes aos descritos no exemplo II, mas em que as proteínas mucina que possuem STn foram substituídas por mucinas dessialiladas (asialo), o anticorpo L2A5 não apresentou qualquer reatividade.

A ligação do mAb L2A5 a células cancerígenas viáveis MDA-MB-231 foi confirmada utilizando métodos tais como descritos no exemplo III. Como modelo, foram utilizadas células cancerígenas MDA-MB-231 que expressam o antigénio STn, devido à sobreexpressão do gene ST6GalNAc1. Tal como se mostra na Figura 2, o mAb L2A5 mostra uma elevada reatividade com 80 a 88% das células STn⁺. A reatividade diminuiu consideravelmente após tratamento das linhas celulares cancerígenas com sialidase. Tal como também se mostra na Figura 2, o L2A5 não apresentou qualquer ligação a células cancerígenas MDA-MB-231 do tipo selvagem, as quais não

expressam o antígeno STn. Tomados conjuntamente, estes resultados confirmaram a especificidade e seletividade do mAb L2A5 contra o antígeno STn presente à superfície de células cancerígenas. Tal como também representado na Figura 2, outros anticorpos anti-STn que também reagem com o STn, apresentam perfis de ligação ligeiramente distintos em relação à linha celular cancerígena MDA-MB-231.

Para confirmar a especificidade da ligação do mAb L2A5 a proteínas de membrana que possuam STn, foram efetuados ensaios como os descritos no exemplo VI. Tal como se mostra na Figura 3, o mAb L2A5 reagiu com proteínas derivadas da linha celular MDA-MB-231 que sobreexpressa a ST6GalNAc1, e, por conseguinte, o STn. O perfil mostrou reatividade com proteínas com os pesos moleculares acima de 245 kDa e aproximadamente 160, 85, 50 e 40 kDa. Após dessialilação das proteínas de membrana, observa-se uma diminuição ou supressão da reatividade, confirmando a ligação do mAb L2A5 a proteínas sialiladas. As proteínas de membrana derivadas das células cancerígenas do tipo selvagem, que não expressam o antígeno STn, não forneceram reatividade positiva com o mAb L2A5. Tal como também se mostra na Figura 3, o L2A5 apresentou uma ligação forte à MUC1 STn-IgG (aproximadamente 180 kDa) mas não à MUC1 STn-IgG glicosilada. Tomados conjuntamente, os resultados indicam que o mAb L2A5 reconhece o antígeno STn em extratos de membrana de células cancerígenas que expressam o STn, bem como em proteínas transportadoras de STn tais como a MUC1.

Corou-se uma série de 30 casos com 15 tumores da bexiga (oito cistectomias e sete metástases) e 15 tumores colorretais (adenocarcinomas e adenomas) com L2A5 e dois mAb anti-STn. Tal como se mostra na Figura 4, todos os tumores da bexiga deram positivo para todos os mAb analisados no que se refere

aos casos de metástases. Três deles deram positivo e três deram negativo para os mAb L2A5, B72.3 e TKH2. Um caso apresenta uma coloração reduzida com o L2A5 e não com os outros mAb. Note-se que houve uma sensibilidade ligeiramente superior de deteção antigénica para o L2A5. Tal como se mostra na Figura 4, enquanto que o TKH2 e o B72.3 apresentam uma reatividade semelhante, o L2A5 revela uma reatividade superior em casos de cancro da bexiga. Esta especificidade e sensibilidade foram anuladas após tratamento enzimático do tecido cancerígeno com sialidase.

Tal como se mostra na Figura 5, todos os casos de cancro colorretal deram positivo para mAb anti-STn e para o L2A5, mas apresentaram padrões diferentes em termos de extensão e intensidade. A ligação do L2A5 (esquerda) mostra uma intensidade e extensão semelhantes para a maior parte dos tecidos patológicos (aproximadamente 70%), em comparação com o padrão de coloração com B72.3 (meio) ou TKH2 (direita).

Tal como se mostra na Figura 6 a), na amostra de cancro metastático da bexiga o L2A5 é principalmente reativo com células tumorais e não com população linfocitária, vasos ou tecidos conjuntivos. Na Figura 6 b), tecidos normais de cancro colorretal, o L2A5 (esquerda) apresenta coloração não específica nos enterócitos, enquanto que o B72.3 (direita) reage com células calciformes.

No modelo do tumor da bexiga, a coloração com L2A5 é exclusiva de tumores. O L2A5 apresenta uma mancha específica nas células tumorais uroteliais, incluindo manchas adicionais em sítios invasivos e de metástase com baixa densidade de STn.

Nas amostras colorretais, o L2A5 reage com os tecidos cancerígenos, mas também com tecido não patológico. A coloração está localizada essencialmente nos enterócitos,

enquanto que a coloração não específica obtida com o B72.3 ou o TKH2 está presente nas células calciformes. Nas amostras colorretais, não há qualquer localização específica para as manchas, embora o L2A5 seja capaz de detetar a presença de coloração fraca no tecido displásico com L2A5.

Para examinar a especificidade da ligação a hidratos de carbono mais em detalhe, foram analisados anticorpos usando *microarrays* de glicanos constituídos por sondas de glicanos estruturalmente diversas impressas numa superfície sólida adequada. Os resultados confirmaram a especificidade com reconhecimento seletivo do STn, mas também se observou ligação a:

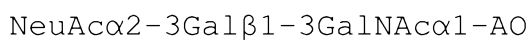
Sialil-Tn:



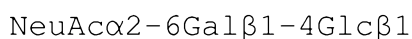
2,6-sialil-T:



dissialil-T:



2,6-sialolactosamina:



e a ausência virtual de ligação a outras sequências de antigénios que estavam presentes no *microarray*. As sequências ligadas estão resumidas na Figura 7.

