

MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER, E, CONJUGADO DE ANTICORPO-FÁRMACO

[001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório dos Estados Unidos de Número 62/466.766 depositado em 3 de Março de 2017 intitulado “GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE”, ao Pedido Provisório dos Estados Unidos de Número 62/480.126 depositado em 31 de Março de 2017 intitulado “GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE”, ao Pedido Provisório dos Estados Unidos de Número 62/486.826 depositado em 18 de Abril de 2017 intitulado “GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE”, ao Pedido Provisório dos Estados Unidos de Número 62/563.718 depositado em 27 de Setembro de 2017 intitulado “GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE”, e ao Pedido Provisório dos Estados Unidos de Número 62/577.830 depositado em 27 de Outubro de 2017 intitulado “GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE”, os conteúdos de cada um são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que tem sido submetida eletronicamente ao formato ASCII e é por meio deste aqui incorporada em sua totalidade como referência. A dita cópia ASCII, criada em 2 de Março de 2018, é nomeada 2033_1030PCT_SL.txt é de tamanho de 24.876 bytes.

ANTECEDENTES

[003] Glicosilação aberrante acompanha algumas outras das mutações comumente observadas em carcinomas. Tem sido estimado que cerca de 80% de todos os carcinomas expressam as glicanas truncadas, o Antígeno Tn e a forma sialilada, Sialil-Tn (STn). Com poucas exceções, Tn e STn não são expressados em tecidos saudáveis, normais. Ainda mais, o ácido

siálico imunogênico não humano, ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), parece ser diferencialmente expressado em carcinomas, como câncer de mama, na forma de Neu5Gc-STn (GcSTn).

[004] Múltiplas formas de glicosilação aberrante têm sido descritas em cânceres humanos, identificando glicanas específicas como uma classe de moléculas de superfície celular adequadas para reconhecimento de tumor específico (Cheever, M.A. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2009 Sep 1; 15(17):5323-37). Por exemplo, vários tipos de cânceres humanos (como câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer de pulmão, e câncer ovariano dentre outros) mostram alta expressão de antígeno STn, que é raro em tecidos humanos normais (Karlen, P. *et al.*, *Gastroenterology.* 1998 Dec; 115(6): 1395-404; Ohno, S. *et al.*, *Anticancer Res.* 2006 Nov-Dec; 26(6A):4047-53). Além disso, a presença de STn em mucinas associadas a tumores refere-se ao câncer com prognóstico desfavorável e é com o mesmo considerado um epítopo atrativo para detecção de câncer e terapia direcionada (Cao, Y. *et al.*, *Virchows Arch.* 1997 Sep; 431(3): 159-66; Julien, S. *et al.*, *Br J. Cancer.* 2009 Jun 2; 100(11): 1746-54; Itzkowitz, S.H. *et al.*, *Cancer.* 1990 Nov 1; 66(9): 1960-6; Motoo, Y. *et al.*, *Oncology.* 1991; 48(4):321-6; Kobayashi, H. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 1992 Jan; 10(1):95-101). A formação de Tn e de STn está associada com mutações somáticas no gene *Cosmc* que codifica uma chaperona molecular requerida para a formação de T-sintase (Ju, T. *et al.*, *Nature.* 2005 Oct 27; 437(7063):1252; Ju, T. *et al.*, *Cancer Res.* 2008 Mar 15; 68(6): 1636-46). Também pode resultar da expressão aumentada da sialil-transferase, ST6GalNAc I (Ikehara, Y. *et al.*, *Glycobiology.* 1999 Nov; 9(11): 1213-24; Brockhausen, I. *et al.*, *Biol. Chem.* 2001 Feb; 382(2):219-32). A expressão de-novo de STn pode modular células de carcinoma, alterar o fenótipo de malignidade, e resultar em comportamentos celulares mais agressivos (Pinho, S. *et al.*, *Cancer Lett.* 2007 May 8; 249(2): 157-70). Embora STn seja elevadamente expressado em

tecidos malignos, níveis baixos são também encontrados em células humanas saudáveis (Jass, J.R. *et al.*, *J. Pathol.* 1995 Jun; 176(2): 143-9; Kirkeby, S. *et al.*, *Arch. Oral Biol.* 2010 Nov; 55(11):830-41). STn sozinho tem atraído atenção como um alvo para detecção e terapia de câncer (Cheever, M.A. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2009 Sep 1; 15(17):5323-37). STn também está presente em mucinas associadas com células-tronco cancerosas (Engelmann *et al.*, *Cancer Research*, 2008, 68, 2419-2426) e STn está implicado em supressão imune (Carrascal, M.A., *et al.*, *Molecular Oncology*. 2014. 8(3): 753-65).

[005] Adicionalmente à presença de STn, outras alterações de glicosilação têm sido descritas em câncer. Uma delas envolve Neu5Gc. Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) e Neu5Gc são os dois principais ácidos siálicos sobre superfícies de células de mamíferos. Neu5Ac e Neu5Gc diferem apenas em que Neu5Gc inclui um átomo de oxigênio adicional associado com o grupo químico ligado ao carbono 5. Devido à perda de um gene funcional, humanos apenas sintetizam ácido siálico na forma de Neu5Ac, mas não Neu5Gc. Entretanto, Neu5Gc pode ser metabolicamente incorporado em humanos a partir de fontes dietárias como carnes vermelhas (Tangvoranuntakul, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003 Oct 14; 100(21): 12045-50; Nguyen, D.H. *et al.*, *J. Immunol.* 2005 Jul 1; 175(1):228-36; US7.682.794, US8.084.219, US2012/0142903, WO2010030666 e WO2010030666). Neu5Gc é significativamente abundante em tumores humanos (Higashi, H. *et al.*, *Cancer Res.* 1985 Aug; 45(8):3796-802; Miyoshi I. *et al.*, *Mol. Immunol.* 1986. 23: 631-638; Hirabayashi, Y. *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 1987. 78: 614-620; Kawachi, S. *et al.*, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1988. 85: 381-383; Devine, P.L. *et al.*, *Cancer Res.* 1991. 51: 5826-5836; Malykh, Y.N. *et al.*, *Biochimie*. 2001. 83: 623- 634 e Inoue, S. *et al.*, 2010. *Glycobiology*. 20(6): 752-762) e consideravelmente baixo em tecidos humanos normais, o que tem sido despercebido durante várias décadas (Diaz,

S.L. *et al.*, *PLoS One*. 2009. 4: e4241; Tangvoranuntakul, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. 100: 12045-12050; Varki, A. *et al.*, *Glycoconj. J.* 2009. 26: 231-245). A acumulação metabólica aumentada de Neu5Gc derivado de dieta em tecido canceroso comparado com tecidos humanos saudáveis é provavelmente explicada por pelo menos três fatores: crescimento rápido com subprodução de Neu5Ac endógeno competente, macropinocitose intensificada induzida por fatores de crescimento (Dharmawardhane, S. *et al.*, *Mol. Biol. Cell*. 2000 Oct; 11(10):3341-52; Simonsen, A. *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001 Aug; 13(4):485-92; Johannes, L. *et al.*, *Traffic*. 2002 Jul; 3(7):443- 51; Amyere, M. *et al.*, *Int. J. Med. Microbiol.* 2002 Feb; 291(6-7):487-94), e a suprarregulação, por hipóxia, da expressão gênica do gene de transportador de ácido siálico lisossomal (sialina) (Yin, J. *et al.*, *Cancer Res*. 2006 Mar 15; 66(6):2937-45). Além disso, todos os humanos testados até agora incluem um reservatório de anticorpos policlonais contra Neu5Gc não humano, que o torna o primeiro exemplo de um xenoautoantígeno (Padler-Karavani, V. *et al.*, *Glycobiology*. 2008 Oct; 18(10):818-30; Varki, N.M. *et al.*, *Annu. Rev. Pathol.* 2011; 6:365-93). Foi mostrado que a acumulação de Neu5Gc dietário em tumores malignos diante de uma resposta anti-Neu5Gc facilita a progressão de tumor pela indução de uma inflamação crônica de baixo grau (Hedlund, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008 Dec 2; 105(48):18936-41). Portanto, epítomos de glicana contendo Neu5Gc sobre tumores humanos representam uma possibilidade valiosa para direcionamento de fármacos. Um estudo recente sugere a existência de anticorpos contra STn contendo Neu5Gc (GcSTn), mas não contra Neu5Ac-STn (AcSTn), em pacientes com câncer e explora o potencial deles como um biomarcador específico para detecção de câncer (Padler-Karavani, V. *et al.*, *Cancer Res*. 2011 May 1; 71(9):3352-63).

[006] Permanece uma necessidade na técnica de anticorpos terapêuticos capazes de ligação a glicanas, incluindo glicanas associadas com doença ou células e tecidos doentes. Ademais, permanece uma necessidade de

melhores métodos para desenvolvimento de tais anticorpos e de métodos de uso destes anticorpos para reconhecer células e tecidos doentes. A presente revelação atende a estas necessidades pela provisão de compostos e métodos relacionados.

SUMÁRIO

[007] Em algumas modalidades, a presente revelação provê um método de tratamento de câncer em um sujeito pela administração de um anticorpo, em que o anticorpo é administrado em uma dose de cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, em que o anticorpo tem uma meia-vida terminal de cerca de 50 horas a cerca de 200 horas, e em que o anticorpo liga-se ao antígeno sialil-Tn (STn). O anticorpo pode incluir um domínio variável de cadeia pesada (VH, *Heavy chain Variable domain*) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7 e 9; e um domínio variável de cadeia leve (VL, *Light chain Variable domain*) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 8 e 10. O anticorpo pode ser um conjugado de anticorpo-fármaco. O anticorpo pode ser conjugado com monometil-auristatina E (MMAE). O anticorpo pode ser administrado intravenosamente.

[008] Em algumas modalidades, a presente revelação provê um método de tratamento de câncer colorretal pela administração de um anticorpo anti-STn a um sujeito com câncer colorretal, em que o anticorpo anti-STn inclui um domínio variável de cadeia pesada (VH) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 9, e 11; e um domínio variável de cadeia leve (VL) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 8, 10, e 12. O câncer colorretal pode ser resistente ao tratamento com pelo menos um(a) de cetuximabe, panitumumabe, bevacizumabe, ramucirumabe, trastuzumabe, ponatinibe, sorafenibe, 5-fluorouracila, cisplatina, docetaxel, gencitabina, irinotecano, paclitaxel, e oxaliplatina. O anticorpo anti-STn pode

incluir um conjugado de anticorpo-fármaco (CAF, [ADC, *Antibody-Drug Conjugate*]). O CAF pode incluir pelo menos um conjugado, em que o pelo menos um conjugado é selecionado dentre um ou mais de uma auristatina, uma maitansina, uma tubulisina, um alcaloide de Vinca, um dímero de pirrolobenzodiazepina, uma camptotecina, uma duocarmicina, uma amanitina, um inibidor de fosfoinosítídeo-3-quinase (PI3K, *PhosphoInositide 3-Kinase*), e um inibidor de proteína quinase-quinase ativada por mitógeno (MEK, *Mitogen-activated protein kinase kinase*). O CAF pode incluir um ou mais polímero, em que o um ou mais polímero conecta o anticorpo anti-STn e o pelo menos um conjugado. O um ou mais polímero pode incluir um ou mais de um poli(glicol etilênico) (PEG), um poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (poli-HPMA), um poli(α -aminoácido), um polímero de carboidrato, um glicopolissacarídeo, um glicolípido, um glicoconjugado, um poliglicerol, um poli(álcool vinílico), um poli(ácido acrílico), um policetal, e um poliacetal. O um ou mais polímero pode incluir um poli(1-hidroximetil-etileno-hidroximetilformal) (PHF). O anticorpo anti-STn pode matar células expressoras de STn com uma concentração inibitória semimáxima de cerca de 0,1 nM a cerca de 50 nM.

[009] A administração do anticorpo anti-STn pode ser realizada em combinação com pelo menos um outro tratamento terapêutico. O outro tratamento terapêutico pode incluir um tratamento terapêutico padrão-de-cuidado. O outro tratamento terapêutico pode ser selecionado dentre um ou mais de cetuximabe, panitumumabe, bevacizumabe, ramucirumabe, trastuzumabe, ponatinibe, sorafenibe, 5-fluorouracila, cisplatina, docetaxel, gencitabina, irinotecano, paclitaxel, e oxaliplatina. O outro tratamento terapêutico pode também incluir administração de pelo menos um inibidor do ciclo celular. O inibidor do ciclo celular pode ser um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK, *Cyclin-Dependent Kinase*). O inibidor de CDK pode inibir CDK4 e/ou CDK6. O inibidor de CDK pode ser selecionado

dentre palbociclibe, ribociclibe, e abemaciclibe. O anticorpo anti-STn pode ser tratado simultaneamente com o outro tratamento terapêutico. O anticorpo anti-STn pode ser tratado sequencialmente com o outro tratamento terapêutico.

[0010] Em algumas modalidades, a presente revelação provê um método de tratamento de câncer, o método compreendendo administrar um anticorpo anti-STn a um sujeito com câncer, em que o anticorpo anti-STn inclui um domínio variável de cadeia pesada (VH) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 9, e 11; e um domínio variável de cadeia leve (VL) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 8, 10, e 12, em que a administração do anticorpo anti-STn é realizada em combinação com pelo menos um inibidor do ciclo celular. O inibidor do ciclo celular pode ser um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK). O inibidor de CDK pode inibir CDK4 e/ou CDK6. O inibidor de CDK pode ser selecionado dentre palbociclibe, ribociclibe, e abemaciclibe. O anticorpo anti-STn pode ser administrado simultaneamente com o inibidor do ciclo celular. O anticorpo anti-STn ser administrado sequencialmente com o inibidor do ciclo celular.

[0011] Em algumas modalidades, a presente revelação provê um CAF que inclui um anticorpo anti-STn com um VH com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 7, 9, e 11; um VL com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 8, 10, e 12; e um ou mais agente citotóxico. O agente citotóxico pode ser selecionado dentre pelo menos um(a) de uma auristatina, uma maitansina, uma tubulisina, um alcaloide de Vinca, um dímero de pirrolobenzodiazepina, uma camptotecina, uma duocarmicina, uma amanitina, um inibidor de PI3K, e um inibidor de MEK. O anticorpo anti-STn pode estar conjugado com o um ou mais agente citotóxico por meio de um conector. O CAF pode incluir um ou mais

polímero conectando o anticorpo anti-STn e o um ou mais agente citotóxico. O um ou mais polímero pode incluir um ou mais de um PEG, um poli-HPMA, um poli(α -aminoácido), um polímero de carboidrato, um glicopolissacarídeo, um glicolípido, um glicoconjugado, um poliglicerol, um poli(álcool vinílico), um poli(ácido acrílico), um um policetal, e um poliacetal. O um ou mais polímero pode incluir um PHF. O um ou mais polímero pode ser conectado ao anticorpo anti-STn por meio de um conector. O um ou mais agente citotóxico pode ser conectado ao um ou mais polímero por meio de um conector. O conector pode ser um conector clivável.

[0012] Em algumas modalidades, a presente revelação provê um método de tratamento de câncer em um sujeito, em que o sujeito tem pelo menos uma célula de câncer expressora de STn, o método incluindo administrar um conjugado-de-anticorpo-anti-STn-fármaco aqui descrito. A pelo menos uma célula de câncer pode ser uma célula de câncer ovariano. A pelo menos uma célula de câncer pode ser resistente ao tratamento com pelo menos um agente quimioterapêutico. O agente quimioterapêutico pode ser cisplatina. O conjugado-de-anticorpo-anti-STn-fármaco pode ser administrado em uma dose de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 25 mg/kg. A administração pode ser injeção intravenosa. O conjugado-de-anticorpo-anti-STn-fármaco pode ser administrado diária, semanal, ou mensalmente.

[0013] Alguns métodos da presente revelação incluem métodos de tratamento de câncer pela administração de um CAF a um sujeito, o CAF incluindo: um VH incluindo SEQ ID NO: 7; um VL incluindo SEQ ID NO: 8; pelo menos uma região constante de IgG humana; e um conjugado citotóxico, em que o conjugado citotóxico está conjugado com pelo menos uma região constante de IgG humana por meio de um conector. A pelo menos uma região constante de IgG humana pode ser selecionada de uma ou mais de SEQ ID NOs: 15 e 16. O conjugado citotóxico pode incluir MMAE. O CAF pode ser administrado em uma dose de cerca de 1 mg/kg a cerca de 6 mg/kg. O CAF

pode ser administrado por injeção intravenosa de bolus. O CAF pode ser administrado como parte de uma composição, em que a composição inclui pelo menos um excipiente. A composição pode ser administrada em um volume de cerca de 0,1 mL/kg a cerca de 10 mL/kg. A composição pode ser administrada em um volume de cerca de 1,2 mL/kg. A composição pode incluir uma concentração de CAF de cerca de 1,2 mg/mL a cerca de 10 mg/mL. O CAF pode apresentar uma meia-vida aparente de eliminação terminal de cerca de 2 dias a cerca de 8 dias. O CAF pode apresentar uma taxa de depuração aparente de cerca de 10 mL/kg/dia a cerca de 20 mL/kg/dia. O CAF pode apresentar um volume aparente de distribuição no estado de equilíbrio de cerca de 50 mL/kg a cerca de 100 mL/kg. O CAF pode apresentar uma concentração máxima observada de cerca de 10 µg/mL a cerca de 200 µg/mL. O CAF pode apresentar uma área sob a curva (ASC) de concentração em função do tempo desde o início da administração até a última concentração quantificável observável de cerca de 50 dias*µg/mL a cerca de 500 dias*µg/mL.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

[0014] Os(as) precedentes e outros(as) objetivos, características e vantagens serão evidentes a partir da seguinte descrição de modalidades específicas da invenção, conforme ilustradas nos desenhos acompanhantes nos quais números de referência semelhantes referem-se às mesmas partes em todas as vistas diferentes. Os desenhos não estão necessariamente em escala; em vez disso, ênfase é dada à ilustração dos princípios de várias modalidades da invenção.

[0015] Figura 1A é um esquema representando *N*-acetilgalactosamina α 2,6-sialilada (STn) com a elipse maior indicando a região específica de STn reconhecida pelos anticorpos do Grupo 1.

[0016] Figura 1B é um esquema representando *N*-acetilgalactosamina α 2,6-sialilada (STn) com a elipse maior indicando a região específica de STn

reconhecida pelos anticorpos do Grupo 2.

[0017] Figura 1C é um esquema representando *N*-acetilgalactosamina α 2,6-sialilada (STn) com a elipse maior indicando a região específica de STn reconhecida pelos anticorpos do Grupo 3.

[0018] Figura 1D é um esquema representando *N*-acetilgalactosamina α 2,6-sialilada (STn) com a elipse maior indicando a região específica de STn reconhecida pelos anticorpos do Grupo 4.

[0019] Figura 2 é um gráfico mostrando concentrações séricas médias de anticorpo ao longo do tempo após uma dose inicial de hSIA101-MMAE em macacos Cinomolgos.

[0020] Figura 3 é um gráfico mostrando concentrações séricas médias de anticorpo ao longo do tempo após uma segunda dose (no Dia 22 de tratamento) de hSIA101-MMAE em macacos Cinomolgos.