Para determinar a sequência de aminoácidos das regiões variáveis das CDR (SEQ ID N° 6, 8, 10, 12, 14, 16) e FR (SEQ ID N° 5, 7, 9, 11, 13, 15) das cadeias leves e pesadas do mAb L2A5, foi utilizado um método descrito no exemplo IX.

Exemplos

Os exemplos que se seguem são fornecidos meramente como ilustrativos de vários aspectos da presente divulgação e não devem ser interpretados como limitativos da divulgação de forma alguma. Eles referem-se à caracterização, seleção e produção de anticorpos.

EXEMPLO I

Produção de Anticorpos - Imunizações

São fornecidos métodos exemplificativos da produção de anticorpos, mas qualquer outro método-padrão pode ser utilizado.

A produção de anticorpos monoclonais (mAbs) foi efetuada de acordo com a tecnologia do hibridoma. Imunizou-se intraperitonealmente ratinhos Balb/c fêmea com 6 semanas de idade (Harlan, RU) com 10 µg de mucina submaxilar ovina (OSM) emulsionada 1:1 (V/V) com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich), tendo-se seguido 2 injeções adicionais de OSM emulsionada com adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) com intervalos de 21 dias. Recolheu-se amostras de sangue das bochechas dos ratinhos e o soro recolhido foi testado quanto à especificidade da ligação ao STn por ELISA. Se o soro apresentasse a resposta imune desejada e específica, efetuava-se uma injeção de impulso final aos ratinhos correspondentes três dias antes de serem mortos e dos baços serem recolhidos.

EXEMPLO II

ELISA

As titulações do soro dos ratinhos e a avaliação de sobrenadantes dos hibridomas foram determinadas por ELISA contra mucina submaxilar bovina (BSM), uma proteína que expressa o STn. Os poços de uma placa de 96 poços foram revestidos com 50 µL de BSM (3 µg/mL) dissolvida em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) e incubados durante a noite a 4 °C. Para avaliar a ligação específica dos sobrenadantes de hibridomas testados a estruturas sialiladas, adicionou-se 50 µL de sialidase, de *Clostridium perfringens* (Roche), a 25 mU/mL diluída em tampão sialidase (Na₂HPO₄ 10 mM, pH=6,0) a um subconjunto de poços e incubou-se durante 90 min a 37 °C. Após tratamento com sialidase, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), seguindo-se o bloqueamento com leite em pó desnatado a 5%, durante 60 min. Depois das lavagens com PBS-T, adicionou-se os soros de ratinho diluídos ou os sobrenadantes dos hibridomas aos poços e incubou-se durante 90 min. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T, seguindo-se a incubação com Ig de cabra antirratinho conjugada com peroxidase de rábano (HRP) (1:1000) (BD Pharmingen) durante 60 min. Após três etapas de lavagem adicionais, juntou-se a cada poço 50 µL de substrato de tetrametilbenzidina (Thermofisher Scientific), incubou-se as placas no escuro e terminou-se a reação por adição de 50 µL de HCl 1 M. A Densidade Ótica foi medida a 450 nm num leitor de microplacas. O ratinho que produziu o título mais elevado de anticorpos de interesse foi selecionado para fusão. Para testar a produção de anticorpos de células de hibridoma, utilizou-se o mesmo procedimento.

EXEMPLO III

Preparação da citometria de fluxo e análise

A ligação dos anticorpos ou dos sobrenadantes dos hibridomas foi determinada por citometria de fluxo usando linhas celulares humanas da bexiga e mama que expressavam de forma estável o STn e células parentais que não expressavam o STn. Colheu-se aproximadamente 3×10^5 células por condição e voltou-se a suspender em tampão PBS. Para avaliar a ligação específica dos sobrenadantes de hibridomas testados e dos anticorpos a estruturas sialiladas, as amostras foram tratadas com sialidase a 100 mU/mL, durante 90 min a 37 °C. Após tratamento com sialidase, as células foram lavadas e incubadas durante 30 min a 4 °C com os mAb anti-STn B72.3, 3F1, TKH2 os e sobrenadantes de hibridomas. Efetuou-se etapas de lavagem posteriores, e detetou-se anticorpos primários com Ig antirratinho conjugada com FITC (Dako; diluição de 1:10) durante 15 min no escuro. Após lavagem, os dados de cada amostra foram adquiridos usando um Citómetro de Fluxo para cada amostra.

Exemplo IV

Produção de Anticorpos - Tecnologia do Hibridoma

Misturou-se esplenócitos dos ratinhos imunizados com células de mieloma Sp2/0 (ATCC, EUA) a uma razão de 3:1 e fundiu-se na presença de polietilenoglicol/dimetilsulfóxido usando um protocolo-padrão. As células foram então distribuídas em microplacas de fundo plano de 96 poços (Orange Scientific) e mantidas em meio RPMI suplementado com HAT (Hipoxantina 1×10^{-4} M, Aminopterin 4×10^{-7} M, Timidina $1,6 \times 10^{-5}$ M, Sigma-Aldrich), FBS a 10%, L-glutamina 2 mM, Gentamicina a 0,2 mg/mL (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio 1 mM (Gibco), MEM com aminoácidos não essenciais a 1% (v/v) (Gibco), e incubadas a 37 °C durante 7-12 dias. As células de hibridoma que produziram anticorpos reativos com BSM foram expandidas e testadas por ELISA indireta, e clonadas pelo método da diluição limitada pelo menos três vezes para se obter linhas

celulares estáveis de um único clone. Cultivou-se hibridomas selecionados no meio de seleção sem suplementação com HAT a 37 °C. Um hibridoma L2A5 específico das estruturas sialiladas, particularmente o STn, foi selecionado e clonado por diluição limitante quatro vezes.