[0021] Figura 4 é um conjunto de gráficos mostrando volumes de tumor de xenoenxerto derivado de paciente ao longo do curso do tratamento com hSIA101-CAF em comparação com outros tratamentos. Tumores no painel superior (gráfico superior) foram iniciados com tumores ovarianos de um paciente “*químio-naïve*” (sem quimioterapia prévia) e tumores no painel inferior (gráfico inferior) foram iniciados com tumores ovarianos de um paciente que havia sido previamente tratado com agentes quimioterapêuticos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Introdução

[0022] De acordo com a presente invenção são anticorpos específicos para ou que interagem com epítomos que incluem grupos carboidrato aqui referidos como glicanas. Alguns anticorpos interagentes com glicanas aqui descritos podem ser usados como agentes bioterapêuticos. Outras modalidades proveem métodos para geração de anticorpo interagentes com glicana.

[0023] Na natureza, STns podem ser sialilados com ácido *N*-

acetilneuramínico (Neu5Ac) ou com ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Os anticorpos interagentes com glicanas de acordo com a presente invenção podem ser direcionados para glicanas tendo quaisquer STns (anticorpos pan-STn), glicanas tendo STns que incluem especificamente Neu5Ac (AcSTn) ou glicanas tendo STns que incluem especificamente Neu5Gc (GcSTn). Em algumas modalidades, anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção reconhecem antígenos à base de glicana relacionados com câncer, como *N*-acetilgalactosamina α 2,6-sialilada (STn).

[0024] Em algumas modalidades, a presente revelação provê métodos de produção de anticorpos interagentes com glicanas. Tais métodos podem incluir o uso de camundongos para geração de uma resposta imune a um ou mais antígenos, incluindo STn (*e.g.* AcSTn e/ou GcSTn). Como aqui descrito, numerosos métodos podem ser utilizados com o propósito de manipular os anticorpos produzidos mediante imunização de camundongo. Tais métodos podem incluir variação da cepa e/ou do sexo do camundongo sendo imunizado, variação do antígeno usado, variação do tipo e da dose de adjuvante incluído em administração de antígeno e do curso de tempo antes da iniciação de fusão de hibridomas.

[0025] Em algumas modalidades, a presente revelação provê métodos para tratamento de câncer usando anticorpos interagentes com glicanas. Tais métodos podem incluir o uso de conjugados de anticorpo-fármaco (CAFs). Os CAFs podem incluir conjugados citotóxicos conectados, diretamente ou por meio de um conector, aos anticorpos interagentes com glicanas. Os anticorpos interagentes com glicanas podem ligar-se ao STn. Em algumas modalidades, os métodos para tratamento de câncer incluem eliminar células-tronco cancerosas. Em algumas aspectos, anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados sozinhos. Em outros aspectos, anticorpos interagentes com glicanas são usados em combinação com agentes quimioterapêuticos. Os anticorpos interagentes com glicanas podem ser preparados como

composições incluindo um ou mais excipientes para administração a sujeitos. As composições e rotas de administração podem prover anticorpos interagentes com glicanas em concentrações e doses adequadas para alcançar biodisponibilidade, janela terapêutica, e/ou volume de distribuição necessários para tratamento eficaz.

[0026] São adicionalmente providas formas otimizadas, humanizadas e conjugadas de anticorpos interagentes com glicanas aqui revelados. Adicionalmente, kits, ensaios e reagentes incluindo anticorpos e/ou métodos da presente invenção são apresentados.

Definições

[0027] *Adjacente*: Como aqui usado, o termo “adjacente” refere-se a algo que é contíguo, vizinho ou próximo a uma dada entidade. Em algumas modalidades, “resíduos adjacentes” são resíduos de açúcar dentro de uma cadeia de glicana que estão ligados uns aos outros. Em algumas modalidades, “glicanas adjacentes” são cadeias de glicanas que estão próximas uma da outra quer em contato direto quer dentro de proximidade estreita e sem outra glicana entre as duas.

[0028] *Administrado em combinação*: Como aqui usado, o termo “administrado em combinação” ou “administração combinada” significa que um sujeito é simultaneamente exposto a dois ou mais agentes administrados ao mesmo tempo ou dentro de um intervalo de tempo de tal modo que o sujeito está em algum instante no tempo simultaneamente exposto a ambos e/ou de tal modo que pode haver uma sobreposição do efeito de cada agente no paciente. Em algumas modalidades, pelo menos uma dose de um ou mais agentes é administrada dentro de cerca de 24 horas, 12 horas, 6 horas, 3 horas, 1 hora, 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 5 minutos, ou 1 minuto de pelo menos uma dose de um ou mais outros agentes. Em algumas modalidades, a administração ocorre em regimes de dosagem sobrepostos. Como aqui usado, o termo “regime de dosagem” refere-se a uma pluralidade de doses espaçadas

à parte no tempo. Tais doses podem ocorrer em intervalos regulares ou podem incluir um ou mais hiatos na administração. Em algumas modalidades, a administração de doses individuais de um ou mais anticorpos interagentes com glicanas, como aqui descritos, são espaçadas suficientemente proximamente juntas de modo que é alcançado um efeito combinatório (*e.g.*, um efeito sinérgico).

[0029] *Aminoácido*: Como aqui usados, os termos “aminoácido” e “aminoácidos” referem-se a todos os L-alfa-aminoácidos de ocorrência natural e também aos aminoácidos de ocorrência não natural. Aminoácidos são identificados por designações quer de três letras quer de uma letra como segue: ácido aspártico (Asp:D), isoleucina (Ile:I), treonina (Thr:T), leucina (Leu:L), serina (Ser:S), tirosina (Tyr:Y), ácido glutâmico (Glu:E), fenilalanina (Phe:F), prolina (Pro:P), histidina (His:H), glicina (Gly:G), lisina (Lys:K), alanina (Ala:A), arginina (Arg:R), cisteína (Cys:C), triptofano (Trp:W), valina (Val:V), glutamina (Gln:Q) metionina (Met:M), asparagina (Asn:N), onde o aminoácido é listado primeiro seguido parenteticamente pelos códigos de três letras e de uma letra, respectivamente.

[0030] *Animal*: Como aqui usado, o termo “animal” refere-se a qualquer membro do reino animal. Em algumas modalidades, “animal” refere-se a humanos em qualquer estágio de desenvolvimento. Em algumas modalidades, “animal” refere-se aos animais não humanos em qualquer estágio de desenvolvimento. Em determinadas modalidades, um animal não humano é um mamífero (*e.g.*, um roedor, um camundongo, um rato, um coelho, um macaco, um cão, um gato, uma ovelha, um gado bovino, um primata, ou um porco). Em algumas modalidades, animais incluem, mas não são limitados a, mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes, e vermes. Em algumas modalidades, o animal é um animal transgênico, animal geneticamente modificado, ou um clone.

[0031] *Anticorpo*: Como aqui usado, o termo “anticorpo” é usado no

sentido mais amplo e especificamente abrange várias modalidades incluindo, mas não limitadas a, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (*e.g.* anticorpos biespecíficos formados de pelo menos dois anticorpos intactos), e fragmentos de anticorpo como diacorpos desde que apresentem uma atividade biológica desejada. Anticorpos são predominantemente moléculas à base de aminoácidos mas podem também incluir modificações como com porções à base de açúcar.

[0032] *Fragmento de anticorpo:* Como aqui usado, o termo “fragmento de anticorpo” refere-se a uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente incluindo uma região de ligação ao antígeno do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo. A digestão, por papaína, dos anticorpos produz dois fragmentos de ligação ao antígeno idênticos, chamados de fragmentos “Fab”, cada um com um único sítio de ligação ao antígeno. Também é produzido um fragmento “Fc” residual “Fc”, cujo nome reflete sua capacidade para se cristalizar facilmente. Tratamento com pepsina produz um fragmento F(ab')₂ que tem dois sítios de ligação ao antígeno e é ainda capaz de ligação cruzada ao antígeno. Anticorpos interagentes com glicanas podem incluir um ou mais destes fragmentos. Para os propósitos aqui, um anticorpo pode incluir um domínio variável de cadeia leve e um domínio variável de cadeia pesada e, também, uma região Fc.

[0033] *Região de ligação ao antígeno:* Como aqui usado, o termo “região de ligação ao antígeno” refere-se à porção de um anticorpo, fragmento de anticorpo, ou molécula relacionada, que interage diretamente com uma molécula-alvo ou com um epítipo-alvo. Regiões de ligação ao antígeno tipicamente incluem um par de domínios variáveis, como na região Fab de um anticorpo ou como ligadas juntas em um scFv.

[0034] *Aproximadamente:* Como aqui usado, o termo “aproximadamente” ou “cerca de”, como aplicado a um ou mais valores de interesse, refere-se a um valor que é similar a um valor de referência declarado. Em determinadas modalidades, o termo “aproximadamente” ou “cerca de” refere-se a uma faixa de valores que caem dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, ou menos em qualquer direção (maior que ou menor que) do valor de referência declarado salvo indicação em contrário ou diferentemente evidente a partir do contexto (exceto se tal número ultrapassasse 100% de um valor possível).

[0035] *Associado com (Associado a):* Como aqui usados, os termos “associado com” (“associado a”), “conjugado”, “ligado”, “conectado”, e “ancorado”, quando usados com respeito a duas ou mais porções, significam que as porções estão fisicamente associadas ou conectadas umas com as outras, quer diretamente quer por meio de uma ou mais porções adicionais que serve como um agente de ligação, para formar uma estrutura que é suficientemente estável de modo que as porções permanecem fisicamente associadas sob as condições nas quais a estrutura é usada, *e.g.*, condições fisiológicas. Uma “associação” não precisa ser estritamente mediante ligação química covalente direta. Pode também sugerir ligação iônica ou ligação de hidrogênio ou uma conectividade à base de hibridização suficientemente estável de modo que as entidades “associadas” permaneçam fisicamente associadas.

[0036] *Bifuncional:* Como aqui usado, o termo “bifuncional” refere-se a qualquer substância, molécula ou porção que é capaz de ou mantém pelo menos duas funções. As funções podem afetar o mesmo resultado ou um resultado diferente. A estrutura que produz a função pode ser a mesma ou diferente.

[0037] *Biomolécula:* Como aqui usado, o termo “biomolécula” é

qualquer molécula natural que é com base em aminoácido, com base em ácido nucleico, com base em carboidrato ou com base em lipídio, e semelhantes.

[0038] *Anticorpo biespecífico*: Como aqui usado, o termo “anticorpo biespecífico” refere-se a um anticorpo capaz de ligar-se a dois antígenos diferentes. Tais anticorpos tipicamente incluem regiões de pelo menos dois anticorpos diferentes. Anticorpos biespecíficos podem incluir qualquer um daqueles descritos em Riethmuller, G. 2012. *Cancer Immunity*. 12:12-18, Marvin, J.S. *et al.*, 2005. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26(6):649-58 e Schaefer, W. *et al.*, 2011. *PNAS*. 108(27): 11187-92, os conteúdos de cada um são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[0039] *Ramificação*: Como aqui usado, o termo “ramificação” refere-se a um(a) entidade, porção ou apêndice que é ligado(a) a ou se estende de uma entidade ou fonte principal. Em algumas modalidades, uma “cadeia ramificada” ou “cadeia de ramificação” inclui um ou mais resíduos (incluindo, mas não limitados a resíduos de açúcar) que se estendem de uma cadeia parental. Como aqui usada, uma “cadeia parental” é usada para se referir a uma cadeia de resíduos (incluindo, mas não limitados a resíduos de açúcar) da qual uma cadeia de ramificação é ligada. No caso de uma glicana com múltiplas ramificações, a cadeia parental pode também se referir à cadeia fonte da qual todas tais ramificações são direta ou indiretamente conectadas. No caso de um polissacarídeo tendo uma cadeia de resíduos de hexose, as ligações da cadeia parental tipicamente ocorrem entre os carbonos 1 e 4 de resíduos adjacentes enquanto que as cadeias de ramificação são conectadas a uma cadeia parental mediante uma ligação entre o carbono 1 do resíduo de ramificação e o carbono 3 do resíduo parental do qual a ramificação se estende. Como aqui usado, o termo “resíduo de ramificação” refere-se ao resíduo conectado à cadeia parental em uma cadeia de ramificação.

[0040] *Células-tronco cancerosas*: Como aqui usadas, células-tronco cancerosas (CSCs, *Cancer Stem Cells*) referem-se a um subconjunto de

células tumorais que têm a capacidade para se autorrenovarem. CSCs podem ser capazes de regenerar diversos tipos de células. Em alguns casos, estas células são difíceis ou impossíveis de remover mediante tratamento cirúrgico ou químico de um tumor.

[0041] *Composto*: Como aqui usado, o termo “composto”, refere-se a uma entidade química individual. Em algumas modalidades, um composto específico pode existir em uma ou mais formas isoméricas ou isotópicas (incluindo, mas não limitadas aos estereoisômeros, isômeros geométricos e isótopos). Em algumas modalidades, um composto é provido ou utilizado em apenas uma única tal forma. Em algumas modalidades, um composto é provido ou utilizado como uma mistura de duas ou mais tais formas (incluindo, mas não limitadas a uma mistura racêmica de estereoisômeros). Aquelas pessoas versadas na técnica reconhecem que alguns compostos que existem em diferentes tais formas, mostram diferentes propriedades e/ou atividades (incluindo, mas não limitadas às atividades biológicas). Em tais casos está dentro do conhecimento comum daquelas pessoas versadas na técnica a seleção ou a evitação de formas específicas do composto para uso de acordo com a presente invenção. Por exemplo, compostos que contêm átomos de carbono assimetricamente substituídos podem ser isolados em formas opticamente ativas ou formas racêmicas. Métodos de como preparar formas opticamente ativas a partir de materiais de partida opticamente ativos são conhecidos na técnica, como por resolução de misturas racêmicas ou por síntese estereosseletiva.

[0042] *Cíclico* ou *Ciclizado*: Como aqui usado, o termo “cíclico” refere-se à presença de uma alça contínua. Moléculas cíclicas não precisam ser circulares, apenas unidas para formarem uma cadeia não rompida de subunidades.

[0043] *Citidina-monofosfato-ácido-N-acetilneuramínico-hidroxilase*: Como aqui usado, o termo “citidina-monofosfato-ácido-N-acetilneuramínico-

hidroxilase” ou “CMAH” (*Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic acid Hydroxylase*) refere-se a uma enzima, ausente em humanos, mas presente na maioria dos outros animais (incluindo, mas não limitados aos camundongos, porcos, e chimpanzés) que catalisa a formação de ácido N-glicolilneuramínico a partir de ácido N-acetilneuramínico. A ausência da enzima em humanos é devido a uma mutação por deslocamento de fase de leitura resultando na terminação prematura do transcrito de CMAH e na produção de uma proteína não funcional.

[0044] *Citotóxico*: Como aqui usado, o termo “citotóxico” é usado para se referir a um agente que mata ou causa efeitos lesivos, tóxicos, ou mortais em uma célula (*e.g.*, uma célula de mamífero (*e.g.*, uma célula humana)), bactéria, vírus, fungo, protozoário, parasita, príon, ou uma combinação dos mesmos.

[0045] *Distribuição*: como aqui usada, “distribuição” refere-se à ação ou maneira de transporte de um composto, substância, entidade, porção, carga ou carga útil para uma destinação intencionada.

[0046] *Agente de distribuição*: Como aqui usado, “agente de distribuição” refere-se a qualquer substância que facilita, pelo menos em parte, a distribuição *in vivo* de um composto, substância, entidade, porção, carga ou carga útil.

[0047] *Marcador detectável*: Como aqui usado, “marcador detectável” refere-se a um ou mais marcadores, sinais, ou porções que são conectados, incorporados ou associados com outra entidade, cujos marcadores, sinais ou porções são facilmente detectáveis por métodos conhecidos na técnica incluindo radiografia, fluorescência, quimioluminescência, atividade enzimática, absorbância e semelhantes. Os marcadores detectáveis incluem radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, enzimas, corantes, íons metálicos, ligantes como biotina, avidina, estreptavidina e haptenos, pontos quânticos, e semelhantes. Os marcadores

detectáveis podem estar localizados em qualquer posição na entidade com a qual estão conectados, incorporados ou associado. Por exemplo, quando conectados, incorporados em ou associados com um peptídeo ou uma proteína, podem estar dentro dos aminoácidos, dos peptídeos, ou das proteínas, ou localizados nas terminações-N ou -C.

[0048] *Biblioteca de apresentação*: Como aqui usado, o termo “biblioteca de apresentação” refere-se a um ferramenta usada em descoberta científica para identificar interações biomoleculares. Existem diferentes variações de bibliotecas de apresentação que incluem a utilização de bacteriófagos, leveduras e ribossomos. Em cada caso, proteínas dentro de uma dada biblioteca (também referidas aqui como “membros da biblioteca”) são ligadas (fisicamente ou mediante associação com um hospedeiro) ao ácido nucleico que codifica a proteína. Quando uma molécula-alvo é incubada com os membros de uma biblioteca de apresentação, qualquer um dos membros da biblioteca que se liga ao alvo pode ser isolado e as sequências codificadoras da proteína ligada podem ser determinadas mediante análise do ácido nucleico ligado. Em algumas modalidades, as bibliotecas de apresentação são “bibliotecas de apresentação em fago” em que a biblioteca de apresentação é composta de partículas virais de bacteriófago (também aqui referidas como “partículas de fago”) em que ácidos nucleicos tem estado incorporados no genoma do fago resultando na produção de proteínas de revestimento viral que estão fusionadas com proteínas codificadas pelos ácidos nucleicos que têm sido introduzidos. Tais proteínas fusionadas são “apresentadas” sobre a superfície externa das partículas de fago montadas onde elas podem interagir com um dado alvo.

[0049] *Distal*: Como aqui usado, o termo “distal” significa situado longe do centro ou longe de um ponto ou de uma região de interesse.

[0050] *Modificado*: Como aqui usado, as modalidades da invenção são “modificadas” quando são desenhadas para terem um atributo ou uma

propriedade, quer estrutural quer química, que varia de uma molécula de tipo selvagem ou nativa, ponto de partida. Portanto, agentes modificados ou entidades modificadas são aqueles(as) cujo desenho e/ou cuja produção incluem uma ação realizada pelo ser humano.

[0051] *Epítopo*: Como aqui usado, um “epítopo” refere-se a uma superfície ou região em uma molécula que é capaz de interagir com componentes do sistema imune, incluindo, mas não limitados aos anticorpos. Em algumas modalidades, um epítopo pode incluir um sítio-alvo. Epítopos podem incluir uma região em um antígeno ou entre dois ou mais antígenos que é especificamente reconhecida e ligada por um anticorpo correspondente. Alguns epítopos podem incluir um ou mais resíduos de açúcar ao longo de uma ou mais glicanas. Tais epítopos podem incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou pelo menos 10 resíduos de açúcar. Epítopos podem também incluir uma ou mais regiões de interação entre entidades. Em algumas modalidades, epítopos podem incluir uma junção entre resíduos de açúcar, entre uma cadeia de ramificação e uma cadeia parental ou entre uma glicana e uma proteína.

[0052] *Ligação éter*: Como aqui usada, uma “ligação éter” refere-se a uma ligação química que inclui um oxigênio ligado entre dois átomos de carbono. Em algumas modalidades, ligações éter ligam resíduos de açúcar a outras entidades, incluindo, mas não limitadas a outros resíduos de açúcar para formar uma cadeia de glicana. Tais ligações são também referidas como “ligações glicosídicas” ou “conexões glicosídicas”. No contexto de pelo menos um resíduo de açúcar, os termos “ligação” e/ou “conexão” são também aqui usados quando se referem a uma conexão glicosídica. Em algumas modalidades, as conexões podem conectar glicanas a outras entidades, incluindo, mas não limitadas a proteínas, lipídios, fosfolipídios e esfingolipídios. Em algumas modalidades, resíduos de açúcar podem estar conectados a proteína, tipicamente formando uma conexão entre um resíduo de açúcar e um resíduo de aminoácido. Tais resíduos de aminoácido incluem

serina e treonina. Em algumas modalidades, as ligações éter conectam glicanas a um arranjo de glicanas mediante um conector carboidrato que participa na formação da ligação. As conexões glicosídicas podem diferir em suas propriedades estereoquímicas. Em algumas modalidades, conexões glicosídicas alfa-orientadas (também referidas como “conexões alfa”) resultam em uma orientação axial entre o oxigênio ligado da ligação éter e o anel ciclo-hexano do resíduo de açúcar. Em algumas modalidades, conexões glicosídicas beta-orientadas (também aqui referidas como “conexões beta”) resultam em uma orientação equatorial entre o oxigênio ligado da ligação éter e o anel ciclo-hexano do resíduo de açúcar.