EXEMPLO V

Análise imuno-histoquímica da expressão do STn

Obteve-se uma série de 30 casos com 15 tumores colorretais (adenocarcinomas e adenomas) e 15 tumores da bexiga (oito cistectomias e sete metástases), de acordo com o comité local de ética. Para além disso, incluiu-se cinco casos de tecido colorretal normal adjacente a tumores. Foram testados tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) para a presença de STn por imuno-histoquímica (IHC) usando o sistema de biotina/estreptavidina. Resumidamente, desparafinizou-se secções de tecido FFPE com xileno, rehidratou-se com uma série graduada de lavagens com álcool e submeteu-se a recuperação do antigénio induzida pelo calor usando tampão citrato pH 6,0 (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 min no micro-ondas, após pré-aquecimento da solução à potência máxima durante 5 minutos. As secções foram incubadas com peróxido de hidrogénio a 0,3% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) durante 25 min, bloqueadas com UV Block® (Thermo Scientific, Fremont, EUA) e incubadas durante a noite a 4 °C numa câmara húmida com os mAb anti-STn B72.3, TKH2 (Kjeldsen *et al.*, 1988) e L2A5. Após lavagem com PBS-Tween, adicionou-se anticorpo secundário a secções de tecido antes da incubação com estreptavidina. O STn foi visualizado por incubação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB ImmPACT™) (Vector, Burlingame, EUA) durante 4 min. Finalmente, o núcleo foi contracorado com hematoxilina durante 1 min. A expressão do STn foi avaliada usando o sobrenadante das culturas de hibridomas com os mAb anti-STn B72.3, TKH2 e L2A5, diluídos

1:5; 1:5 e 1:3 em BSA a 5% em PBS, respetivamente. Testou-se em paralelo secções de controlo positivas e negativas. As secções de controlo negativo foram efetuadas isentas de anticorpo primário. Usou-se tecidos tumorais STn⁺ como controlos positivos. Os tumores foram classificados como positivos quando se observou imunorreatividade do anticorpo anti-STn TKH2 por meio da presença microscópica de produto cromogénico castanho em células tumorais. A expressão do STn e a coloração com L2A5 foram avaliadas através de ensaio duplo-cego por dois observadores independentes, e validadas por um patologista com experiência. Sempre que houve discordância, as lâminas foram revistas, e atingiu-se consenso. De forma a avaliar a especificidade do anticorpo, efetuou-se um tratamento com sialidase após a incubação com peróxido de hidrogénio, em que os ácidos siálicos são removidos do antigénio STn, eliminando assim o reconhecimento pelo anticorpo. Por conseguinte, a coloração positiva após este tratamento enzimático (4 h a 37 °C; 0,2 U/mL) foi considerada como não específica.

EXEMPLO VI

Western Blot (WB)

As proteínas de membrana foram isoladas de linhas celulares usando *Kits* de Extração de Proteínas de Membrana, de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de proteína obtida foi estimada usando *Kits* de Ensaio de Proteínas, seguindo as recomendações do fabricante. Os extratos de proteínas de membrana (50 µg) ou proteínas purificadas contendo STn (1 µg) - BSM e MUC1 STn-IgG- foram desnaturados e carregados em gel de acrilamida com gradiente de 8%, submetidos a eletroforese SDS-PAGE sob condições redutoras e transferidos eletroforeticamente para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (PVDF de 0,2 µm, Amersham Hybond P, GE Healthcare Life Sciences) de acordo com

procedimentos-padrão. As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 10% em TBS Tween a 0,1% (TBS-T) durante 1 h, seguindo-se incubação com sobrenadante dos anticorpos primários anti-STn B72.3, 3F1 ou L2A5 diluído em TBS-T durante a noite a 4 °C. Após lavagem com TBS-T, revelou-se as proteínas marcadas usando Ig de cabra antirratinho conjugada com HRP diluída de 1:2500 em TBS-T durante 1 h. Após lavagem, as proteínas marcadas foram reveladas com Substrato de *Western Blotting* Lumi-Light (Roche), e de seguida expostas a um filme de Raios X.

EXEMPLO VII

Isolamento de mRNA e Síntese de cDNA

Usou-se entre 1×10^6 e 5×10^6 células de hibridoma para o isolamento de RNA. As células foram centrifugadas durante 5 min a 300xg e o sobrenadante rejeitado. Lavou-se os "pellets" de células com PBS e isolou-se o RNA total usando o *Kit* Miniprep de RNA Total de Mamíferos GenElute™ (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado usando Nanodrop e utilizou-se até 2 µg para a transcrição reversa, tal como descrito no *Kit* de Transcrição de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems). A síntese do cDNA foi efetuada usando as seguintes condições de ciclização térmica: 25 °C durante 10 min, seguidos de 37 °C durante 120 min e 85 °C durante 5 s. As reações foram finalmente efetuadas e arrefecidas a 4 °C.