[0053] *Expressão*: Como aqui usada, “expressão” de uma sequência de ácido nucleico refere-se a um ou mais dos seguintes eventos: (1) produção de um molde de RNA a partir de uma sequência de DNA (*e.g.*, por transcrição); (2) processamento de um transcrito de RNA (*e.g.*, por encadeamento, editoração, formação de quepe 5', e/ou processamento de extremidade 3'); (3) tradução de um RNA em um polipeptídeo ou uma proteína; (4) enovelamento de um polipeptídeo ou de uma proteína; e (5) modificação pós-traducional de um polipeptídeo ou de uma proteína.

[0054] *Atributo*: Como aqui usado, um “atributo” refere-se a uma característica, uma propriedade, ou um elemento distintivo.

[0055] *Formulação*: Como aqui usada, uma “formulação” refere-se a um material ou a uma mistura preparado(a) de acordo com uma fórmula e que pode incluir pelo menos um anticorpo, um composto, um substância, uma entidade, um porção, uma carga ou uma carga útil e um agente de distribuição, carreador ou excipiente.

[0056] *Funcional*: Como aqui usada, uma molécula biológica “funcional” é uma entidade biológica com uma estrutura e em uma forma na qual apresenta uma propriedade e/ou atividade pela qual é caracterizada. Como aqui usado, um grupo “funcional” ou “grupo químico” refere-se a um

grupo característico de átomos ou ligações químicas que são parte de uma molécula maior. Em algumas modalidades, grupos funcionais podem estar associados com moléculas diferentes, mas podem participar em reações químicas similares independente da molécula da qual são uma parte. Grupos funcionais comuns incluem, mas não são limitados a, grupos carboxila (-COOH), grupos acetila (-COH), grupos amino (-NH₂), grupos metila (-CH₃), grupos sulfato (-SO₃H) e grupos acila. Em algumas modalidades, a adição de um ou mais grupos funcionais a uma molécula pode ser conduzida usando termos que modificam o nome do grupo funcional com a terminação “-ilado”, *e.g.*, acetilado, metilado e sulfatado.

[0057] *Glicana*: Como aqui usados, os termos “glicana”, “oligossacarídeo” e “polissacarídeo” são usados intercambiavelmente e referem-se aos polímeros compostos de monômeros de açúcar, tipicamente unidos por ligações glicosídicas também aqui referidas como conexões glicosídicas. Em algumas modalidades, os termos “glicana”, “oligossacarídeo” e “polissacarídeo” podem ser usados para se referirem à porção carboidrato de um glicoconjugado (*e.g.*, glicoproteína, glicolípido ou proteoglicana).

[0058] *Cadeia de glicana*: Como aqui usado, o termo “cadeia de glicana” refere-se a um polímero de açúcar que inclui dois ou mais açúcares. Em algumas modalidades, as cadeias de glicana são covalentemente ligadas mediante resíduos de treonina na proteína.

[0059] *Composição rica em glicanas*: Como aqui usado, o termo “composição rica em glicanas” refere-se a uma mistura que inclui uma grande percentagem de glicanas. Em algumas modalidades, glicanas dentro de uma composição rica em glicanas podem compor até de cerca de 1% a cerca de 10%, de cerca de 5% a cerca de 15%, de cerca de 20% a cerca de 40%, de cerca de 30% a cerca de 50%, de cerca de 60% a cerca de 80%, de cerca de 70% a cerca de 90% ou pelo menos 100% do peso total da composição.

[0060] *Ligação glicosídica*: Como aqui usado, o termo “ligação glicosídica” refere-se a uma ligação covalente formada entre um carboidrato e outro grupo químico. Em algumas modalidades, as ligações glicosídicas são formadas entre a extremidade redutora de uma molécula de açúcar e a extremidade não redutora de uma segunda molécula de açúcar ou cadeia de polissacarídeo. Tais ligações glicosídicas são também conhecidas como ligações O-glicosídicas devido ao oxigênio (ou ligação éter) entre os açúcares unidos. Em algumas modalidades, uma ligação glicosídica entre dois açúcares ou entre um açúcar e um conector pode também ser referida como uma “conexão glicosídica”.

[0061] *In vitro*: Como aqui usado, o termo “*in vitro*” refere-se aos eventos que ocorrem em um ambiente artificial, *e.g.*, em um tubo de ensaio ou vaso de reação, em cultura celular, em uma placa de Petri, etc., ao invés de dentro de um organismo (*e.g.*, animal, planta, ou micróbio).

[0062] *In vivo*: Como aqui usado, o termo “*in vivo*” refere-se aos eventos que ocorrem dentro de um organismo (*e.g.*, animal, planta, ou micróbio ou célula ou tecido do(a) mesmo(a)).

[0063] *Isolado*: Como aqui usado, o termo “isolado” é sinônimo de “separado”, mas traz consigo a inferência de que a separação foi realizada pelo ser humano. Em uma modalidade, uma substância ou entidade isolada é uma que tem sido separada de pelo menos alguns dos componentes com os quais ela estava previamente associada (quer na natureza quer em um ambiente experimental). Substâncias isoladas podem ter vários níveis de pureza com referência às substâncias das quais têm estado associadas. Substâncias e/ou entidades isoladas podem ser separadas de pelo menos cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, ou mais dos outros componentes com os quais estavam inicialmente associadas. Em algumas modalidades, agentes isolados são mais que cerca de 80%, cerca de 85%,

cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou mais que cerca de 99% puros. Como aqui usado, uma substância é “pura” se estiver substancialmente isenta de outros componentes.

[0064] *Kit*: Como aqui usado, o temo “kit” refere-se a um conjunto que inclui um ou mais componentes adaptados para um propósito cooperativo e instruções para uso dos mesmos.

[0065] *Nocaut*: Como aqui usado, o temo “*nocaut*” refere-se a um organismo em que um gene existente tem sido inativado mediante um processo que tipicamente envolve a ação do ser humano. Em um organismo com *nocaut*, um gene que tem sido inativado é dito que tem sido “*nocautado*”. Em algumas modalidades, o gene *nocautado* pode ser inativado mediante a inserção de uma sequência de nucleotídeos no gene ou mediante a substituição inteira do gene.

[0066] *Conector*: como aqui usado, um “conector” refere-se a uma porção que conecta dois ou mais domínios, duas ou mais porções ou duas ou mais entidades. Em uma modalidade, um conector pode incluir 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais átomos. Em uma modalidade adicional, um conector pode incluir um grupo de átomos, *e.g.*, de 10 a 1.000 átomos. Como átomos ou grupos dos mesmos podem incluir, mas não são limitados a, carbono, amino, alquilamino, oxigênio, enxofre, sulfóxido, sulfonila, carbonila, e imina. Em algumas modalidades, o conector pode incluir um aminoácido, um peptídeo, um polipeptídeo ou uma proteína. Em algumas modalidades, uma porção ligada por um conector pode incluir, mas não é limitada a, um átomo, um grupo químico, um nucleosídeo, um nucleotídeo, uma nucleobase, um açúcar, um ácido nucleico, um aminoácido, um peptídeo, um polipeptídeo, uma proteína, um complexo de proteína, uma carga útil (*e.g.*, um agente terapêutico) ou um marcador (incluindo, mas não limitado a, um marcador químico, um marcador fluorescente, um marcador radioativo ou um marcador

bioluminescente). O conector pode ser usado para qualquer propósito útil, como para formar multímeros ou conjugados, e também para administrar uma carga útil, como aqui descrito. Exemplos de grupos químicos que podem ser incorporados no conector incluem, mas não são limitados a, alquila, alquenila, alquinila, amido, amino, éter, tioéter, éster, alquilenos, heteroalquilenos, arila, ou heterocíclica, cada um dos quais pode estar opcionalmente substituído, como aqui descrito. Exemplos de conectores incluem, mas não são limitados a, alcanos insaturados, poli(glicóis etilênicos) (*e.g.*, unidades monoméricas de glicol etilênico ou glicol propilênico, *e.g.*, glicol dietilênico, glicol dipropilênico, glicol trietilênico, glicol tripropilênico, glicol tetrapropilênico, glicol tetraetilênico, ou glicol tetraetilênico [sic]), e polímeros de dextrana. Outros exemplos incluem, mas não são limitados a, porções cliváveis dentro do conector, como, por exemplo, uma ligação dissulfeto (-S-S-) ou uma ligação azo (-N=N-), que podem ser clivadas usando um agente redutor ou fotólise. Exemplos não limitadores de ligações seletivamente cliváveis incluem uma ligação amido que pode ser clivada por exemplo pelo uso de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, *Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine*), ou outros agentes redutores, e/ou fotólise, e também uma ligação éster que pode ser clivada por exemplo por hidrólise ácida ou básica. Em algumas modalidades, um conector é uma porção carboidrato usada para conectar glicanas em um substrato, como em um arranjo de glicanas. Tais conectores à base de carboidrato incluem, mas não são limitados a $-O(CH_2)_2CH_2NH_2$ e $-O(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$.

[0067] *mRNA*: Como aqui usado, o termo “mRNA” refere-se ao RNA mensageiro (*messenger RNA*) produzido como resultado de transcrição gênica e processamento do transcrito gerado. Em algumas modalidades, mRNA que tem deixado o núcleo da célula pode ser extraído da célula ou de um conjunto de células e analisado para determinar quais genes têm experimentado transcrição em um determinado tempo ou sob um dado conjunto de

circunstâncias.

[0068] *Mucina*: Como aqui usado, o termo “mucina” refere-se a uma família de proteínas que estão intensamente glicosiladas. Em algumas modalidades mucinas são produzidas pelas glândulas submaxilares e são encontradas em saliva e muco.

[0069] *Seleção negativa*: Como aqui usado, o termo “seleção negativa” refere-se à seleção de membros de biblioteca de uma biblioteca de apresentação com base na capacidade deles para se ligarem a entidades e/ou componentes de uma composição que não inclui um antígeno-alvo. Em algumas modalidades, a seleção negativa é usada antes da seleção positiva para remover elementos que poderiam se ligar não especificamente ao alvo.

[0070] *Alvo diferente do previsto (off-target)*: Como aqui usado, “alvo diferente do previsto (*off-target*)” refere-se a qualquer efeito não pretendido em qualquer um ou mais alvo, gene, ou transcrito celular.

[0071] *Paciente*: Como aqui usado, “paciente” refere-se a um sujeito que pode almejar ou estar em necessidade de tratamento, requer tratamento, está recebendo tratamento, receberá tratamento, ou um sujeito que está sob o cuidado de um profissional treinado (*e.g.*, licenciado) para uma doença ou condição específica.

[0072] *Peptídeo*: Como aqui usado, “peptídeo” é uma proteína ou um polipeptídeo que é menor que ou igual a 50 aminoácidos em comprimento, *e.g.*, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 aminoácidos em comprimento.

[0073] *Farmacologicamente aceitável*: A frase “*farmacologicamente aceitável*” é aqui utilizada para se referir àqueles(as) compostos, materiais, composições, e/ou formas de dosagem que são, dentro do escopo do julgamento médico sensato, adequados(as) para uso em contato com os tecidos de seres humanos e de animais sem excessiva toxicidade, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, comensurável com uma

razão de benefício/risco razoável.

[0074] *Excipientes farmacologicamente aceitáveis*: A frase “excipiente farmacologicamente aceitável”, como aqui usada, refere-se a qualquer ingrediente diferente de agentes ativos (*e.g.*, como aqui descritos) presente em uma composição farmacêutica e tendo as propriedades de ser substancialmente não tóxico e não inflamatório em um paciente. Em algumas modalidades, um excipiente farmacologicamente aceitável é um veículo capaz de suspender ou dissolver o agente ativo. Excipientes podem incluir, por exemplo: agentes antiaderentes, antioxidantes, aglutinantes, revestimentos, auxiliares de compressão, desintegrantes, corantes (agentes colorantes), emolientes, emulsificantes, enchimentos (diluentes), agentes formadores de filme ou revestimentos, flavorizantes, fragrâncias, agentes deslizantes (intensificadores de fluxo), lubrificantes, conservantes, tintas para impressão, absorventes, agentes suspensores ou dispersantes, adoçantes, e águas de hidratação. Excipientes exemplificadores incluem, mas não são limitados a: hidroxitolueno butilado (BHT, *Butylated Hydroxy Toluene*), carbonato de cálcio, fosfato de cálcio (dibásico), estearato de cálcio, croscarmellose, polivinilpirrolidona reticulada, ácido cítrico, crospovidona, cisteína, eticelulose, gelatina, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, lactose, estearato de magnésio, maltitol, manitol, metionina, metilcelulose, metilparabeno, celulose microcristalina, poli(glicol etilênico), polivinilpirrolidona, povidona, amido pré-gelatinizado, propilparabeno, palmitato de retinila, *shellac*, dióxido de silício, carboximetilcelulose de sódio, citrato de sódio, amidoglicolato de sódio, sorbitol, amido (de milho), ácido esteárico, sacarose, talco, dióxido de titânio, vitamina A, vitamina E, vitamina C, e xilitol.

[0075] *Sais farmacologicamente aceitáveis*: Sais farmacologicamente aceitáveis dos compostos aqui descritos são formas dos compostos revelados em que a porção ácida ou básica está em sua forma salina (*e.g.*, como gerada

pela reação de um grupo base livre com um ácido orgânico adequado) Exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, sais de ácidos minerais ou orgânicos de resíduos básicos como aminas; sais de álcali ou orgânicos de resíduos ácidos como ácidos carboxílicos; e semelhantes. Sais de adição de ácido representativos incluem sais de acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenossulfonato, benzoato, bissulfato, borato, butirato, canforato, canforossulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digliconato, dodecilsulfato, etanossulfonato, fumarato, glico-heptonato, glicerofosfato, hemissulfato, heptonato, hexanoato, bromidrato, cloridrato, iodidrato, 2-hidroxi-etanossulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartarato, tiocianato, toluenossulfonato, undecanoato, valerato, e semelhantes. Sais de metais alcalinos ou de metais alcalinoterrosos representativos incluem sódio, lítio, potássio, cálcio, magnésio, e semelhantes, e também cátions não tóxicos de amônio, amônio quaternário, e amina incluindo, mas não limitados a amônio, tetrametilamônio, tetraetilamônio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, e semelhantes. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais não tóxicos convencionais, por exemplo, de ácidos inorgânicos ou orgânicos não tóxicos. Em algumas modalidades um sal farmaceuticamente aceitável é preparado a partir de um composto parental que contém uma porção básica ou ácida por métodos químicos convencionais. Geralmente, tais sais podem ser preparados pela reação das formas de ácido livre ou de base livre destes compostos com uma quantidade estequiométrica da base apropriada ou do ácido apropriado em água ou em um solvente orgânico, ou em uma mistura dos dois; geralmente, meios não aquosos como éter, acetato de etila, etanol, isopropanol, ou acetonitrila são preferidos. Listas

de sais adequados são encontradas em “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, “Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use”, P.H. Stahl e C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, e Berge *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (1977), cada um dos quais é aqui incorporado em sua totalidade como referência. *Solvato farmacêuticamente aceitável*: O termo “solvato farmacêuticamente aceitável”, como aqui usado, refere-se a uma forma cristalina de um composto em que as moléculas de um solvente adequado estão incorporadas no retículo cristalino. Por exemplo, solvatos podem ser preparados por cristalização, recristalização, ou precipitação de uma solução que inclui solventes orgânicos, água, ou uma mistura dos mesmos. Exemplos de solvatos adequados são etanol, água (por exemplo, mono-, di-, e tri-hidratos), N-metilpirrolidinona (NMP), sulfóxido dimetílico (DMSO, *DiMethyl SulfOxide*), N,N'-dimetilformamida (DMF), N,N'-dimetilacetamida (DMAC), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetra-hidro-2-(1H)-pirimidinona (DMTHP), acetonitrila (ACN), glicol propilênico, acetato de etila, álcool benzílico, 2-pirrolidona, benzoato de benzila, e semelhantes. Quando água é o solvente, o solvato é chamado de um “hidrato”. Em algumas modalidades, o solvente incorporado em um solvato é de um tipo ou está em um nível que é fisiologicamente tolerável por um organismo ao qual o solvato é administrado (*e.g.*, em uma forma de dosagem unitária de uma composição farmacêutica).

[0076] *Farmacocinética*: Como aqui usada, “farmacocinética” refere-se a qualquer uma ou mais propriedades de uma molécula ou de um composto no que diz respeito à determinação do destino de substâncias administradas a um organismo vivo. A farmacocinética é dividida em várias áreas incluindo a extensão e a velocidade de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção. Isto é comumente referido como ADME onde: (A) Absorção é o processo de uma substância entrando na circulação sanguínea; (D) Distribuição é a

dispersão ou disseminação de substâncias em todos os fluidos e tecidos do corpo; (M) Metabolismo (ou Biotransformação) é a transformação irreversível de compostos parentais em metabólitos derivados; e (E) Excreção (ou Eliminação) refere-se à eliminação das substâncias do corpo. Em casos raros, alguns fármacos acumulam-se irreversivelmente no tecido corporal.

[0077] *Físico-química*: Como aqui usada, “físico-química” significa a uma propriedade física e/ou química.

[0078] *Seleção positiva*: Como aqui usado, o termo “seleção positiva” refere-se à seleção de uma dada entidade de um grupo de entidades singulares. Tais entidades e grupos das mesmas podem ser, por exemplo, anticorpos. Em alguns casos podem ser fragmentos de anticorpos ou fragmentos de anticorpos expressados em associação com um agente capaz de expressar tais fragmentos (*e.g.* membros de biblioteca de uma biblioteca de apresentação). A seleção pode ser com base na capacidade de entidades selecionadas se ligarem a um alvo ou epítipo desejado. Em algumas modalidades, a seleção positiva pode ser usada com bibliotecas de apresentação em fago para identificar partículas de fago expressoras de scFvs que se ligam ao alvo desejado. Em outras modalidades, a seleção positiva pode referir-se à seleção de candidatos de anticorpo dentre um acervo de anticorpos. Em outros casos, entidades podem ser células, linhagens celulares ou clones como na seleção de clones durante a seleção de hibridomas. Em tais casos, a seleção positiva pode referir-se à seleção clonal com base em um ou mais atributos de anticorpos (*e.g.* especificidade para um ou mais epítopos desejados) produzidos por tais clones. Em alguns casos, epítopos desejados em métodos de seleção positiva podem incluir STn (*e.g.* AcSTn e/ou GcSTn).

[0079] Inversamente, “*Seleção negativa*”, como aqui usada, inclui os mesmos princípios e exemplos descritos para a seleção positiva, mas com a característica distintiva de que é usada para a remoção de entidades indesejadas de um grupo de entidades singulares.