EXEMPLO VIII

Sequenciamento de Anticorpos - fragmentos scFv

Os domínios variáveis das cadeias pesadas (V_H) e leves (V_L) do MAbs L2A5 foram amplificados a partir do cDNA usando o par de

	iniciadores	V_H	Direto
(TTTTTGGATCCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG) /			Reverso
(ATTGGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGATT)	e	V_L	Direto
(TTTTTGAATTCTGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA/		V_L	Reverso

(TTTTTGGGCCCGGATACAGTTGGTGCAGCATC). Todas as PCR foram efetuadas com o *Kit* PCR Advantage HF 2 (Clontech). Foram utilizadas as seguintes condições de ciclização térmica: fusão inicial a 94 °C durante 3 min, seguida de 95 °C durante 45 s, 70 °C durante 1 min, e 68 °C durante 2 min. As reações foram então mantidas a 68 °C durante 5 min e arrefecidas a 4 °C. Os produtos da PCR purificados foram ainda clonados no vetor de clonagem pGEM-Teasy (Promega), de acordo com protocolos do fabricante. Isolou-se os plasmídeos usando o *Kit QIAGEN plasmid plus midi* (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. O sequenciamento foi efetuado pelo SeqLab (Göttingen, Alemanha) usando o iniciador promotor T7 para o vetor pGEM-Teasy.

Estas composições podem ser produzidas com qualidade consistente para aplicações clínicas e de diagnóstico.

EXEMPLO IX

Domínios de anticorpos

As sequências nucleotídicas da região variável das cadeias pesadas (VH) e leves (VL) que codificam as sequências de aminoácidos dos domínios das CDR e FR do mAb L2A5 foram determinadas pesquisando o sistema de delineamento do domínio V IMGT (international ImMunoGeneTics database; <http://imgt.cines.fr>) usando a ferramenta de análise de sequências IgBLAST.

Exemplo X

Clonagem de ácidos nucleicos num módulo-alvo

O módulo-alvo (TM) anti-STn foi efetuado tal como descrito (Cartellieri *et al* 2016), mas substituindo as regiões CDR pelas sequências de ácidos nucleicos do LA25. Determinou-se a morte do tumor mediada pelas células T utilizando ensaios-padrão de libertação de crómio. Incubou-se linhas celulares MDA-MB-231 e MCR STn+ com células T enxertadas com o vetor

de controlo (estrutura do vetor que codifica apenas a proteína marcadora EGFP), construto de UniCAR Controlo (que carece de domínios de sinalização intracelular) ou construto de sinalização α -E5B9 (UniCAR 28/ ζ) (Mitwasi 2017). Ambas as linhas celulares foram cultivadas com as respetivas células T geneticamente modificadas na presença ou ausência de TM anti-STn 80 nM (TM a-STn) durante 24 h numa razão efetor para alvo (E:T) de 5:1.

Exemplo XI

Atividade antitumoral in vivo

Transduziu-se células STn MDA-MB-231 para expressarem luciferase de pirilampo (Luc), resultando em células STn-Luc MDA-MB-231. Efetuou-se um módulo-alvo (TM) anti-STn tal como descrito (Cartellieri *et al* 2016), mas substituindo as regiões CDR pelas sequências de ácidos nucleicos do LA25. Por ratinho, misturou-se $1,5 \times 10^6$ células tumorais com 1×10^6 células T UniCAR 28/ ζ e 10 μ g de TM anti-STn. Usou-se células STn-Luc MDA-MB-231 ($1,5 \times 10^6$) isoladamente ou misturadas com 1×10^6 células T UniCAR 28/ ζ sem TM como controlos não tratados. A mistura respetiva foi injetada subcutaneamente em ratinhos NMRI-Foxnlnu/Foxnlnu fêmea, o que resultou em três grupos de animais cada consistindo em cinco ratinhos. Efetuou-se uma imagiologia com luminescência dos ratinhos anestesiados 10 min após a injeção i.p. de 200 μ L de sal de potássio de D-luciferina (15 mg/mL), começando no dia 0 e seguindo-se nos dias 1, 3, 6 e 8.

A presente invenção irá fornecer novos produtos tanto para o mercado dos anticorpos como para a área da pesquisa/desenvolvimento do cancro.

Esta invenção fornece composições para produzir um anticorpo

ou fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo dirigido(s)/dirigidas contra um grupo de antigénios identificados em cancro.

A Tabela 1 mostra um exemplo da sequência nucleotídica das regiões variáveis das cadeias pesadas (VH) e leves (VL) do clone L2A5, identificada como SEQ ID N° 1 e 2, respetivamente, e da sequência de aminoácidos codificada das regiões variáveis das cadeias pesadas (VH) e leves (VL), identificada como SEQ ID N° 3 e 4, respetivamente.

Tabela 1: Exemplo da sequência nucleotídica e da sequência de aminoácidos codificada das regiões variáveis das cadeias leves (VL) e pesadas (VH) do clone L2A5.

SEQ ID Nº	Cadeia (mu)
1	Sequência nucleotídica da região variável das cadeias pesadas (VH)
2	Sequência nucleotídica da região variável das cadeias leves (VL)
3	Sequência de aminoácidos da cadeia VH
4	Sequência de aminoácidos da cadeia VL

A Tabela 2 mostra a sequência de aminoácidos codificada das seis regiões estruturais (FR) e seis regiões determinantes da complementaridade (CDR) (H-CDR1, H-CDR2 e H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3) para o clone L2A5 e que são identificadas como as sequências nucleotídicas das SEQ ID Nº 5 a 16.

Tabela 2: Sequência de aminoácidos codificada das três regiões estruturais (FR) e três regiões determinantes da complementaridade (CDR) (H-CDR1, H-CDR2 e H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3) para o clone L2A5.

SEQ ID Nº	Região
5	Sequência de aminoácidos da L-FR1
6	Sequência de aminoácidos da L-CDR1
7	Sequência de aminoácidos da L-FR2
8	Sequência de aminoácidos da L CDR2
9	Sequência de aminoácidos da L-FR3
10	Sequência de aminoácidos da L-CDR3
11	Sequência de aminoácidos da H-FR1
12	Sequência de aminoácidos da H-CDR1
13	Sequência de aminoácidos da H-FR2
14	Sequência de aminoácidos da H-CDR2
15	Sequência de aminoácidos da H-FR3
16	Sequência de aminoácidos da H-CD3

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Universidade NOVA de Lisboa-Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade NOVA de Lisboa-Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Instituto Português de Oncologia do Porto FG, EPE

Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research

<120> Anticorpo, fragmento funcional ou sonda do mesmo contra antigénios tumorais

<160> 16

<210> 1

<211> 339

<212> DNA

<213> Ratinho

<400>

gaagtgcagc tgcaggagtc cggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60
acctgctctg tcattggcta ctccatcacc agtgggttatt actggaactg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaactgga atggatgggc tccataaact acgacggtag caatatctac 180
aatccatctc tcaaagatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240
ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc aagagggggg 300
gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctca 339

<210> 2

<211> 351

<212> DNA

<213> Ratinho

<400>

gatattgtgc tgacctcagac tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
ttgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggttccagca aaagtcaggc 120
acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180
ttcagtgcca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgag 240
gatgctgccg cttattactg ccagcagtg agtagtgacc cacccatgct cacgttcggt 300
gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc c 351

<210> 3
<211> 113
<212> PRT
<213> Ratinho
<400>

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
5 10 15
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ile Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30
Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
35 40 45
Leu Glu Trp Met Gly Ser Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Ile Tyr
50 55 60
Asn Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Ratinho
<400>

Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
5 10 15

Glu	Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr
				20					25					30
Met	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp
				35					40					45
Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe
				50					55					60
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
				65					70					75
Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser
				80					85					90
Ser	Asp	Pro	Pro	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
				95					100					105

Leu Lys

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> Ratinho

<400>

Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15
Glu	Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser					
				20					25					

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Ratinho

<400>

Ser	Ser	Val	Ser	Tyr
1				5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Ratinho
<400>

Met His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
1 5 10 15
Ile Tyr

<210> 8
<211> 3
<212> PRT
<213> Ratinho
<400>

Asp Thr Ser
1

<210> 9
<211> 36
<212> PRT
<213> Ratinho
<400>

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
20 25 30
Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys
35

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Ratinho
<400>

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Met Leu Thr
1 5 10

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> Ratinho
<400>

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ile
20 25

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Ratinho
<400>

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 13
<211> 17

<212> PRT

<213> Ratinho

<400>

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr

1

5

Lisboa, 13 de novembro de 2020

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo, caracterizado/caracterizada por o referido anticorpo, fragmento funcional do anticorpo ou sonda do referido anticorpo ser derivado/derivada do anticorpo monoclonal L2A5 e se ligar de forma específica ao STn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6 em que o referido anticorpo compreende domínios variáveis das cadeias leve e pesada, compreendendo cada um deles regiões determinantes da complementaridade (CDR), em que:
 - a) As CDR da cadeia leve L-CDR1, L-CDR2, e L-CDR3 correspondem às SEQ ID N° 6, 8 e 10 respetivamente;
e
 - b) As CDR da cadeia pesada H-CDR1, H-CDR2, e H-CDR3 correspondem às SEQ ID N° 12, 14 e 16 respetivamente.
2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6 compreenderem o STn, 2,6-sialil-T ou dissialil-T ou 2,6-sialolactosamina.
3. Anticorpo, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por o anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo ser quimérico/quimérica ou humanizado/humanizada.
4. Anticorpo, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por o anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo estar

sujeito/sujeita a mudanças de glicanos em sítios de glicosilação.

5. Método de detecção de um tumor num sujeito usando o anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo, definido/definida nas reivindicações 1 a 4, caracterizado por o método compreender as seguintes etapas:
 - a) Coloração de uma amostra biológica obtida de um sujeito que possivelmente tem um tumor com o anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo, que se liga de forma específica ao sTn e a um grupo de glicanos terminados com ácidos siálicos ligados em alfa-2,6, em que a referida coloração é feita sob condições adequadas para a ligação específica do anticorpo, ou fragmentos funcionais do referido anticorpo ou sondas do referido anticorpo ao sTn, 2,6-sialil-T, dissialil-T ou 2,6-sialolactosamina;
 - b) E em que a presença ou a ausência da ligação do anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo é indicativa da presença ou da ausência de células tumorais que expressam sTn, 2,6-sialil-T, dissialil-T ou 2,6-sialolactosamina na superfície celular.
6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a amostra biológica compreender células isoladas, ou tecido, ou proteínas derivadas de tumores.
7. Anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo, para uso no tratamento de tumores de acordo com as reivindicações 1 a 4.

8. Composição farmacêutica compreendendo o anticorpo, fragmento funcional do referido anticorpo ou sonda do referido anticorpo, definido/definida nas reivindicações 1 a 4, caracterizada por compreender ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