[0080] *Prevenção*: Como aqui usado, o termo “prevenção” refere-se ao retardamento parcial ou total do início de uma infecção, uma doença, um distúrbio e/ou uma condição; retardamento parcial ou total do início de um ou mais sintomas, atributos, ou manifestações clínicas de uma infecção específica, uma doença específica, um distúrbio específico e/ou uma condição específica; retardamento parcial ou total do início de um ou mais sintomas, atributos, ou manifestações de uma infecção específica, uma doença específica, um distúrbio específico e/ou uma condição específica; retardamento parcial ou total da progressão de uma infecção específica, uma doença específica, um distúrbio específico e/ou uma condição específica; e/ou decréscimo do risco para desenvolvimento de patologia associada com a infecção, a doença, o distúrbio, e/ou a condição.

[0081] *Pró-fármaco*: A presente revelação também inclui pró-fármacos dos compostos aqui descritos. Como aqui usados, “pró-fármacos” referem-se a qualquer substância, molécula ou entidade que está em uma forma com base naquela substância, molécula ou entidade para atuar como um agente terapêutico após alteração química ou física. Os pró-fármacos podem ser covalentemente ligados ou sequestrados em alguma maneira e liberados ou convertidos na porção farmacêutica ativa antes da, durante a ou após a administração a um sujeito mamífero. Os pró-fármacos podem ser preparados pela modificação de grupos funcionais presentes nos compostos em uma tal maneira que a modificação é clivada, quer em manipulação rotineira quer *in vivo*, para os compostos parentais. Os pró-fármacos incluem compostos em que grupos hidroxila, amino, sulfidril, ou carboxila estão ligados a qualquer grupo que, quando administrados a um sujeito mamífero, cliva-se para formar um grupo hidroxila, amino, sulfidril, ou carboxila livre respectivamente. A preparação e o uso de pró-fármacos são discutidos em T. Higuchi e V. Stella, “Pro-drugs as Novel Delivery Systems”, Vol. 14 da A.C.S. Symposium Series, e em “Bioreversible Carriers in Drug Design”, ed.

Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, ambos os quais são por meio deste aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[0082] *Proximal*: Como aqui usado, o termo “proximal” significa situado mais próximo ao centro ou a um ponto ou a uma região de interesse.

[0083] *Região de interação*: Como aqui usado, o termo “região de interação” refere-se a uma região ao longo de quaisquer duas ou mais entidades onde tais entidades interagem ou sobrepõem-se. Em algumas modalidades, uma região de interação pode incluir um ou mais resíduos de açúcar ao longo de uma cadeia de glicana que contata uma segunda cadeia de glicana. Em algumas modalidades, as cadeias de glicanas são cadeias de ramificação da mesma cadeia parental. Em algumas modalidades, uma região de interação pode ocorrer entre duas cadeias de glicana em que uma cadeia é uma cadeia de ramificação e a segunda cadeia é uma cadeia parental. No caso de cadeias de glicanas, as regiões de interação podem incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou pelo menos 10 resíduos de açúcar. Em algumas modalidades, as regiões de interação podem também ocorrer entre glicanas e proteínas ou entre glicanas e lipídios.

[0084] *Resíduo*: Como aqui usado, o termo “resíduo” refere-se a um monômero associado com ou capaz de associar-se com um polímero. Em algumas modalidades, os resíduos incluem moléculas de açúcares incluindo, mas não limitadas a glicose, galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, ácidos siálicos. Em algumas modalidades, os resíduos incluem aminoácidos.

[0085] *Amostra*: Como aqui usado, o termo “amostra” refere-se a um alíquota ou porção retirada de uma fonte e/ou provida para análise ou processamento. Em algumas modalidades, uma amostra é de uma fonte biológica (também referida aqui como uma “amostra biológica”) como um tecido, uma célula ou parte componente (*e.g.* um fluido corporal, incluindo

mas não limitado a sangue, plasma, soro, muco, fluido linfático, fluido sinovial, fluido cérebro-espinhal, saliva, fluido amniótico, sangue do cordão amniótico, urina, fluido vaginal e sêmen). Em algumas modalidades, uma amostra pode ser ou incluir um homogeneizado, um lisado ou extrato preparado a partir de um organismo completo ou um subconjunto de seus tecidos, suas células ou suas partes componentes, ou uma fração ou porção do(s) mesmos(as), incluindo mas não limitada a, por exemplo, plasma, soro, fluido espinhal, fluido linfático, as seções externas da pele, dos tratos respiratório, intestinal, e genitourinário, lágrimas, saliva, leite, células sanguíneas, tumores, órgãos. Em algumas modalidades, uma amostra inclui um meio, como um caldo nutriente ou gel nutriente, que pode conter componentes celulares, como proteínas ou molécula de ácido nucleico. Em algumas modalidades, uma amostra “primária” é uma alíquota da fonte. Em algumas modalidades, uma amostra primária é submetida a uma ou mais etapas de processamento (*e.g.*, separação, purificação, etc.) para preparar uma amostra para análise ou outro uso.

[0086] *Sialil*: Como aqui usado, o prefixo “sialil” e também o termo “sialilado” descrevem compostos incluindo ácido siálico.

[0087] *Dose unitária única*: Como aqui usada, uma “dose unitária única” é uma dose de qualquer agente terapêutico administrada em uma dose/em um tempo/única rota/único ponto de contato, *i.e.*, único evento de administração. Em algumas modalidades, uma dose unitária única é provida como uma forma de dosagem discreta (*e.g.*, um comprimido, uma cápsula, um emplastro, uma seringa carregada, um frasco, etc.).

[0088] *Dose dividida*: Como aqui usada, uma “dose dividida” é a divisão de uma dose unitária única ou de uma dose diária total em duas ou mais doses.

[0089] *Estável*: Como aqui usado, “estável” refere-se a um composto ou a uma entidade que é suficientemente robusto(a) para sobreviver ao

isolamento, em um grau de pureza útil, a partir de uma mistura de reação, e preferivelmente é capaz de formulação em um agente terapêutico eficaz.

[0090] *Estabilizado*: Como aqui usado, os termos “estabilizar”, “estabilizado”, “região estabilizada” significam fazer ou tornar estável. Em algumas modalidades, a estabilidade é medida relativa a um valor absoluto. Em algumas modalidades, a estabilidade é medida relativa a um composto de referência ou a uma entidade de referência.

[0091] *Padrão de cuidado*: Como aqui usada, a frase “padrão de cuidado” refere-se aos métodos de tratamento terapêutico que se alinham com os métodos praticados por uma maioria daquelas pessoas versadas na técnica na provisão de tal tratamento.

[0092] *Sujeito*: Como aqui usado, o temo “sujeito” ou “paciente” refere-se a qualquer organismo ao qual uma composição de acordo com a invenção pode ser administrada, *e.g.*, para propósitos experimentais, diagnósticos, profiláticos, e/ou terapêuticos. Sujeitos típicos incluem animais (*e.g.*, mamíferos como camundongos, ratos, coelhos, primatas não humanos, e humanos) e/ou plantas.

[0093] *Glândulas submaxilares*: Como aqui usado, o temo “glândulas submaxilares” ou “glândulas submandibulares” refere-se às glândulas produtoras de muco localizadas abaixo do assoalho bucal. Estas glândulas são capazes de produzir mucinas e em algumas modalidades, podem ser extraídas de mamíferos como uma fonte de mucina.

[0094] *Sofrendo de*: Um indivíduo que está “sofrendo de” uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição, tem sido diagnosticado com ou apresenta um ou mais sintomas de uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição.

[0095] *Susceptível a*: Um indivíduo que é “susceptível a” uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição não tem sido diagnosticado com e/ou pode não apresentar sintomas da doença, do distúrbio, e/ou da condição

mas apresenta uma propensão para desenvolver uma doença ou seus sintomas. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição (por exemplo, câncer) pode ser caracterizado por um ou mais dos seguintes: (1) uma mutação genética associada com o desenvolvimento da doença, do distúrbio, e/ou da condição; (2) um polimorfismo genético associado com o desenvolvimento da doença, do distúrbio, e/ou da condição; (3) expressão e/ou atividade aumentada e/ou decrescida de uma proteína e/ou de um ácido nucleico associado(a) com a doença, o distúrbio, e/ou a condição; (4) hábitos e/ou estilos de vida associados com o desenvolvimento da doença, do distúrbio, e/ou da condição; (5) uma história familiar da doença, do distúrbio, e/ou da condição; e (6) exposição a e/ou infecção com um micróbio associado com o desenvolvimento da doença, do distúrbio, e/ou da condição. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição desenvolverá a doença, o distúrbio, e/ou a condição. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição não desenvolverá a doença, o distúrbio, e/ou a condição.

[0096] *Sintético*: O termo “sintético” significa produzido, preparado, e/ou fabricado pelo ser humano. A síntese de polinucleotídeos ou de polipeptídeos ou de outras moléculas da presente invenção pode ser química ou enzimática.

[0097] *Alvo*: Como aqui usado, o termo “alvo” refere-se a um objeto ou a uma entidade a ser afetado(a) por uma ação. Em algumas modalidades, os alvos referem-se a antígenos a serem usados para o desenvolvimento de anticorpos que especificamente se ligam aos antígenos.

[0098] *Triagem de alvo*: Como aqui usado, o termo “triagem de alvo” refere-se ao uso de uma substância-alvo para identificar os parceiros de ligação para aquela substância.

[0099] *Sítio-alvo*: Como aqui usado, o termo “sítio-alvo” refere-se a uma região sobre ou dentro de uma ou mais glicanas, glicoproteínas, biomoléculas e/ou bioestruturas sobre ou dentro de uma célula, do espaço extracelular, de um tecido, de um órgão e/ou de um organismo que é reconhecida por um agente de ligação ou uma molécula efetora (*e.g.*, um anticorpo). Em algumas modalidades, os sítios-alvo de glicanas podem residir exclusivamente em um resíduo de açúcar, podem ser formados por dois ou mais resíduos, ou podem incluir componentes tanto de glicana quanto de não glicana. Em algumas modalidades, os sítios-alvo são formados entre duas ou mais glicanas ou glicoproteínas. Em algumas modalidades, os sítios-alvo são formados entre cadeias de ramificação da mesma glicana ou entre uma ou mais cadeias de ramificação e uma cadeia parental.

[00100] *Células-alvo*: Como aqui usado, “células-alvo” referem-se a qualquer de uma ou mais células de interesse. As células podem ser encontradas *in vitro*, *in vivo*, *in situ* ou no tecido ou no órgão de qualquer organismo. O organismo pode ser um animal, um mamífero, ou um humano (*e.g.*, um paciente humano).

[00101] *Resíduo terminal*: Como aqui usado, o termo “resíduo terminal” refere-se ao último resíduo em uma cadeia polimérica. Em algumas modalidades, os resíduos terminais são resíduos de açúcar localizados na extremidade não redutora de uma cadeia de polissacarídeo.

[00102] *Terapêutico*: Como aqui usado, o termo “terapêutico” refere-se a qualquer substância ou procedimento que diz respeito à cura de uma doença, um distúrbio, ou uma condição. Por exemplo, tratamento terapêutico refere-se a qualquer tratamento que diz respeito à cura de uma doença, um distúrbio, ou uma condição.

[00103] *Agente terapêutico*: O termo “agente terapêutico” refere-se a qualquer substância que, quando administrada a um sujeito, tem um efeito terapêutico, diagnóstico, e/ou profilático e/ou produz um efeito biológico e/ou

farmacológico desejado.

[00104] *Quantidade terapeuticamente eficaz:* Como aqui usado, o termo “quantidade terapeuticamente eficaz” significa uma quantidade de um agente a ser distribuído (*e.g.*, ácido nucleico, fármaco, agente terapêutico, agente diagnóstico, agente profilático, etc.) que é suficiente, quando administrada a um sujeito sofrendo de ou suscetível a uma infecção, uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição, para tratar, melhorar os sintomas, diagnosticar, prevenir, e/ou retardar o início da infecção, da doença, do distúrbio, e/ou da condição. Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz é provida em uma dose única. Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz é administrada em um regime de dosagem que inclui uma pluralidade de doses. Aquelas pessoas versadas na técnica reconhecerão que em algumas modalidades, uma forma de dosagem unitária pode ser considerada como incluindo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente específico ou de uma entidade específica se inclui uma quantidade que é eficaz quando administrada como parte de um tal regime de dosagem.

[00105] *Evolução terapeuticamente eficaz:* Como aqui usado, o termo “evolução terapeuticamente eficaz” significa uma evolução que é suficiente em um sujeito sofrendo de ou suscetível a uma infecção, uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição, para tratar, melhorar os sintomas, diagnosticar, prevenir, e/ou retardar o início da infecção, da doença, do distúrbio, e/ou da condição.

[00106] *Dose diária total:* Como aqui usada, uma “dose diária total” é uma quantidade dada ou receitada em período de 24 horas. Pode ser administrada como uma dose unitária única.

[00107] *Transgênico:* Como aqui usado, o termo “transgênico” refere-se a um organismo que inclui um ou mais genes incorporados dentro do genoma do organismo que não são naturalmente encontrados naquele organismo.

[00108] *Tratamento:* Como aqui usado, o termo “tratamento” refere-se a

parcial ou completamente aliviar, curar, minorar, melhorar, mitigar, retardar o início de, inibir a progressão de, reduzir a severidade de, e/ou reduzir a incidência de um ou mais sintomas ou atributos de uma infecção específica, uma doença específica, um distúrbio específico, e/ou uma condição específica. Por exemplo, “tratamento” de câncer pode referir-se à inibição de sobrevivência, crescimento, e/ou disseminação de um tumor. Tratamento pode ser administrado a um sujeito que não apresenta sinais de uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição e/ou a um sujeito que apresenta apenas sinais iniciais de uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição para o propósito de decrescer o risco para desenvolvimento de patologia associada com a doença, o distúrbio, e/ou a condição.

[00109] *Região variável:* Como aqui usado, o temo “região variável” ou “domínio variável” refere-se aos domínios de anticorpo específico que diferem extensivamente em sequência dentre anticorpos e são usados na ligação e na especificidade de cada anticorpo específico para seu antígeno específico .

[00110] *IgG inteira:* Como aqui usado, o temo “IgG inteira” refere-se a uma molécula de IgG completa. Em algumas modalidades, as moléculas de IgG inteiras incluem regiões encontradas naturalmente em dois ou mais outros organismos.

[00111] *Tipo selvagem:* Como aqui usado, o temo “tipo selvagem” refere-se a um organismo que inclui um genoma natural (isento de genes derivados de outros organismos).

I. Compostos e composições

[00112] Em algumas modalidades, a presente invenção provê compostos e também composições que incluem pelo menos um anticorpo interagente com glicana. Dentro de uma glicana, todos os monômeros monossacarídicos podem ser os mesmos ou podem ser diferentes. Os monômeros comuns incluem, mas não são limitados a trioses, tetroses,

pentoses, glicose, frutose, galactose, xilose, arabinose, lixose, alose, altrose, manose, gulose, iodose, ribose, mano-heptulose, sedo-heptulose e talose. Aminoaçúcares também podem ser monômeros dentro de uma glicana. Glicanas incluindo tais açúcares são aqui referidas como aminoglicanas. Aminoaçúcares, como aqui usados, são moléculas de açúcares que incluem um grupo amina no lugar de um grupo hidroxila, ou em algumas modalidades, um derivado de açúcar de um tal açúcar. Exemplos de aminoaçúcares incluem, mas não são limitados a glicosamina, galactosamina, *N*-acetilglicosamina, *N*-acetilgalactosamina, ácidos siálicos (incluindo, mas não limitados a, ácido *N*-acetilneuramínico e ácido *N*-glicolilneuramínico) e *L*-daunosamina.

[00113] Como aqui usado, o termo “anticorpo interagente com glicana” refere-se a um anticorpo que pode interagir com uma porção glicana. Tais anticorpos podem ligar-se a uma porção glicana sozinha, a múltiplas porções glicana, ou aos epítomos que incluem tanto componentes de glicana quanto componentes de não glicana. Os componentes de não glicana podem incluir, mas não são limitados a proteínas, porções associadas com proteínas (como modificações pós-tradicionais), células, estruturas/moléculas associadas com células. Anticorpos interagentes com glicanas podem funcionar para se ligarem a, alterarem, ativarem, inibirem, estabilizarem, degradarem e/ou modularem uma glicana ou uma entidade ou molécula associada com glicana. Assim fazendo, os anticorpos interagentes com glicanas podem funcionar como uma composição terapêutica, paliativa, profilática ou como uma composição de tratamento contínuo. Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas podem incluir conjugados ou combinações com outras moléculas. Em algumas modalidades, anticorpos interagentes com glicanas são direcionados para glicanas tendo um ou mais aminoaçúcares. Em uma modalidade adicional, um ou mais aminoaçúcares é ácido siálico. Em uma modalidade adicional, um ou mais ácidos siálicos é ácido *N*-

acetilneuramínico e/ou ácido N-glicolilneuramínico.

Anticorpos

[00114] Os anticorpos interagentes com glicanas podem incluir anticorpos inteiros ou fragmentos dos mesmos. Como aqui usado, o termo “anticorpo” é usado no sentido mais amplo e abrange vários formatos incluindo, mas não limitados a anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (*e.g.*, anticorpos biespecíficos formados de pelo menos dois anticorpos intactos), conjugados de anticorpo (incluindo, mas não limitados a conjugados de anticorpo-fármaco), variantes de anticorpo [incluindo, mas não limitadas a miméticos de anticorpo, anticorpos quiméricos (*e.g.* anticorpos com sequências de aminoácidos derivadas de mais de uma espécie), e variantes sintéticas], e fragmentos de anticorpo, desde que apresentem uma atividade biológica desejada (*e.g.*, ligação, ativação, inibição, estabilização, degradação, e/ou modulação de um ou mais alvos). Anticorpos são predominantemente moléculas com base em aminoácidos mas podem incluir uma ou mais modificações sintéticas ou pós-tradicionais. As modificações pós-traducionais podem incluir glicosilação.

[00115] Como aqui usado, o termo “fragmento de anticorpo” refere-se a uma porção de um anticorpo intacto ou de uma proteína de fusão do mesmo, em alguns casos incluindo pelo menos uma região de ligação ao antígeno. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, fragmento variáveis de cadeia única (scFvs, *single-chain variable fragments*); diacorpos; tri(a)corpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpos. A digestão por papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação ao antígeno idêntico, chamados de fragmentos “Fab”, cada um com um único sítio de ligação ao antígeno. Também é produzido um fragmento “Fc” residual, cujo nome reflete sua capacidade para se cristalizar facilmente. O tratamento com pepsina produz um fragmento F(ab')₂ que tem

dois sítios de ligação ao antígeno e é ainda capaz de ligação cruzada ao antígeno. Anticorpos interagentes com glicanas podem incluir um ou mais destes fragmentos e podem, por exemplo, ser gerados mediante digestão enzimática de anticorpos inteiros ou mediante expressão recombinante.

[00116] “Anticorpos nativos” são habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H, *heavy*) idênticas. Genes codificantes de cadeias pesadas e leves de anticorpo são conhecidos e segmentos que compõem cada um têm sido bem caracterizados e descritos (Matsuda, F. *et al.*, 1998. *The Journal of Experimental Medicine*. 188(11); 2151-62 e Li, A. *et al.*, 2004. *Blood*. 103(12): 4602-9, cujos conteúdos de cada um são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto que o número de ligações dissulfeto varia dentre as cadeias pesadas de diferentes isótipos de imunoglobulina. Cada cadeia leve e cada cadeia pesada têm, também, pontes de dissulfeto intracadeia regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada tem em uma extremidade um domínio variável (VH) seguido por numerosos domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (VL) e um domínio constante em sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável de cadeia leve está alinhado com o domínio variável de cadeia pesada.

[00117] Como aqui usado, o termo “domínio variável” refere-se aos domínios de anticorpo específico encontrados em ambas as cadeias pesadas e leves do anticorpo que diferem extensivamente em sequência dentre os anticorpos e são usados na ligação e na especificidade de cada anticorpo específico para seu antígeno específico. Os domínios variáveis incluem regiões hipervariáveis. Como aqui usado, o termo “região hipervariável”

refere-se a uma região dentro de um domínio variável que inclui resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação ao antígeno. Os aminoácidos presentes dentro das regiões hipervariáveis determinam a estrutura das regiões determinantes de complementaridade (CDRs, *Complementarity Determining Regions*) que se tornam parte do sítio de ligação ao antígeno do anticorpo. Como aqui usado, o termo “CDR” refere-se a uma região de um anticorpo que inclui uma estrutura que é complementar ao seu epítopo ou antígeno-alvo. Outras porções do domínio variável, não interagentes com o antígeno, são referidas como regiões *framework* (FW) (regiões arcabouço). O sítio de ligação ao antígeno (também conhecido como o parátipo ou sítio de combinação com o antígeno) inclui os resíduos de aminoácidos necessários para interagir com um antígeno específico. Os resíduos exatos que compõem o sítio de ligação ao antígeno são tipicamente elucidados por cocristalografia com antígeno ligado, entretanto avaliações computacionais podem ser também usadas com base em comparações com outros anticorpos (Strohl, W.R. “Therapeutic Antibody Engineering”. Woodhead Publishing, Philadelphia PA., EUA, 2012. Ch. 3, p47-54, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). A determinação de resíduos que compõem as CDRs pode incluir o uso de esquemas de numeração incluindo, mas não limitados a, aqueles ensinados por Kabat [Wu, T.T. *et al.*, 1970, *JEM*, 132(2):211-50 e Johnson, G. *et al.*, 2000, *Nucleic Acids Res.* 28(1): 214-8, cujos conteúdos de cada um são aqui incorporados em suas totalidades como referências], Chothia [Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1987), Chothia *et al.*, *Nature* 342, 877 (1989) e Al-Lazikani, B. *et al.*, 1997, *J. Mol. Biol.* 273(4):927-48, cujos conteúdos de cada um são aqui incorporados em suas totalidades como referências], Lefranc (Lefranc, M.P. *et al.*, 2005, *Immunome Res.* 1:3) e Honegger (Honegger, A. e Pluckthun, A. 2001. *J. Mol. Biol.* 309(3):657-70, cujos conteúdos de cada um são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00118] Os domínios VH e VL têm três CDRs cada. As VL CDRs são aqui referidas como CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, na ordem de ocorrência quando se move da terminação-N para a terminação-C ao longo do polipeptídeo de domínio variável. As VH CDRs são aqui referidas como CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, na ordem de ocorrência quando se move da terminação-N para a terminação-C ao longo do polipeptídeo de domínio variável. Cada uma das CDRs têm estruturas canônicas favorecidas com a exceção da CDR-H3, que inclui sequências de aminoácidos que podem ser elevadamente variáveis em sequência e comprimento entre anticorpos resultando em uma variedade de estruturas tridimensionais nos domínios de ligação ao antígeno (Nikoloudis, D. *et al.*, 2014. *Peer J.* 2:e456). Em alguns casos, as CDR-H3s podem ser analisadas dentre um painel de anticorpos relacionados para avaliar a diversidade de anticorpos. Vários métodos de determinação de sequências de CDR são conhecidos na técnica e podem ser aplicados às sequências de anticorpos conhecidas (Strohl, W.R. “Therapeutic Antibody Engineering”. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p47-54, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00119] Como aqui usado, o termo “Fv” refere-se a um fragmento de anticorpo que inclui o fragmento mínimo em um anticorpo necessário para formar um completo sítio de ligação ao antígeno. Estas regiões consistem em um dímero de um domínio da cadeia pesada e um domínio da cadeia leve em associação estreita, não covalente. Os fragmentos Fv podem ser gerados por clivagem proteolítica, mas são predominantemente instáveis. Métodos recombinantes são conhecidos na técnica para geração de fragmentos Fv estáveis, tipicamente mediante a inserção de um conector flexível entre o domínio variável de cadeia leve e o domínio variável de cadeia pesada [para formar um Fv de cadeia única (scFv, *single chain Fv*)] ou mediante a introdução de uma ponte de dissulfeto entre o domínio variável de cadeia

pesada e o domínio variável de cadeia leve (Strohl, W.R. “Therapeutic Antibody Engineering”. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p46-47, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00120] “Cadeias leves” de anticorpo de qualquer uma espécie de vertebrado podem ser designados a um de dois tipos claramente diferentes, chamados de *kappa* e *lambda* com base nas sequências de aminoácidos dos domínios constantes delas. Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das cadeias leves deles, os anticorpos podem ser designados a classes diferentes. Há cinco classes majoritárias de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias destas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isótipos), *e.g.*, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2.

[00121] Como aqui usado, o termo “Fv de cadeia única” ou “scFv” refere-se a uma proteína de fusão de domínios VH e VL de anticorpo, em que estes domínios são conectados juntos em uma única cadeia polipeptídica por um conector peptídico flexível. Em algumas modalidades, o conector polipeptídico de Fv permite que o scFv forme a estrutura desejada para a ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, scFvs são utilizados juntamente com apresentação em fago, apresentação em levedura ou outros métodos de apresentação onde podem ser expressados em associação com um membro de superfície (*e.g.* proteína capsidial de fago) e usados na identificação de peptídeos de alta afinidade para um dado antígeno.

[00122] O termo “diacorpos” refere-se aos pequenos fragmentos de anticorpo com dois sítios de ligação ao antígeno, cujos fragmentos incluem um domínio variável de cadeia pesada VH conectado a um domínio variável de cadeia leve VL na mesma cadeia polipeptídica. Pelo uso de um conector que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios

complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação ao antígeno. Diacorpos são descritos mais detalhadamente, por exemplo, em EP 404.097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), cujos conteúdos de cada um são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00123] O termo “intracorpo” refere-se a uma forma de anticorpo que não é secretada de uma célula na qual ele é produzido, mas, ao contrário, reconhece uma ou mais proteínas intracelulares. Intracorpos podem ser usados para afetar uma multiplicidade de processos celulares incluindo, mas não limitados a processos de tráfego intracelular, transcrição, tradução, metabólicos, divisão celular e sinalização proliferativa. Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção podem incluir terapias com base em intracorpos. Em algumas tais modalidades, sequências de domínio variável e/ou sequências de CDR aqui reveladas podem ser incorporadas em um ou mais constructos para terapia com base em intracorpos. Em alguns casos, os intracorpos da invenção podem reconhecer uma ou mais proteínas intracelulares glicadas ou podem modular a interação entre uma ou mais proteínas intracelulares glicadas e uma proteína alternativa.

[00124] O termo “receptor quimérico de antígeno” ou “CAR” (*Chimeric Antigen Receptor*) como aqui usado, refere-se aos receptores artificiais que são modificados para serem expressados sobre a superfície de células efectoras imunes resultando em direcionamento específico de tais células efectoras imunes para células expressoras de entidades que se ligam com alta afinidade aos receptores artificiais. CARs podem ser desenhados para incluir um ou mais segmentos de um anticorpo, um domínio variável de anticorpo e/ou de uma CDR de anticorpo, de modo que quando tais CARs são expressados sobre células efectoras imunes, as células efectoras imunes ligam-se a e eliminam quaisquer células que são reconhecidas pelas porções de anticorpo dos CARs. Em alguns casos, os CARs são desenhados para

especificamente se ligarem a células cancerosas, resultando em depuração imune-regulada das células cancerosas.

[00125] O termo “anticorpo monoclonal” como aqui usado refere-se a um anticorpo obtido de uma população de células substancialmente homogêneas (ou clones), *i.e.*, os anticorpos individuais compondo a população são idênticos e/ou ligam-se ao mesmo epítopo, exceto as possíveis variantes que podem ocorrer durante a produção do anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estando presentes em quantidades menores. Em contraste com as preparações de anticorpo policlonal que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno.

[00126] O modificador “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não é para ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Os anticorpos monoclonais aqui incluem anticorpos (imunoglobulinas) “quiméricos” nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou da cadeia leve é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpos específicos, enquanto que o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpos, e também fragmentos de tais anticorpos.

[00127] Formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (*e.g.*, murinos) são anticorpos quiméricos que contêm sequências mínimas derivadas de imunoglobulinas não humanas. Para a maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo de paciente recipiente) nas quais os resíduos da região hipervariável de um anticorpo do paciente

recipiente são substituídos por resíduos da região hipervariável de um anticorpo de uma espécie não humana (anticorpo doador) como camundongo, rato, coelho ou primata não humano tendo as desejadas especificidade, afinidade, e capacidade. Os anticorpos humanizados incluem uma ou mais retromutações que incluem a reversão de um ou mais aminoácidos de volta para os aminoácidos encontrados em um anticorpo doador. Inversamente, os resíduos de anticorpos doadores incluídos em anticorpos humanizados podem ser mutados para coincidirem com os resíduos presentes em anticorpos de paciente recipiente humano.

[00128] Em algumas modalidades, anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser miméticos de anticorpo. O termo “mimético de anticorpo” refere-se a qualquer molécula que imita a função ou o efeito de um anticorpo e que se liga especificamente e com alta afinidade aos seus alvos moleculares. Em algumas modalidades, os miméticos de anticorpo podem ser monocorpos, desenhados para incorporar o domínio de fibronectina de tipo III (Fn3) como um arcabouço de proteína (US 6.673.901; US 6.348.584). Em algumas modalidades, os miméticos de anticorpo podem ser aqueles conhecidos na técnica incluindo, mas não são limitados a molécula de aficorpo, afillinas, afitinas, anticalinas, avímeros, *DARPs*, *Fynomers* e peptídeos de domínio e tipo Kunitz. Em outras modalidades, os miméticos de anticorpo podem incluir uma ou mais regiões não peptídicas.

[00129] Como aqui usado, o termo “variante de anticorpo” refere-se a uma biomolécula que se parece com um anticorpo em estrutura, sequência e/ou função, mas que inclui algumas diferenças em suas sequências de aminoácidos, composição e estrutura em comparação com outro anticorpo ou um anticorpo nativo.

Desenvolvimento de anticorpos

[00130] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção são desenvolvidos para se ligarem a antígenos como aqueles aqui descritos.

Como aqui usado, um “antígeno” é uma entidade que induz ou evoca uma resposta imune em um organismo. Uma resposta imune é caracterizada pela reação das células, dos tecidos e/ou dos órgãos de um organismo à presença de uma entidade estranha. Uma tal resposta imune tipicamente resulta na produção pelo organismo de um ou mais anticorpos contra a entidade estranha, *e.g.*, antígeno ou uma porção do antígeno. Em alguns casos, métodos de imunização podem ser alterados baseando-se em uma ou mais evoluções de imunização desejadas. Como aqui usado, o termo “evolução de imunização” refere-se a um ou mais efeitos desejados de imunização. Exemplos incluem altos títulos de anticorpo e/ou especificidade de anticorpo aumentada para um alvo de interesse.

[00131] Os antígenos da invenção podem incluir glicanas, glicoconjugados (incluindo, mas não limitados a, glicoproteínas e glicolipídios), peptídeos, polipeptídeos, proteínas de fusão, ou qualquer um dos citados anteriormente e podem estar conjugados ou complexados com um ou mais adjuvantes separados ou com uma ou mais proteínas heterólogas separadas. Em algumas modalidades, os antígenos usados de acordo com os métodos da presente invenção podem incluir glicanas sialiladas, como STn. Os antígenos tendo STn podem incluir mucinas. As mucinas são uma família de proteínas que estão intensamente glicosiladas. São um componente de muitos tumores originários de células epiteliais (Ishida, A. *et al.*, 2008. *Proteomics*. 8: 3342-9, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). São elevadamente expressadas por glândulas submaxilares e podem ser encontradas em altos níveis em saliva e muco. Mucinas submaxilares derivadas de animais podem ser usadas como antígenos para gerar anticorpos anti-STn em hospedeiros imunogênicos. Mucina submaxilar de diferentes espécies diferem no seu conteúdo de STn com relação às formas AcSTn versus GcSTn. Mucina submaxilar porcina (PSM, *Porcine Submaxillary Mucin*) é particularmente rica em GcSTn, que

compõe cerca de 90% de STn total. STn de mucina submaxilar bovina (BSM, *Bovine Submaxillary Mucin*) inclui aproximadamente percentagens iguais de GcSTn e AcSTn. Mucina submaxilar ovina (OSM, *Ovine Submaxillary Mucin*) é particularmente rica em AcSTn, que compõe cerca de 90% de STn total. Em alguns casos, soluções preparadas para imunização podem ser modificadas para incluírem uma ou mais de PSM, BSM e OSM dependendo do alvo desejado dos anticorpos resultante de tal imunização. PSM pode ser usada em imunizações para gerar anticorpos em hospedeiros imunogênicos que são mais propensos a serem específicos para GcSTn. PSM é rica em glicoproteínas de tipo mucina contendo Neu5Gc, que estão decoradas com GcSTn. Dentre as fontes atualmente conhecidas de alto teor de Neu5Gc é a carne vermelha; especialmente as glândulas submaxilares foram previamente descritas como uma fonte rica em Neu5Gc devido à alta expressão da enzima CMAH, que catalisa a reação para produzir o precursor de Neu5Gc, CMP-Neu5Ac. Em alguns casos, PSM pode ser usada para prevenir uma resposta de pan-anti-Neu5Gc e induzir uma resposta imune mais específica contra GcSTn. OSM pode ser usada em imunizações para gerar anticorpos em hospedeiros imunogênicos que são mais propensos para serem específicos para AcSTn.

[00132] Em uma modalidade, a presente invenção provê um anticorpo interagente com glicana que é específico para GcSTn. O anticorpo tem pouca reatividade cruzada com Neu5Ac-STn ou Tn. O anticorpo pode ligar-se a GcSTn mas tem afinidade reduzida por AcSTn.

[00133] Em algumas modalidades, os antígenos podem ser submetidos à digestão enzimática antes da imunização para modular a resposta imune resultante em hospedeiros imunogênicos. Em um exemplo, as mucinas submaxilares podem ser tratadas com enzimas tripsina ou proteinase K antes da imunização. A atividade de tais enzimas pode ajudar a clivar e, deste modo, reduzir a percentagem e a variabilidade de epítomos de não STn. As

porções glicana podem proteger as regiões do peptídeo onde elas são ligadas contra a proteólise enzimática e, desta maneira, permanecerem intactas.

[00134] Os títulos de anticorpo resultantes das imunizações podem ter diferentes níveis de anticorpo dependendo do tipo e da quantidade de antígeno usado em tais imunizações. Em alguns casos, determinados antígenos podem ser selecionados para uso em imunizações com base no título previsto.

[00135] Como aqui usado, um “adjuvante” é um agente farmacêutico ou imunológico que modifica o efeito de outros agentes. Os adjuvantes de acordo com a presente invenção incluem, mas não são limitados a composições químicas, biomoléculas, agentes terapêuticos, e/ou regimes terapêuticos. Os adjuvantes podem incluir adjuvante de Freund (completo e/ou incompleto), oligonucleotídeos imunoestimulatórios [*e.g.* oligodesoxinucleotídeos (ODNs) CpG], composições contendo minerais, toxinas bacterianas ribosilantes de ADP, bioadesivos, mucoadesivos, micropartículas, lipídios, lipossomas, muramilpeptídeos, derivados de polietileno-piperazina N-oxidados, saponinas e/ou complexo imunoestimulantes (ISCOs, *Immune Stimulating Complexes*). Em algumas modalidades, os adjuvantes podem incluir emulsões de óleo-em-água (*e.g.* emulsões submicrométricas de óleo-em-água). Os adjuvantes de acordo com a presente invenção podem também incluir qualquer um daqueles revelados em Publicação de Patente U.S. nº US20120027813 e/ou Patente U.S. nº US8506966, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00136] Os anticorpos da presente invenção podem ser policlonais ou monoclonais ou recombinantes, produzidos por métodos conhecidos na técnica ou como descritos neste pedido. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser marcados para propósitos de detecção com um marcador detectável conhecido por uma pessoa versada na técnica. O marcador pode ser um radioisótopo, um composto fluorescente, um

composto quimioluminescente, uma enzima, ou um cofator de enzima, ou quaisquer outros marcadores conhecidos na técnica. Em alguns aspectos, o anticorpo que se liga a um antígeno desejado não está marcado, mas pode ser detectado pela ligação de um anticorpo secundário marcado que especificamente se liga ao anticorpo primário.

[00137] Os anticorpos da presente invenção (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) incluem, mas não são limitados a, anticorpos policlonais, monoclonais, multiespecíficos, humanos, humanizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, *e.g.*, anticorpos anti-Id aos anticorpos da invenção), anticorpos intracelularmente produzidos (*i.e.*, intracorpos), e fragmentos de ligação ao epítipo de qualquer um dos citados acima. Os anticorpos da invenção (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) podem ser de uma origem animal incluindo aves e mamíferos. Preferivelmente, tais anticorpos são de origem humana, murina (*e.g.*, camundongo e rato), de asno, de ovelha, de coelho, de cabra, de porquinho-da-índia, de camelo, de cavalo, ou de frango. Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (*e.g.*, biespecíficos, triespecíficos, ou de multiespecificidade maior). Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para epítipos diferentes de um antígeno-alvo da presente invenção, ou podem ser específicos para tanto um antígeno-alvo da presente invenção, quanto um epítipo heterólogo, como uma glicana heteróloga, um peptídeo heterólogo ou um material de suporte sólido. (Consulte, *e.g.*, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, A. *et al.*, "Trispecific F(ab)₃ derivatives that use cooperative signaling por meio de the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells". *J. Immunol.* 1991 Jul 1; 147(1):60-9; Patentes U.S. n.ºs 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; e Kostelny, S.A. *et*

al., “Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers”. *J. Immunol.* 1992 Mar 1;148(5):1547-53).

[00138] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente revelação podem ser preparados usando métodos bem estabelecidos conhecidos na técnica para desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais são preparados usando tecnologia de hibridoma (Kohler, G. *et al.*, “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”. *Nature.* 1975 Aug 7; 256(5517):495-7). Para as formações de hibridomas, primeiro, um camundongo, hamster, ou outro animal hospedeiro apropriado, é tipicamente imunizado com um agente imunizante (*e.g.*, um antígeno-alvo da invenção) para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que especificamente se ligam ao agente imunizante. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fusionados com uma linhagem celular imortalizada usando um agente de fusão adequado, como poli(glicol etilênico), para formar uma célula de hibridoma (Goding, J W., “Monoclonal Antibodies: Principles and Practice”. Academic Press. 1986; 59-1031). Linhagens celulares imortalizadas são habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origem de roedor, de coelho, bovina, e humana. Habitualmente, linhagens celulares de mieloma de rato ou de camundongo são utilizadas. As células de hibridoma podem ser cultivadas em um meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células imortalizadas não fusionadas. Por exemplo, se as células parentais são carentes da enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT, *Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase*), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá Hipoxantina, Aminopectina, e Timidina (“meio HAT”), cujas substâncias previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

[00139] As linhagens celulares imortalizadas preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam expressão de alto nível de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo selecionadas, e são sensíveis a um meio como o meio HAT. Linhagens celulares imortalizadas mais preferidas são linhagens de mieloma murino, que podem ser obtidas, por exemplo, junto ao “Salk Institute Cell Distribution Center”, San Diego, Calif., EUA, e junto à “American Type Culture Collection, Manassas, Va., EUA. Linhagens celulares de mieloma humano e de heteromieloma de camundongo-humano também têm sido descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, D. *et al.*, “A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies”. *J. Immunol.* 1984 Dec; 133(6):3001-5; Brodeur, B. *et al.*, “Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications”. Marcel Dekker, Inc., New York. 1987; 33:51-63).