Lisboa, 13 de novembro de 2020

Figura 1

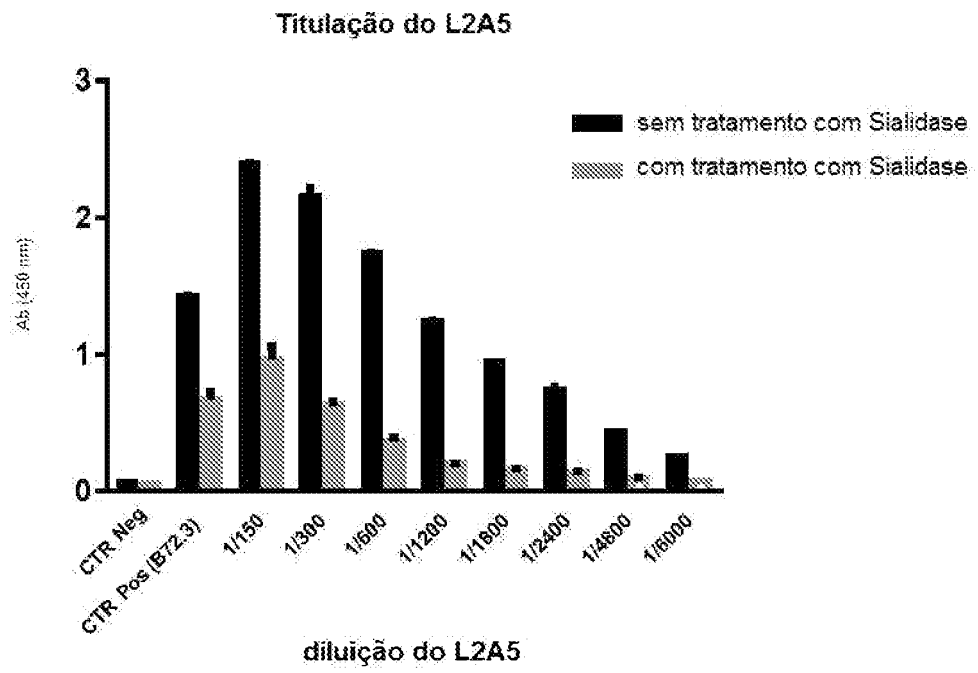


Figura 2

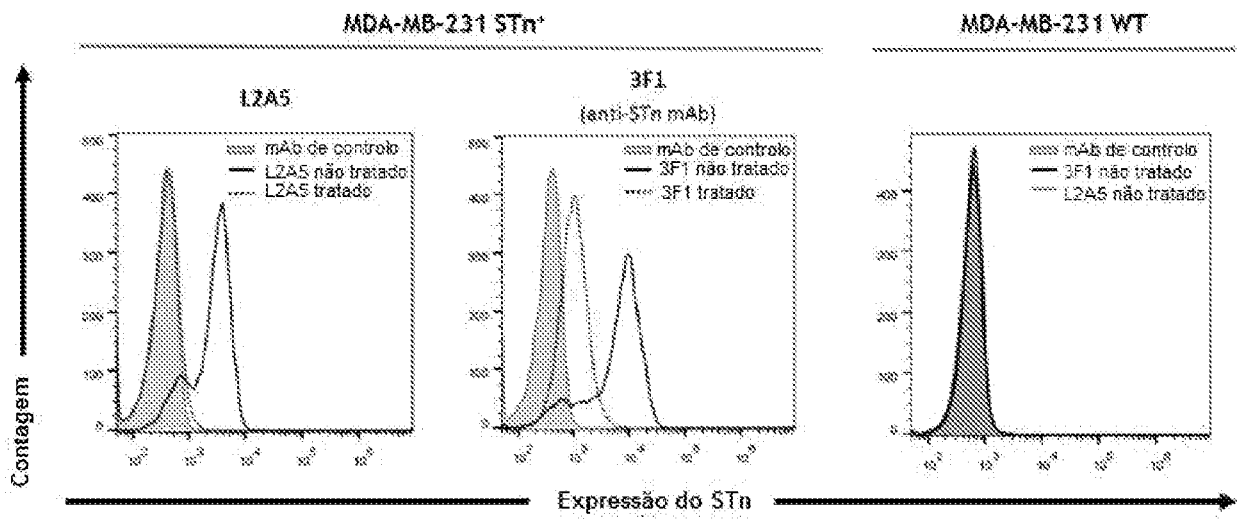
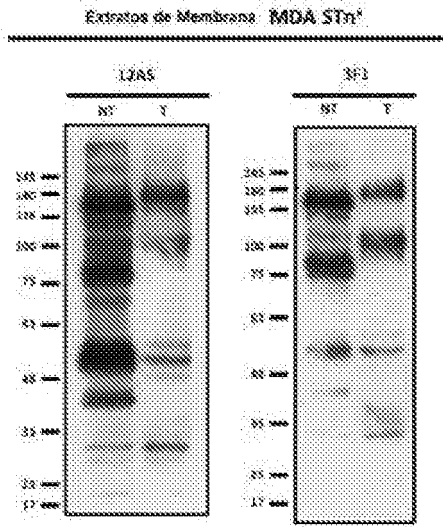