[00140] Em algumas modalidades, células de mieloma podem ser submetidas à manipulação genética. Tal manipulação pode ser realizada usando mutagênese induzida por nuclease dedo-de-zinco (ZFN, *Zinc-Finger Nuclease*) como aqui descrita. Alternativamente, métodos de transfecção conhecidos na técnica podem ser usados. Células de mieloma NS0 ou outras linhagens celulares de mieloma de camundongo podem ser usadas. Por exemplo, Sp2/0-Ag14 pode ser uma linhagem celular alternativa para o desenvolvimento de hibridomas.

[00141] Edição genética induzida por Nucleases Efetoras do Tipo Ativadoras de Transcrição (TALENs, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) provê um método de nocaute de gene alternativo. As TALENs são enzimas de restrição artificiais geradas pela fusão do domínio efetor-TAL (*Transcription Activator-Like*) de ligação ao DNA a um domínio de clivagem de DNA. Similar às ZFNs, as TALENs induzem quebras da fita dupla em *loci* desejados que podem ser reparadas por NHEJ com propensão a erros (*error-prone NHEJ*, *Non-Homologous End Joining*, Junção de Extremidades Não

Homólogas - Reparo de DNA com propensão a erros) para produzir inserções/deleções nos sítios de quebra (Wood, A.J. *et al.*, “Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs”. *Science*. 2011 Jul 15; 333(6040):307). Collectis BioResearch (Cambridge, MA, EUA) provê o serviço de desenho de TALENs e construção de plasmídeos. O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas pode ser, então, ensaiado para a presença de anticorpos monoclonais. Preferivelmente, a especificidade de ligação (*i.e.*, a imunorreatividade específica) de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, como radioimunoensaio (RIA, *RadioImmunoAssay*) ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Tais técnicas e ensaios são conhecidos(as) por aquelas pessoas versadas na técnica. A especificidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser determinada, por exemplo, pela análise de Scatchard (Munson, P.J. *et al.*, “Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems”. *Anal. Biochem.* 1980 Sep 1; 107(1):220-39). Em alguns casos, a especificidade do anticorpo para regiões de um dado antígeno pode ser caracterizada por modificação química dos antígenos antes do ensaio para a ligação do anticorpo. Em um exemplo, tratamento com periodato pode ser usado para destruir a cadeia C6 de ácidos siálicos. Os ensaios podem ser conduzidos com ou sem o tratamento com periodato para revelar se ou não a ligação em amostras não tratadas é específica para ácidos siálicos. Em alguns casos, antígenos tendo ácido siálico 9-O-acetilado podem ser submetidos ao tratamento suave com base (*e.g.* com NaOH 0,1 M) para destruir os grupos 9-O-acetila. Os ensaios podem ser conduzidos com e sem tratamento suave com base para revelar se ou não a ligação nas amostras não tratadas depende da 9-O-acetilação de ácido siálico.

[00142] Após a identificação das células de hibridoma desejadas, os

clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitadora e crescidos por métodos padrão. Meios de cultura adequados para este propósito incluem, por exemplo, Meio de Eagle modificado por Dulbecco ou meio RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vivo* como ascite em um mamífero.

[00143] Métodos alternativos para clonar hibridomas podem incluir aqueles providos pelos kits da STEMCELL Technologies (Vancouver, BC, Canadá), *e.g.* ClonaCell™-HY kit, contendo meio semissólido à base de metilcelulose e outros meios e reagentes, para favorecer a seleção e o crescimento de clones de hibridoma. Entretanto, os meios neste kit contêm FCS (*Fetal Calf Serum*), que provê uma fonte exógena para a incorporação de Neu5Gc. Embora o maquinário para a síntese de Neu5Gc endógeno seja destruído em hibridoma *Cmah^{-/-}*, Neu5Gc incorporado a partir do meio de cultura pode também ocasionar um problema em alguns casos (Bardor, M. *et al.*, “Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells”. *J. Biol. Chem.* 2005. 280: 4228-4237). Em tais casos, o meio de cultura pode ser suplementado com Neu5Ac para eliminar a incorporação de Neu5Gc por competição metabólica (Ghaderi, D. *et al.*, “Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins”. *Nat. Biotechnol.* 2010, 28: 863-867).

[00144] Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones podem ser isolados ou purificados do meio de cultura ou do fluido de ascite por procedimentos de purificação de imunoglobulinas convencionais como, por exemplo, cromatografia com Proteína A-Sepharose®, cromatografia em hidroxiapatita, eletroforese em gel, diálise, ou cromatografia de afinidade.

[00145] Em outra modalidade, os anticorpos monoclonais da presente invenção podem também ser preparados por métodos de DNA recombinante, como aqueles descritos em Patente U.S. nº 4.816.567, que é por meio deste aqui incorporada em sua totalidade como referência. DNA codificante dos

anticorpos monoclonais da invenção pode ser facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (*e.g.*, pelo uso de sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligarem especificamente aos genes codificantes das cadeias pesadas e leves de anticorpos murinos). As células de hibridoma da invenção servem como uma fonte preferida de DNA. Quando isolado, o DNA pode ser inserido em vetores de expressão, que são, então, transferidos para dentro de células hospedeiras. As células hospedeiras podem incluir, mas não são limitadas a, células HEK293, células simianas COS, células de ovário de hamster chinesa (CHO, *Chinese Hamster Ovary*), e células de mieloma que, de outro modo, não produzem proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O DNA pode também ser modificado, por exemplo, pela substituição da sequência codificante dos domínios constantes das cadeias pesadas e leves humanas no lugar das sequências murinas homólogas (Patente U.S. nº 4.816.567) ou por ligação covalente da sequência total ou parcial codificante de um polipeptídeo de não imunoglobulina à sequência codificante de imunoglobulina. Um tal polipeptídeo de não imunoglobulina pode substituir os domínios constantes de um anticorpo da invenção, ou pode substituir os domínios variáveis de um sítio de combinação com o antígeno de um anticorpo da invenção para criar um anticorpo bivalente quimérico.

[00146] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) podem ser produzidos por vários procedimentos conhecidos por aquelas pessoas versadas na técnica. Para a produção de anticorpos policlonais *in vivo*, animais hospedeiros, como coelhos, ratos, camundongos, vacas, asnos, frangos, macacos, ovelhas ou cabras, são imunizados com antígenos acoplados a carreador ou livres, por exemplo, por injeção intraperitoneal e/ou intradérmica. Em algumas modalidades, o material de injeção pode ser uma emulsão contendo cerca de

100 µg de antígeno ou proteína carreadora. Em algumas modalidades, os materiais de injeção podem incluir uma composição rica em glicanas como uma mucina submaxilar de mamífero não humano em solução. Vários adjuvantes podem também ser usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie hospedeira. Adjuvantes incluem, mas não são limitados a, meio de Freund (completo e incompleto), géis minerais como hidróxido de alumínio, substâncias ativas de superfície como lisolecitina, polióis Pluronic®, poliânions, peptídeos, emulsões em óleo, TITERMAX® (CytRx Corp, Los Angeles, CA, EUA), hemocianinas de lapa “buraco-de-fechadura”, dinitrofenol, e adjuvantes humanos potencialmente úteis como BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) e *Corynebacterium parvum*. Tais adjuvantes são também bem conhecidos na técnica. Várias injeções de reforço podem ser necessárias, por exemplo, em intervalos de cerca de duas semanas, para prover um título útil de anticorpos que podem ser detectados, por exemplo, por ensaio ELISA usando glicanas e/ou peptídeo livre adsorvido sobre uma superfície sólida. O título de anticorpos no soro de um animal imunizado pode ser aumentado por seleção de anticorpos, *e.g.*, por adsorção de antígenos sobre um suporte sólido e por eluição dos anticorpos selecionados de acordo com métodos bem conhecidos na técnica.

[00147] Os anticorpos interagentes com glicanas, variantes e fragmentos dos mesmos podem ser selecionados e produzidos usando métodos de descoberta de alto desempenho. Em uma modalidade, os anticorpos interagentes com glicanas que incluem anticorpos sintéticos, variantes e fragmentos dos mesmos são produzidos mediante o uso de bibliotecas de apresentação. O termo “apresentação” como aqui usado, refere-se à expressão ou “apresentação” de proteínas ou peptídeos sobre a superfície de um dado hospedeiro. O termo “biblioteca” como aqui usado, refere-se a uma coleção de sequências de cDNA singulares e/ou das proteínas que são codificadas pelas ditas sequências. Uma biblioteca pode conter tão pouco

quanto dois cDNAs singulares a centenas de bilhões de cDNAs singulares. Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas que são anticorpos sintéticos são produzidos usando bibliotecas de apresentação de anticorpos ou bibliotecas de apresentação de fragmentos de anticorpo. O termo “biblioteca de apresentação de fragmentos de anticorpo” como aqui usado, refere-se a um biblioteca de apresentação em que cada membro codifica um fragmento de anticorpo contendo pelo menos uma região variável de um anticorpo. Tais fragmentos de anticorpo são preferivelmente fragmentos Fab, mas outros fragmentos de anticorpo como fragmentos variáveis de cadeia única (scFvs) são também considerados. Em uma biblioteca de fragmentos Fab de anticorpo, cada Fab codificado pode ser idêntico exceto a sequência de aminoácidos contida dentro das alças variáveis das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do fragmento Fab. Em uma modalidade alternativa ou adicional, as sequências de aminoácidos dentro das regiões VH e/ou VL individuais podem também diferir.

[00148] As bibliotecas de apresentação podem ser expressadas em numerosos hospedeiros possíveis, incluindo, mas não limitados a, levedura, bacteriófago, bactérias e retrovírus. Tecnologias de apresentação adicionais que podem ser usadas incluem técnicas de apresentação em ribossomo, de apresentação em microesfera e de ligação de proteína-DNA. Em uma modalidade preferida, a bibliotecas de apresentação de Fab são expressadas em levedura ou em bacteriófagos (também referidos aqui como “fagos” ou “partículas de fago”). Quando expressados, os Fabs decoram a superfície do fago ou da levedura onde podem interagir com um dado antígeno. Um antígeno que inclui uma glicana ou outro antígeno de um alvo desejado pode ser usado para selecionar partículas de fago ou células de levedura expressoras de fragmentos de anticorpos com a afinidade mais alta por aquele antígeno. A sequência de DNA codificante da CDR do fragmento de ligado pode ser, então, determinada mediante sequenciamento usando a partícula ou

célula ligada. Em uma modalidade, seleção positiva é usada no desenvolvimento de anticorpos. Em algumas modalidades, seleção negativa é usada no desenvolvimento de anticorpos. Em algumas modalidades, ambos os métodos de seleção positiva e de seleção negativa são utilizados durante múltiplas rodadas de seleção no desenvolvimento de anticorpos usando bibliotecas de apresentação.

[00149] Em apresentação em levedura, cDNAs codificantes de diferentes fragmentos de anticorpo são introduzidos em células de levedura onde são expressados e os fragmentos de anticorpo são “apresentados” sobre a superfície celular como descrito por Chao *et al.* (Chao, G. *et al.*, “Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display”. *Nat. Protoc.* 2006; 1(2):755-68). Em apresentação em superfície de levedura, os fragmentos de anticorpo expressados podem conter um domínio adicional que inclui a proteína aglutinina de levedura, Aga2p. Este domínio permite que a proteína de fusão de fragmento de anticorpo se ligue à superfície externa da célula de levedura mediante a formação de ligações dissulfeto com Aga1p expressada na superfície. O resultado é uma célula de levedura, revestida com um fragmento de anticorpo específico. As bibliotecas de apresentação de cDNA codificante destes fragmentos de anticorpo são usadas inicialmente nas quais cada um dos fragmentos de anticorpo tem uma sequência singular. Estas proteínas de fusão são expressadas sobre a superfície celular de milhões de células de levedura onde elas podem interagir com um antígeno-alvo antigênico desejado, incubado com as células. Os antígenos-alvo podem ser covalente ou diferentemente modificados com um grupo químico ou magnético para permitir a separação eficaz de células após a ocorrência da ligação bem sucedida com um fragmento de anticorpo adequado. A recuperação pode ser por meio de separação de células magneticamente ativadas (MACS, *Magnetic-Activated Cell Sorting*), separação de células ativadas por fluorescência (FACS, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) ou

outros métodos de separação de células conhecidos na técnica. Quando uma subpopulação de células de levedura é selecionada, os plasmídeos correspondentes podem ser analisados para determinar a sequência de CDR.

[00150] A tecnologia de apresentação em bacteriófago tipicamente utiliza fago filamentoso incluindo, mas não limitado a, vírions fd, F1 e M13. Tais cepas são não líticas, permitindo a propagação continuada do hospedeiro e títulos virais aumentados. Exemplos de métodos de apresentação em fago que podem ser usados para preparar os anticorpos da presente invenção incluem aqueles descritos em Miersch *et al.* (Miersch, S. *et al.*, “Synthetic antibodies: concepts, potential and practical considerations”. *Methods*. 2012 Aug; 57(4):486-98), Bradbury *et al.* (Bradbury, A.R. *et al.*, “Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies”. *Nat. Biotechnol.* 2011 Mar; 29(3):245-54), Brinkman *et al.* (Brinkmann, U. *et al.*, “Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments”. *J. Immunol. Methods*. 1995 May 11; 182(1):41-50); Ames *et al.* (Ames, R.S. *et al.*, “Conversion of murine Fabs isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins”. *J. Immunol. Methods*. 1995 Aug 18; 184(2):177-86); Kettleborough *et al.* (Kettleborough, C.A. *et al.*, “Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments”. *Eur. J. Immunol.* 1994 Apr; 24(4): 952-8); Persic *et al.* (Persic, L. *et al.*, “An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies ou their fragments after selection from phage display libraries”. *Gene*. 1997 Mar 10; 187(1):9- 18); Pedido PCT n° PCT/GB91/01134; Publicações PCT n°s WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; e Patentes U.S. n°s 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 e 5. 969.108, cada um dos quais é aqui incorporado em sua totalidade como referência. A expressão

de fragmento de anticorpo em bacteriófagos pode ser realizada pela inserção do cDNA codificante do fragmento dentro do gene expressor de uma proteína capsidial viral. O capsídeo viral de bacteriófagos filamentosos é composto de cinco proteínas capsidiais, codificadas por um genoma de fita simples. A proteína capsidial pIII é a proteína preferida para a expressão de fragmento de anticorpo, tipicamente na terminação-N. Se a expressão de fragmento de anticorpo compromete a função de pIII, a função viral pode ser restaurada mediante a coexpressão de uma pIII de tipo selvagem, embora tal expressão reduzirá o número de fragmentos de anticorpo expressados sobre o capsídeo viral, mas pode intensificar o acesso ao fragmento de anticorpo pelo antígeno-alvo. A expressão de proteínas virais e também de proteínas de fragmento de anticorpo pode ser alternativamente codificada em múltiplos plasmídeos. Este método pode ser usado para reduzir o tamanho total de plasmídeos infecciosos e para intensificar a eficiência de transformação.

[00151] Como descrito acima, após a seleção de um hospedeiro expressor de um anticorpo ou fragmento de anticorpo de alta afinidade, (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) as regiões codificantes do anticorpo ou do fragmento de anticorpo podem ser isoladas e usadas para gerar anticorpos inteiros, incluindo anticorpos humanos, ou qualquer outro fragmento de ligação ao antígeno desejado, e expressadas em qualquer hospedeiro desejado, incluindo células de mamíferos, células de insetos, células de plantas, leveduras, e bactérias, *e.g.*, como descrito abaixo em detalhes.

[00152] A sequência de DNA codificante de um anticorpo de afinidade alta pode ser mutada durante rodadas adicionais de seleção em um processo conhecido como maturação de afinidade. O termo “maturação de afinidade”, como aqui usado, refere-se a um método pelo qual os anticorpos são produzidos com afinidade aumentada para um dado antígeno mediante rodadas sucessivas de mutação e seleção de sequências de cDNA codificantes de anticorpo ou de fragmento de anticorpo. Em alguns casos, este processo é

realizado *in vitro*. Para realizar isto, amplificação de sequências codificantes de CDR pode ser realizada usando PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase) para introdução de mutações randômicas em DNA-alvo (“*error-prone PCR*”) para produzir milhões de cópias contendo mutações incluindo, mas não limitadas a, mutações pontuais, mutações regionais, mutações de inserção e mutações de deleção. Como aqui usado, o termo “mutação pontual” refere-se a uma mutação em ácido nucleico na qual um nucleotídeo dentro de uma sequência de nucleotídeos é alterado para um nucleotídeo diferente. Como aqui usado, o termo “mutação regional” refere-se a uma mutação em ácido nucleico na qual dois ou mais nucleotídeos consecutivos são alterados para nucleotídeos diferentes. Como aqui usado, o termo “mutação de inserção” refere-se a uma mutação em ácido nucleico na qual um ou mais nucleotídeos são inseridos em uma sequência de nucleotídeos. Como aqui usado, o termo “mutação de deleção” refere-se a uma mutação em ácido nucleico na qual um ou mais nucleotídeos são removidos da sequência de nucleotídeos. As mutações de inserção ou de deleção podem incluir a substituição completa de um códon inteiro ou a troca de um códon por outro códon pela alteração de um ou dois nucleotídeos do códon de iniciação.

[00153] Mutagênese pode ser realizada em sequências de cDNA codificantes de CDRs para criar milhões de mutantes com mutações singulares em regiões CDR de cadeias pesadas e leves. Em outra abordagem, mutações randômicas são introduzidas apenas em resíduos de CDR mais provavelmente para melhorar a afinidade. Estas bibliotecas mutagênicas recém-geradas podem ser usadas para repetir o processo para selecionar clones que codificam fragmentos de anticorpo com afinidade ainda maior para o antígeno-alvo. Rodadas continuadas de mutação e seleção promovem a síntese de clones com afinidade maior e maior (Chao, G. *et al.*, “Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display”. *Nat. Protoc.*

2006; 1(2):755-68).

[00154] Exemplos de técnicas que podem ser usadas para produzir anticorpos e fragmentos de anticorpo, como Fabs e scFvs, incluem aquelas descritas em Patentes U.S. nºs 4.946.778 e 5.258.498; Miersch *et al.* (Miersch, S. *et al.*, “Synthetic antibodies: concepts, potential and practical considerations”. *Methods*. 2012 Aug; 57(4):486-98), Chao *et al.* (Chao, G. *et al.*, “Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display”. *Nat. Protoc.* 2006; 1(2):755-68), Huston *et al.* (Huston, J.S. *et al.*, “Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins”. *Methods Enzymol.* 1991; 203:46-88); Shu *et al.* (Shu, L. *et al.*, “Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993 Sep 1; 90(17):7995-9); e Skerra *et al.* (Skerra, A. *et al.*, “Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*”. *Science.* 1988 May 20; 240(4855): 1038-41), cada um dos quais é aqui incorporado em sua totalidade como referência.

[00155] Para alguns usos, incluindo o uso *in vivo* de anticorpos (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) em humanos e ensaios de detecção *in vitro*, pode ser preferível usar anticorpos quiméricos, humanizados, ou humanos. Um anticorpo quimérico é uma molécula na qual porções diferentes do anticorpo são derivadas de espécies animais diferentes, como anticorpos tendo uma região variável derivada de uma imunoglobulina monoclonal murina e uma região constante de imunoglobulina humana. Métodos para produção de anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. (Morrison, S.L., “Transfectomas provide novel chimeric antibodies”. *Science.* 1985 Sep 20; 229(4719):1202-7; Gillies, S.D. *et al.*, “High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes”. *J. Immunol. Methods.* 1989 Dec 20; 125(1-2):191- 202.; e Patentes U.S. nºs 5.807.715; 4.816.567; e 4.816.397, que são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00156] Os anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo de espécie não humana que se ligam ao antígeno desejado e têm uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da espécie não humana e regiões *framework* de uma molécula de imunoglobulina humana. Com frequência, os resíduos de *framework* nas regiões *framework* humanas são substituídos por resíduos correspondentes das regiões CDR e *framework* do anticorpo doador para alterar, preferivelmente melhorar, a ligação ao antígeno. Estas substituições em região *framework* são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, *e.g.*, por modelagem das interações de CDR e resíduos de região *framework* para identificar os resíduos de região *framework* importantes para a ligação ao antígeno, e por comparação de sequências para identificar os resíduos incomuns de região *framework* em posições específicas. (Patentes U.S. n°s 5.693.762 e 5.585.089; Riechmann, L. *et al.*, “Reshaping human antibodies for therapy”. *Nature*. 1988 Mar 24; 332(6162):323-7, que são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Os anticorpos podem ser humanizados usando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo, por exemplo, transplante de CDR (*CDR-grafting*) (EP n° 239.400; Publicação PCT n° WO 91/09967; Patentes U.S. n°s 5.225.539; 5.530.101; e 5.585.089); *veneering* ou *resurfacing* (troca de resíduos superficiais das regiões *framework*) (EP n° 592.106; EP n° 519.596; Padlan, E.A., “A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties”. *Mol. Immunol.* 1991 Apr-May; 28(4-5):489-98; Studnicka, G.M. *et al.*, “Human-engineered antibodies monoclonais retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues”. *Protein Eng.* 1994 Jun; 7(6): 805-14; Roguska, M.A. *et al.*, “Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994 Feb 1; 91(3):969-73); e embaralhamento de cadeia (*chain shuffling*) (Patente U.S. n° 5.565.332); cada

um dos quais é aqui incorporado em sua totalidade como referência. Os anticorpos humanizados da presente invenção podem ser desenvolvidos para as desejadas especificidade de ligação, citotoxicidade dependente de complemento, e citotoxicidade mediada por célula dependente de complemento, etc.

[00157] Em alguns casos, as regiões *framework* humanas são selecionadas pelo alinhamento de sequências de anticorpo doador com as sequências de regiões *framework* humanas para encontrar as sequências de regiões *framework* humanas candidatas com o mais alto nível de homologia. Em alguns casos, as regiões *framework* podem ser selecionadas de mais do que uma região *framework* humana candidata (*e.g.*, as regiões *framework* 1 a 3 podem ser selecionadas de uma região *framework* candidata e a região *framework* 4 pode ser selecionada de uma região *framework* candidata alternativa). Em alguns casos, as regiões *framework* podem ser selecionadas de sequências consenso humanas para evitar o risco de inclusão de epítomos imunogênicos criados por mutações somáticas. Sequências consenso são sequências formadas pela comparação de muitas sequências e adoção dos resíduos mais comumente ocorrentes em cada posição. Em alguns casos, as regiões *framework* humanas podem ser selecionadas de sequências de linhagem germinativa humanas. Estas podem ser identificadas mediante a pesquisa em bases de dados (*e.g.*, usando a base de dados de proteínas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) ou outras bases de dados).

[00158] As regiões *framework* humanas das cadeias leves e pesadas podem ser selecionadas do mesmo clone ou de clones diferentes. As cadeias leves e pesadas derivadas do mesmo clone têm uma maior possibilidade de associação para formar sítios de ligação que são funcionais; entretanto, a natureza conservada da interface entre as cadeias pesadas e leves tipicamente permite que as cadeias leves e pesadas de clones diferentes se associem e

sejam funcionais. A frequência de pareamento entre as regiões *framework* das cadeias leves e pesadas pode ser revista, por exemplo, em Tiller *et al.*, 2013. *MAbs*. 5(3): 445-70, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00159] Os resíduos em sequências de anticorpos humanizados podem ser considerados para “retromutação” para melhorar ou restaurar a afinidade do anticorpo perdida durante a humanização. A retromutação envolve a troca de resíduos, alterados durante a humanização, de volta para aqueles presentes na sequência de anticorpo não humana original. Os resíduos que são candidatos para retromutação podem ser identificados, por exemplo, pela comparação com conformações padrão encontradas em estruturas canônicas de anticorpos (consulte Al-Lazikani, *et al.*, 1997. *J. Mol. Biol.* 273: 927-48, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Resíduos canônicos incomuns podem ser identificados e selecionados para retromutação. Em alguns casos, os resíduos que são candidatos para retromutação podem ser “resíduos Vernier”, um termo usado para se referir aos resíduos em contato com as CDRs. Estes resíduos têm uma possibilidade maior de influenciar o posicionamento e a conformação das CDRs, e por conseguinte, a afinidade e/ou especificidade do anticorpo (Strohl, W.R. “Therapeutic Antibody Engineering”, Woodhead Publishing, Philadelphia PA., EUA, 2012, Ch. 6, p117). Em alguns casos, as regiões *framework* humanas não mantidas constantes e as CDRs de anticorpos doadores são retromutadas para ajustar as regiões CDR humanas mantendo, simultaneamente, a ligação mediante métodos empíricos.

[00160] Anticorpos completamente humanos (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) são particularmente desejáveis para tratamento terapêutico de pacientes humanos, de modo a evitar ou minorar reação imune à proteína estranha. Os anticorpos humanos podem ser preparados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo os métodos de

apresentação de anticorpo descritos acima, usando bibliotecas de anticorpos derivadas de sequências de imunoglobulinas humanas. Consulte também, Patentes U.S. n°s 4.444.887 e 4.716.111; e Publicações PCT n°s WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, e WO 91/10741; cada uma das quais é aqui incorporada em sua totalidade como referência.

[00161] Os anticorpos humanos (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) podem também ser produzidos usando camundongos transgênicos que são incapazes de expressar imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que podem expressar polinucleotídeos de imunoglobulinas humanas. Por exemplo, os complexos de polinucleotídeos de imunoglobulinas de cadeias pesadas e leves podem ser introduzidos randomicamente, ou por recombinação homóloga, em células-tronco embrionárias de camundongo. Alternativamente, a região variável humana, a região constante humana, e a região de diversidade humana podem ser introduzidas em células-tronco embrionárias de camundongo, adicionalmente aos polinucleotídeos de cadeias pesadas e leves humanas. Os polinucleotídeos de imunoglobulinas de cadeias pesadas e leves de camundongo podem ser tornados não funcionais separada ou simultaneamente com a introdução de *loci* de imunoglobulina humana por recombinação homóloga. Em particular, deleção homozigótica da região JH previne a produção de anticorpos endógenos. As células-tronco embrionárias modificadas são expandidas e microinjetadas em blastocistos para produzir camundongos quiméricos. Os camundongos quiméricos são, então, procriados para produzir filhotes homozigóticos que expressam anticorpos humanos. Os camundongos transgênicos são imunizados na maneira normal com um antígeno selecionado, *e.g.*, a totalidade ou uma porção de uma glicana, de um glicoconjugado e/ou de um polipeptídeo da invenção.

[00162] Portanto, com o uso de uma tal técnica, é possível produzir anticorpos humanos IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Para uma visão geral da

tecnologia para produção de anticorpos humanos, consultar Lonberg e Huszar (Lonberg, N. *et al.*, “Human antibodies from transgenic mice”. *Int. Ver. Immunol.* 1995; 13(1): 65-93). Para uma discussão detalhada da tecnologia para produção de anticorpos humanos e de anticorpos monoclonais humanos e de protocolos para produção de tais anticorpos, consultar, *e.g.*, Publicações PCT n°s WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patentes U.S. n° 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; 5.939.598; 6.075.181; e 6.114.598, cada uma das quais é aqui incorporada em sua totalidade como referência. Além disso, companhias como Abgenix, Inc. (Fremont, Calif., EUA), Protein Design Labs, Inc. (Mountain View, Calif., EUA) e Genpharm (San Jose, Calif., EUA) podem estar empenhadas para prover anticorpos humanos direcionados contra um antígeno selecionado usando tecnologia similar às tecnologias descritas acima.

[00163] Quando uma molécula de anticorpo da presente invenção tem sido produzida por um animal, uma linhagem celular, quimicamente sintetizada, ou recombinantemente expressada, ela pode ser purificada (*i.e.*, isolada) por qualquer método conhecido na técnica para a purificação de uma molécula de imunoglobulina ou de polipeptídeo, por exemplo, por cromatografia (*e.g.*, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, particularmente cromatografia de afinidade para o antígeno específico, cromatografia com Proteína-A, e cromatografia em coluna de separação por tamanho (*sizing column chromatography*)), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Além disso, os anticorpos da presente invenção ou fragmentos dos mesmos podem ser fusionados em sequências de polipeptídeos homólogos aqui descritas ou de outro modo conhecido na técnica, para facilitar a purificação.

[00164] A afinidade entre um anticorpo e um alvo ou ligante (como um

antígeno usado para gerar um dado anticorpo) pode ser medida em termos de K_D usando um ou mais ensaios de ligação como aqui descritos. Dependendo da aplicação desejada para um dado anticorpo, valores de K_D variados podem ser desejáveis. Anticorpos de afinidade alta tipicamente formam ligações ao ligante com uma K_D de cerca de 10^{-5} M ou menos, e.g. cerca de 10^{-6} M ou menos, cerca de 10^{-7} M ou menos, cerca de 10^{-8} M ou menos, cerca de 10^{-9} M ou menos, cerca de 10^{-10} M ou menos, cerca de 10^{-11} M ou menos ou cerca de 10^{-12} M ou menos.

[00165] Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser caracterizados de acordo com a concentração eficaz ou inibitória semimáxima deles (CE_{50} ou CI_{50} , respectivamente). Em alguns casos, este valor pode representar a concentração de anticorpo necessária para inibir células expressoras de STn (e.g. matar, reduzir a proliferação e/ou reduzir uma ou mais funções celulares) em um nível igual à metade da inibição máxima observada com as concentrações mais altas de anticorpo. Tais valores de CI_{50} podem ser de cerca de 0,001 nM a cerca de 0,01 nM, de cerca de 0,005 nM a cerca de 0,05 nM, de cerca de 0,01 nM a cerca de 1 nM, de cerca de 0,05 nM a cerca de 5 nM, de cerca de 0,1 nM a cerca de 10 nM, de cerca de 0,5 nM a cerca de 25 nM, de cerca de 1 nM a cerca de 50 nM, de cerca de 5 nM a cerca de 75 nM, de cerca de 10 nM a cerca de 100 nM, de cerca de 25 nM a cerca de 250 nM, de cerca de 200 nM a cerca de 1.000 nM ou maiores que 1.000 nM.

[00166] Em algumas modalidades, os anticorpos ensinados na presente revelação podem ser testados para a capacidade deles para reconhecer células células-tronco cancerosas (CSCs, *Cancer Stem Cells*) alvo e células cancerosas-alvo derivadas de paciente. De acordo com tais modalidades, as células cancerosas derivadas de paciente podem ser cultivadas *in vitro* e os anticorpos da presente revelação podem ser usados para reconhecer tais células.

[00167] Em outras modalidades, fragmentos de tumor ou células de tumor derivados(as) de paciente podem ser usados(as) para produzir tumores de xenoenxerto derivado de paciente (PDX, *Patient-Derived Xenograft*). Em alguns casos, pedaços de tumores sólidos primários ou metastáticos mantidos como estruturas teciduais podem ser coletados por procedimentos de cirurgia ou de biopsia. Em alguns casos, pode ser usado o fluido drenado de ascite maligna ou de efusões pleurais. Os tumores podem ser implantados como pedaços ou suspensões de células individuais, quer sozinhos ou em alguns estudos revestidos com MATRIGEL® (Corning Life Sciences, Corning, NY, EUA) quer misturados com fibroblastos humanos ou células-tronco mesenquimais humanas. Os sítios de implantação podem incluir a região dorsal de camundongos (implantação subcutânea), embora implantação no mesmo órgão que o do tumor original possa ser uma opção (implantação ortotópica, *i.e.* no pâncreas, na cavidade oral, no ovário, na camada adiposa mamária, no cérebro, etc.). Além disso, independentemente da origem do tumor, algumas abordagens podem incluir implantação de tumores primários na cápsula renal em um esforço para aumentar as taxas de sucesso de transplantação. Uma variedade de cepas de camundongo tendo diferentes graus de imunossupressão pode ser usada em tais estudos. Para os tumores sensíveis a hormônios, alguns estudos podem usar suplementação hormonal com a intenção de aumentar as taxas de transplantação. Em algumas modalidades, tumores de PDX podem ser gerados em camundongos diabéticos não obesos/com imunodeficiência combinada severa (NOD/SCID, *Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*). Os anticorpos podem ser administrados aos camundongos com tumores de PDX e pode ser analisado o efeito sobre o volume de tumor. Em alguns casos, os tumores de PDX podem ser dissecados, submetidos à dissociação celular, e as células resultantes crescidas em cultura. A capacidade dos anticorpos da presente revelação para reconhecer estas células pode ser avaliada *in vitro*.

[00168] A preparação de anticorpos, quer monoclonais quer policlonais, é conhecida na técnica. Técnicas para a produção de anticorpos são bem conhecidas na técnica e descritas, *e.g.* em Harlow e Lane “Antibodies, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 e Harlow e Lane “Using Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Alvos

[00169] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem exercer os efeitos deles por meio de ligação (reversível ou irreversível) a uma ou mais glicanas ou a um ou mais alvos relacionados com glicanas ou associados com glicanas. Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas podem ser preparados a partir de qualquer região dos alvos aqui ensinados. Em algumas modalidades, os alvos da presente invenção incluem glicanas. As glicanas usadas para geração de anticorpos podem incluir uma cadeia de açúcares tendo pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19 ou pelo menos 20 resíduos. Algumas glicanas usadas para geração de anticorpos podem incluir de cerca de 2 resíduos a cerca de 5 resíduos.

[00170] Em algumas modalidades, os antígenos-alvo de anticorpos interagentes com glicanas incluem ácidos siálicos. Ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) e ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) são os principais ácidos siálicos sobre as superfícies de células de mamíferos. Destes, Neu5Ac é naturalmente produzido em humanos. Neu5Gc é naturalmente produzido na maioria dos mamíferos com a exceção de humanos devido a uma mutação no gene citidina-monofosfato-(CMP, *Cytidine MonoPhosphate*)-ácido-*N*-acetilneuramínico-hidroxilase (CMAH, *Cytidine Monophosphate (CMP)-N*-

Acetylneuraminic acid Hydroxylase) responsável pela produção de CMP-Neu5Gc a partir de CMP-Neu5Ac. Neu5Gc em humanos é de fato imunogênico com quase todos os humanos expressores de anticorpos anti-Neu5Gc. Não obstante uma carência de produção, os sistemas humanos incluem, em sua maioria, algum nível de Neu5Gc devido à ingestão dietária. Os produtos estranhos são subsequentemente incorporados em glicoproteínas humanas. Tais glicoproteínas são consideradas como alvos da invenção.

[00171] Os antígenos glicânicos-alvo da presente invenção podem incluir, mas não são limitados àqueles listados na Tabela 1. As abreviações usadas incluem: Glc – glicose, Gal – galactose, GlcNAc – *N*-acetilglicosamina, GalNAc – *N*-acetilgalactosamina, GlcNAc6S – 6-Sulfo-*N*-acetilglicosamina, KDN – ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galactononônico, Neu5,9Ac2 – ácido *N*-acetil-9-O-acetilneuramínico, Fuc – fucose e Neu5GcOMe – ácido 2-O-metil-*N*-glicolilneuramínico. Ligações O-glicosídicas são apresentadas entre cada resíduo nas glicanas listadas com α e β indicando a estereoquímica relativa entre os dois resíduos unidos pela ligação, em que α indica uma orientação axial e β indica uma orientação equatorial. Os números após α e/ou β , no formato x,x , indicam o número do carbono de cada um dos carbonos de cada um dos resíduos unidos que participam na formação da ligação. Embora as glicanas listadas representem antígenos glicânicos-alvo individuais considerados, a presente invenção também inclui modalidades em que as glicanas apresentadas acima incluem combinações de ligações O-glicosídicas α - e β -orientadas diferentes daquelas apresentadas. “R” representa uma entidade com a qual a glicana pode estar acoplada. Em algumas modalidades, R é uma proteína em que a glicana está tipicamente ligada a um resíduo de serina ou de treonina. Em algumas modalidades, R é uma molécula conectora usada para unir a glicana a um substrato, como em um arranjo de glicanas. Em algumas modalidades, R pode

ser um conector com a fórmula de $-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ou $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$. Em algumas modalidades, R pode ser biotina, albumina, ProNH_2 , $-\text{CH}-$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{H}$, hidrido, hidroxila, alcoxila, oxigênio, carbono, enxofre, nitrogênio, poliacrilamida, fósforo, NH_2 , $\text{ProNH}_2=\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$, os marcadores fluorescentes 2-aminobenzamida (AB) e/ou ácido 2-aminobenzoico (AA), análogo de 2-aminobenzamida que contém uma alquilamina (AEAB), grupos aminooxila, grupos metilaminooxila, grupos hidrazida, aminolípido 1,2-di-hexadecil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DHPE, *1,2-DiHexadecyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamine*), DHPE funcionalizada com aminooxila (AO) glicosilfosfatidilinositol (GPI, *GlycosylPhosphatidylinositol*). Sem a intenção de limitar o a fonte ou a natureza de R, este pode incluir estruturas que afetam o espaçamento físico do resíduo de glicana. Em algumas modalidades, o grupo R pode incluir uma combinação de grupos R aqui apresentados, *e.g.* uma poliacrilamida biotilada. Em algumas modalidades, o grupo R em combinação com os substratos subjacentes podem alterar o espaçamento do resíduo de glicana.

Tabela 1. Antígenos glicânicos-alvo

Glicanas
GalNAc α -R
Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Gal β 1,3GalNAc β -R
Gal β 1,3GlcNAc α -R
Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R
Gal β 1,3GlcNAc β -R
Gal β 1,4GlcNAc6S β -R
Gal β 1,4GlcNAc β -R
Gal β 1,4Glc β -R
KDN α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
KDN α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β -R
Neu5,9Ac2 α 2,6GalNAc α -R
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4Glc β -R

Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β -R
Neu5Ac α 2,6(KDN α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,6(Neu5Ac α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,6(Neu5Gc α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,6GalNAc α -R
Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,6Gal β -R
Neu5Ac α 2,8KDN α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β -R
Neu5Gc9Ac α 2,6GalNAc α -R
Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β -R
Neu5GcOMe α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc α 2,3Gal β -R
Neu5Gc α 2,6GalNAc α -R
Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc α 2,6Gal β -R
Neu5Gc α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R

[00172] Os alvos glicânicos da presente invenção podem incluir uma ou mais regiões de reconhecimento pelo anticorpo. Como aqui usado, o termo “região de reconhecimento pelo anticorpo” refere-se a um segmento

localizado em qualquer parte da molécula, um grupo ligado ou localizado em uma região de interação entre a glicana e outra molécula, incluindo, mas não limitada a, outra glicana, proteína, membrana, estrutura de superfície da célula, ou componente da matriz extracelular. Em algumas modalidades, as regiões de reconhecimento pelo anticorpo estão localizadas em sítios-alvo intercadeias, em que o termo “intercadeia” significa dentro da cadeia polimérica presente. Os sítios-alvo intercadeia podem incluir regiões de reconhecimento pelo anticorpo tendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou pelo menos 10 resíduos, ligações entre resíduos ou combinações de resíduos e ligações. Em algumas modalidades, as regiões de reconhecimento pelo anticorpo estão localizadas em regiões de interação entre uma ou mais cadeias de glicana. Tais regiões podem estar entre 2, 3, 4 ou pelo menos 5 cadeias de glicana.