Figura 3

A



B

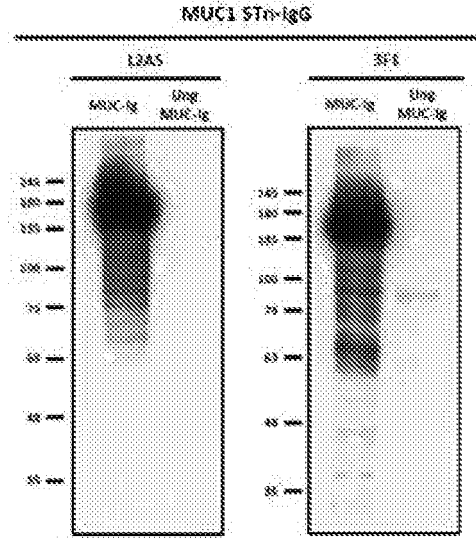
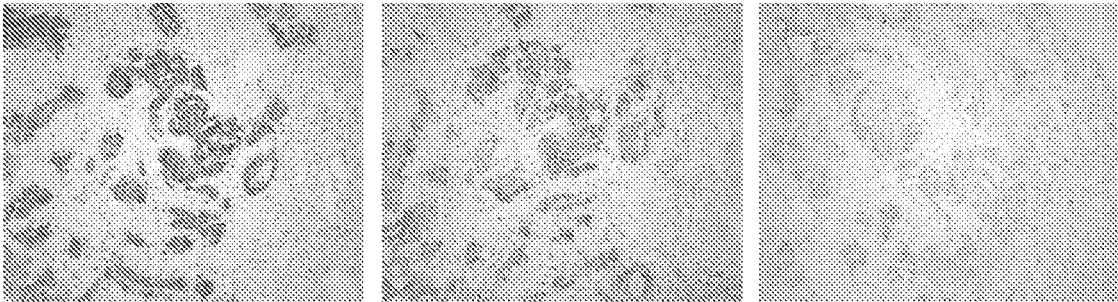
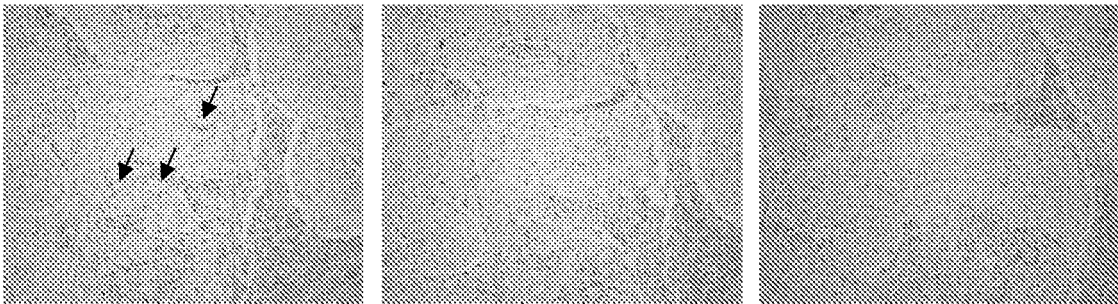


Figura 4

a)



b)



c)

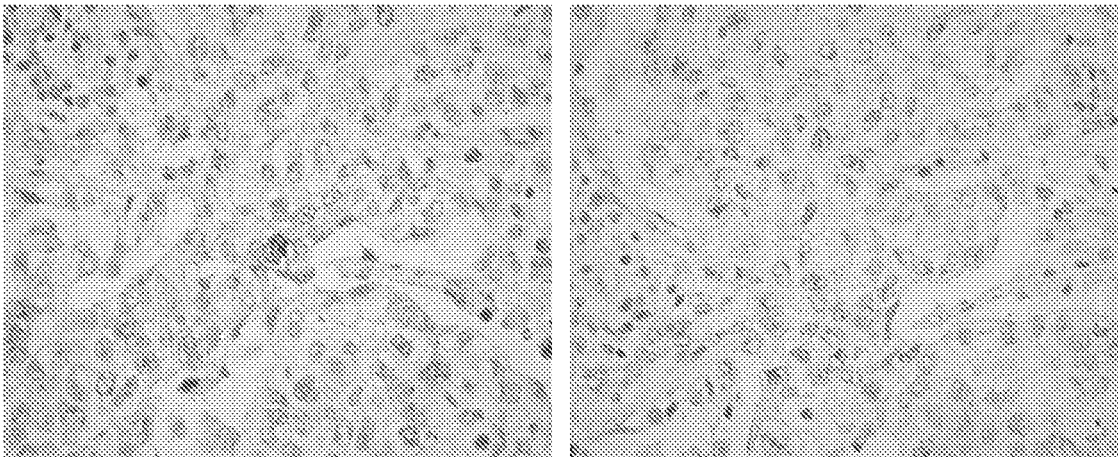


Figura 5

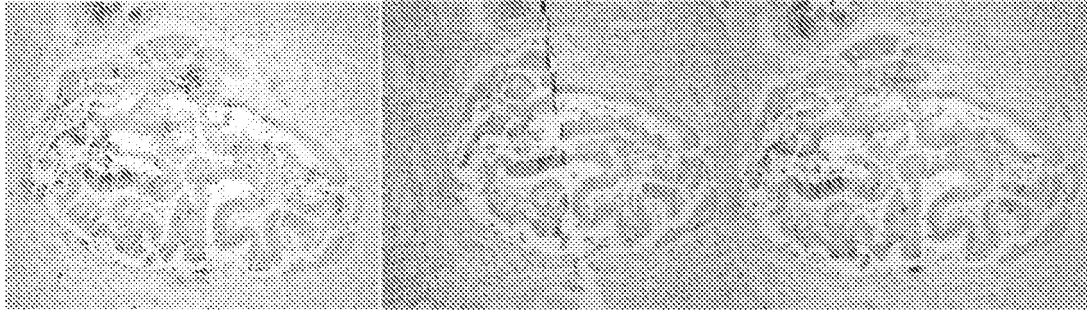
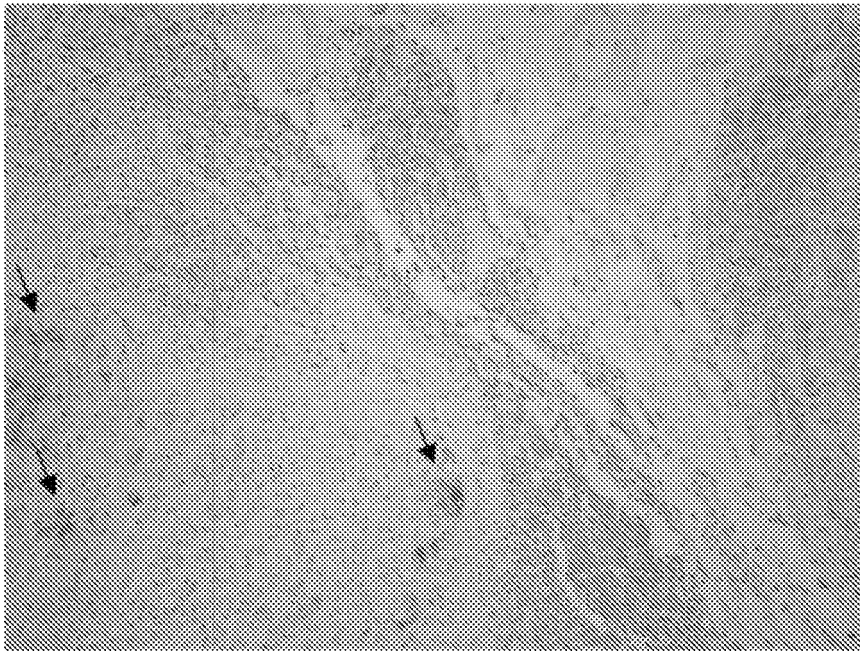


Figura 6

a)



b)

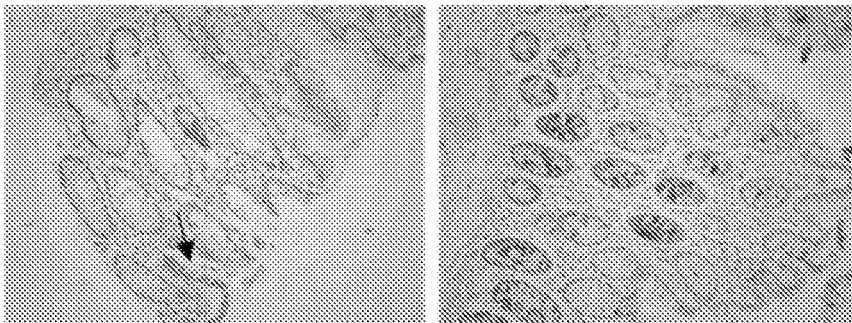
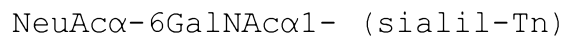
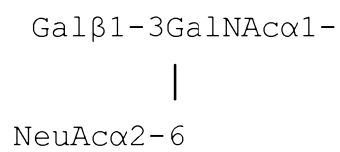


Figura 7

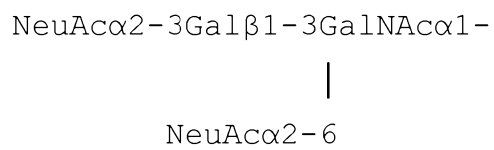
Sialil-Tn:



2,6-sialil-T:



dissialil-T:



2,6-sialolactosamina:



Figura 8

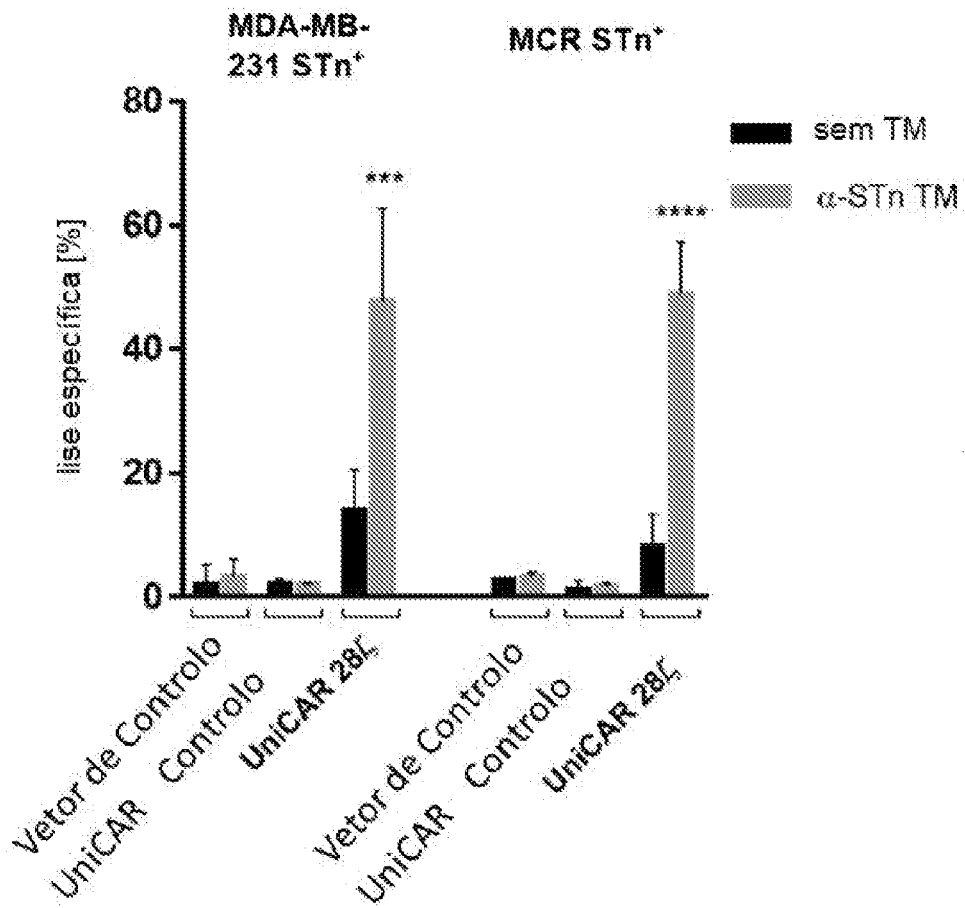


Figura 9