[00173] Em algumas modalidades, as regiões de reconhecimento pelo anticorpo estão localizadas em regiões de interação entre cadeias de ramificação de glicana conectadas a uma cadeia parental comum. Em algumas modalidades, as regiões de reconhecimento pelo anticorpo estão localizadas em regiões de interação entre uma cadeia de ramificação de glicana e uma cadeia parental. Em algumas modalidades, as regiões de reconhecimento pelo anticorpo estão localizadas em regiões de interação entre glicanas e proteínas. Tais regiões de interação podem incluir ligações químicas entre a glicana e a proteína, incluindo, mas não limitadas a, ligações covalentes, ligações iônicas, ligações hidrostáticas, ligações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Em algumas modalidades, as regiões de reconhecimento pelo anticorpo estão localizadas em regiões de interação entre glicanas e outras biomoléculas incluindo, mas não limitadas a, lipídios e ácidos nucleicos. Tais regiões de interação podem incluir ligações químicas entre a glicana e a biomolécula, incluindo, mas não limitadas a, ligações covalentes, ligações iônicas, ligações hidrostáticas, ligações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.

[00174] Em algumas modalidades, os alvos glicânicos da presente

invenção são componentes de glicoconjugados. Como aqui usado, o termo “glicoconjugado” refere-se a qualquer entidade unida com uma porção glicana. Em algumas modalidades, glicoconjugados são glicolipídios. Como aqui usado, o termo “glicolipídio” refere-se a uma classe de lipídios em que uma porção carboidrato está covalentemente ligada. Em algumas modalidades, porções carboidratos presentes em glicolipídios podem ser glicanas. Em algumas modalidades, componentes lipídios de glicolipídios incluem porções ceramida. Exemplos de glicolipídios considerados como alvos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, gliceroglicolipídios (incluindo, mas não limitados a, galactolipídios e sulfolipídios), glicosfingolipídios (incluindo, mas não limitados a, cerebrosídeos (*e.g.*, galactocerebrosídeos, glicocerebrosídeos e sulfatídeos), gangliosídeos, globosídeos e glicofosfoesfingolipídios) e glicosilfosfatidilinositóis. Quando localizadas dentro de membranas celulares, as porções glicana de glicolipídios estão localizadas sobre o lado extracelular da membrana onde podem interagir com outras células e também com ligantes de sinalização celular (Maccioni, H.J. *et al.*, “Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex”. *FEBS Lett.* 2011 Jun 6; 585(11): 1691-8).

[00175] Em algumas modalidades, os alvos glicoconjugados da presente invenção são glicoproteínas e/ou proteoglicanas. Glicoproteínas referem-se a quaisquer proteínas que são covalentemente ligadas com glicanas. Proteoglicanas são uma classe de proteínas que estão intensamente glicosiladas com glicanas que com frequência contêm carga negativa. Esta propriedade torna-as muito hidrofílicas e componentes importantes de tecido conjuntivo.

Alvos relacionados a câncer

[00176] Em algumas modalidades, os alvos da presente invenção são antígenos ou epítomos relacionados a câncer. Como aqui usado, o termo

“relacionados a câncer” é usado para descrever entidades que podem estar em alguma maneira associadas com câncer, células cancerosas e/ou tecidos cancerosos. Têm sido identificados muitos antígenos ou epítomos relacionados a câncer que são expressados em associação com células tumorais (Heimburg-Molinaro, J. *et al.*, “Cancer vaccines and carbohydrate epitopes”. *Vaccine*. 2011 Nov 8; 29(48): 8802-26). Estes são aqui referidos como “antígenos de carboidrato associados com tumor” ou “TACAs” (*Tumor-Associated Carbohydrate Antigens*). TACAs incluem, mas não são limitados a, antígenos relacionados a mucinas [incluindo, mas não limitados a, Tn, Sialil-Tn (STn) e antígeno de Thomsen-Friedenreich], antígenos relacionados ao grupo sanguíneo de Lewis [incluindo, mas não limitados a, Lewis^Y (Le^Y), Lewis^X (Le^X), Sialil-Lewis^X (SLe^X) e Sialil-Lewis^A (SLe^A)], antígenos relacionados a glicoesfingolipídios [incluindo, mas não limitados a, Globo H, antígeno embrionário estágio-específico 3 (SSEA-3, *Stage-Specific Embryonic Antigen-3*) e glicoesfingolipídios que incluem ácido siálico], antígenos relacionados a gangliosídeos [incluindo, mas não limitados a, gangliosídeos GD2, GD3, GM2, fucosil-GM1 e Neu5GcGM3] e antígenos relacionados a poli(ácido siálico). Muitos de tais antígenos são descritos na Publicação Internacional nº WO2015054600, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00177] Em algumas modalidades, os alvos TACA da presente invenção incluem antígenos de grupo sanguíneo de Lewis. Os antígenos de grupo sanguíneo de Lewis incluem um resíduo de fucose ligado a GlcNAc por uma ligação α 1-3 ou uma ligação α 1-4. Podem ser encontrados tanto em glicolipídios quanto em glicoproteínas. Os antígenos de grupo sanguíneo de Lewis podem ser encontrados no fluido corporal de indivíduos que são secretores destes antígenos. O surgimento deles sobre células vermelhas é devido à absorção de antígenos de Lewis do soro pelas células vermelhas.

[00178] Em algumas modalidades, os alvos TACA da presente

invenção incluem Le^Y . Le^Y (também conhecido como CD174) é composto de $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ tendo resíduos de fucose $\alpha 1,2$ -ligados e também $\alpha 1,3$ -ligados produzindo o epítipo $\text{Fuca}(1,2)\text{Gal}\beta(1,4)\text{Fuca}(1,3)\text{GlcNAc}$. É sintetizado a partir do antígeno H por $\alpha 1,3$ -fucosiltransferases que ligam a $\alpha 1,3$ -fucose ao resíduo GlcNAc da cadeia parental. Le^Y pode ser expressado em uma variedade de cânceres incluindo, mas não limitados a, câncer ovariano, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de pulmão e câncer epitelial. Devido ao seu baixo nível de expressão em tecidos normais e ao seu elevado nível de expressão em muitos cânceres, o antígeno Le^Y é um alvo atrativo para anticorpos terapêuticos.

[00179] Em algumas modalidades, os alvos TACA da presente invenção incluem Le^X . Le^X inclui o epítipo $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuca}1-3)\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$. Ele também é conhecido como CD15 e antígeno embrionário estágio-específico 1 (SSEA-1, *Stage-Specific Embryonic Antigen-1*). Este antígeno foi primeiro reconhecido como sendo imunorreativo com soros coletados de um camundongo submetido à imunização com células de teratocarcinoma F9. Foi também descoberto que Le^X correlaciona-se com o desenvolvimento embrionário em estágios específicos. Ele também é expressado em uma variedade de tecidos tanto na presença quanto na ausência de câncer, mas pode também ser encontrado em câncer de mama e câncer ovariano onde ele é apenas expressado por células cancerosas.

[00180] Em algumas modalidades, os alvos TACA da presente invenção incluem SLe^A e/ou SLe^X . SLe^A e SLe^X são compostos pelas estruturas $\text{Neu5Ac}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuca}1-4)\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ e $\text{Neu5Ac}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuca}1-3)\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$, respectivamente. A expressão deles é suprarregulada em células de câncer. A presença destes antígenos em soro correlaciona-se com malignidade e prognóstico desfavorável. SLe^X é predominantemente encontrado em um epítipo terminal de mucina. Ele é expressado em numerosos cânceres diferentes incluindo câncer de mama, câncer ovariano,

melanoma, câncer de cólon, câncer de fígado, câncer de pulmão e câncer de próstata. Em algumas modalidades da presente invenção, os alvos SLe^A e SLe^X incluem Neu5Gc (aqui referidos como GcSLe^A e GcSLe^X, respectivamente).

[00181] Em alguns casos, os alvos relacionados a câncer da invenção podem incluir mucinas. Ishida *et al.* demonstram que a interação de MUC2 com células dendríticas (com atividade antitumoral) resulta em apoptose de células dendríticas (Ishida, A. *et al.*, 2008. *Proteomics*. 8: 3342-9, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Em alguns aspectos, a presente invenção provê anticorpos antimucina para prevenir a apoptose de células dendríticas e favorecer a atividade antitumoral.

[00182] Em algumas modalidades, os alvos TACA da presente invenção incluem glicolipídios e/ou epítomos presentes em glicolipídios, incluindo, mas não limitados a, glicosfingolipídios. Os glicosfingolipídios incluem uma ceramida lipídica ligada a uma glicana por um grupo hidroxila de ceramida. Sobre a membrana celular os glicosfingolipídios formam agrupamentos (*clusters*) referidos como “balsas lipídicas”.

[00183] Em algumas modalidades, os alvos TACA da presente invenção incluem Globo H. Globo H é um glicosfingolipídio relacionado a câncer primeiro identificado em células de câncer de mama. A porção glicana de Globo H inclui Fuca(1-2)Galβ(1-3)GalNAcβ(1-3)Galα(1-4)Galβ(1-4)Glcβ(1). Embora encontrado em numerosos tecidos epiteliais normais, Globo H tem sido identificado em associação com muitos tecidos tumorais incluindo, mas não limitados a, tumor de pulmão de células pequenas, tumor de mama, tumor de próstata, tumor de pulmão, tumor pancreático, tumor gástrico, tumor ovariano e tumor endometrial.

[00184] Em algumas modalidades, os alvos glicosfingolipídios relacionados a câncer da presente invenção incluem gangliosídeos. Os gangliosídeos são glicosfingolipídios tendo um ou mais ácidos siálicos. De

acordo com a nomenclatura de gangliosídeos, G é usado como uma abreviação para gangliosídeo. Esta abreviação é seguida pelas letras M, D ou T que se referem ao número de resíduos de ácido siálico ligados (1, 2 ou 3 respectivamente). Finalmente os números 1, 2 ou 3 são usados para se referirem à ordem da distância de migração de cada um quando analisados por cromatografia em camada fina (em que 3 percorre a distância mais longa, seguido por 2, e então por 1). Os gangliosídeos são conhecidos por estarem envolvidos em crescimento e metástase relacionados com câncer e podem ser expressados sobre a superfície celular de células tumorais. Os gangliosídeos expressados sobre células tumorais podem incluir, mas não são limitados a, GD2, GD3, GM2 e fucosil-GM1 (também referido aqui como Fuc-GM1). Em algumas modalidades da presente invenção, anticorpos interagentes com glicanas são direcionados para GD3. GD3 é um regulador de crescimento celular. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados para GD3 são usados para modular o crescimento celular e/ou a angiogênese celular. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados para GD3 são usados para modular a fixação celular. GD3 associado com algumas células tumorais pode incluir resíduos de ácido siálico 9-O-acetilado (Mukherjee, K. *et al.*, 2008. *J. Cell Biochem.* 105: 724-34 e Mukherjee, K. *et al.*, 2009. *Biol. Chem.* 390: 325-35, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Em alguns casos, os anticorpos da invenção são seletivos para resíduos de ácido siálico 9-O-acetilado. Alguns anticorpos podem ser específicos para GD3s 9-O-acetilados. Tais anticorpos podem ser usados para reconhecer células tumorais expressoras de GD39-O-acetilado. Em algumas modalidades da presente invenção, os anticorpos interagentes com glicanas são direcionados para GM2. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados para GM2 são usados para modular o contato de célula com célula. Em algumas modalidades, os alvos gangliosídeos da presente invenção incluem Neu5Gc. Em algumas

modalidades, tais alvos podem incluir uma variante de GM3 tendo Neu5Gc (aqui referida como GcGM3). O componente glicânico de GcGM3 é Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glc. GcGM3 é um componente conhecido de células tumorais (Casadesus, A.V. *et al.*, 2013. *Glycoconj. J.* 30(7):687-99, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00185] Em algumas modalidades, TACAs da presente revelação incluem pelo menos um resíduo Neu5Gc.

Anticorpos recombinantes

[00186] Os anticorpos recombinantes (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) da invenção podem ser gerados usando técnicas padrão conhecidas na técnica. Em algumas modalidades, os anticorpos recombinantes podem ser anticorpos antiglicana. Outros anticorpos podem ser anticorpos anti-STn (*e.g.* anticorpos anti-GcSTn ou anti-AcSTn). Os anticorpos recombinantes da invenção podem ser produzidos usando domínios variáveis obtidos de anticorpos derivados de células de hibridoma produzidos de acordo com os métodos aqui descritos. As sequências de cDNA das regiões variáveis das cadeias pesadas e leves de anticorpos podem ser determinadas usando técnicas bioquímicas padrão. RNA total pode ser extraído de células de hibridoma produtoras de anticorpos e convertido em cDNA por reação da transcriptase reversa (RT, *Reverse Transcriptase*) e reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). A amplificação por PCR pode ser realizada resultando em cDNA para amplificar os genes das regiões variáveis. Tal amplificação pode incluir o uso de iniciadores específicos para a amplificação de sequências das cadeias pesadas e leves. Em outras modalidades, os anticorpos recombinantes podem ser produzidos usando domínios variáveis obtidos de outras fontes. Isto inclui o uso de domínios variáveis selecionados dentre uma ou mais bibliotecas de fragmentos de anticorpos, como uma biblioteca de scFv usada em triagem (*panning*) de antígenos. Os produtos de PCR resultantes podem então ser subclonados em

plasmídeos para análise de sequências. Quando sequenciadas, as sequências codificantes de anticorpos podem ser inseridas em vetores de expressão. Para humanização, as sequências codificantes dos domínios constantes das cadeias pesadas e leves podem ser usadas como substitutas das sequências murinas homólogas. Os constructos resultantes podem ser, então, transfectados em células de mamíferos para tradução em grande escala.

Anticorpos anti-Tn

[00187] Em algumas modalidades, os anticorpos recombinantes da invenção (*e.g.*, anticorpos interagentes com glicanas) podem ser anticorpos anti-Tn. Tais anticorpos podem ligar-se aos alvos tendo Tn. Os anticorpos anti-Tn podem ser específicos para Tn ou podem ligar-se a outras formas modificadas de Tn, como Tn ligado a outras porções, incluindo, mas não limitados a, resíduos de carboidrato adicionais. Em alguns casos, anticorpos anti-Tn podem ser anticorpos anti-sialil-Tn. Tais anticorpos podem ligar-se a Tn sialilado que inclui Neu5Ac e/ou Tn sialilado que inclui Neu5Gc. Alguns anticorpos anti-Tn podem ligar-se especificamente a agrupamentos (*clusters*) de antígeno Tn.

Anticorpos anti-STn

[00188] Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção (*e.g.*, os anticorpos interagentes com glicanas) podem ligar-se especificamente ao STn. Os anticorpos anti-STn da invenção podem ser categorizados pela ligação deles às porções específicas de antígenos STn e/ou pela especificidade deles por AcSTn versus GcSTn. Em alguns casos, os anticorpos anti-STn da invenção são anticorpos do Grupo 1. Os anticorpos do “Grupo 1”, de acordo com a invenção, são anticorpos capazes de se ligarem a AcSTn e a GcSTn. Tais anticorpos podem ser também referidos como anticorpos pan-STn devido à capacidade deles de se associarem com uma ampla variedade de estruturas de STn. Em algumas modalidades, os anticorpos do Grupo 1 podem associar-se com a porção de STn indicada pela elipse maior na Figura 1A. Em alguns

casos, os anticorpos anti-STn da invenção são anticorpos do Grupo 2. Os anticorpos do “Grupo 2”, de acordo com a invenção, são anticorpos capazes de se ligarem a STn e também a algumas estruturas relacionadas que incluem uma serina O-ligada ou uma treonina O-ligada. Em algumas modalidades, os anticorpos do Grupo 2 podem associar-se com glicanas que incluem um resíduo de galactose sialilada. Em alguns casos, os anticorpos do Grupo 2 podem associar-se com a porção STn indicada pela elipse maior na Figura 1B. Alguns anticorpos do Grupo 2 ligam-se, preferivelmente, mais às estruturas com AcSTn do que às estruturas com GcSTn. Outros anticorpos anti-STn podem ser anticorpos do Grupo 3. Como aqui referidos, os anticorpos do “Grupo 3” são anticorpos capazes de se ligarem a STn, mas podem também se ligarem a um conjunto mais amplo de estruturas relacionadas. Diferente dos anticorpos do Grupo 2, os anticorpos do Grupo 3 não exigem que tais estruturas tenham uma serina O-ligada ou uma treonina O-ligada. Em algumas modalidades, os anticorpos do Grupo 3 podem associar-se com a porção de STn indicada pela elipse maior na Figura 1C. Finalmente, alguns anticorpos anti-STn da invenção podem ser anticorpos do Grupo 4. Como aqui referidos, os anticorpos do “Grupo 4” são capazes de se ligarem tanto a AcSTn quanto a GcSTn e também ao antígeno Tn não sialilado, e, por conseguinte, têm especificidade mais ampla. Em algumas modalidades, os anticorpos do Grupo 4 podem associar-se com a porção de STn indicada pela elipse maior na Figura 1D.

[00189] Em alguns casos, os anticorpos anti-STn da invenção podem ligar-se especificamente aos agrupamentos (*clusters*) de STn em um antígeno específico ou sobre a superfície de célula. Alguns de tais anticorpos podem reconhecer epítomos formados pela clusterização de STn, incluindo epítomos que incluem áreas de contato entre estruturas de STn vizinhas. Tais epítomos podem ser formados pela clusterização de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais estruturas de STn.

[00190] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-STn da presente revelação podem ser usados para ligar proteínas celulares carreadoras de STn. Tais anticorpos podem ser úteis para reconhecer proteínas celulares associadas com células cancerosas que são distinguíveis de proteínas similares em células não cancerosas pela expressão de STn. Em alguns casos, tais proteínas podem incluir proteínas de superfície de célula. As proteínas de superfície de célula cancerosa carreadoras de STn podem ser reconhecidas pelos anticorpos anti-STn durante o tratamento e/ou diagnóstico de câncer. As proteínas de superfície de célula carreadoras de STn podem ser identificadas usando espectrometria de massas e/ou usando outros métodos imunológicos (*e.g.*, análise por FACS, imunoprecipitação, imunotransferência, ELISA, etc.). Em alguns casos, as proteínas celulares carreadoras de STn podem incluir marcadores para células cancerosas, marcadores para células-tronco cancerosas, e/ou proteínas de sinalização de células-tronco cancerosas. Em algumas modalidades, as proteínas celulares carreadoras de STn podem incluir, mas não são limitadas a, CD44, CD133, CD117, integrinas, Notch, e Hedgehog.

Componentes de anticorpo

[00191] Em alguns casos, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem incluir sequências de aminoácido de domínio variável e/ou de CDR aqui providas. Em alguns casos, os anticorpos podem incluir qualquer uma das sequências de anticorpo ou de fragmento de anticorpo apresentadas na Publicação Internacional nº WO2017083582 (cujo conteúdo inteiro é aqui incorporado como referência), incluindo: qualquer uma das sequências de domínio variável apresentadas na Tabela 2 da mesma; qualquer uma das sequências de CDR apresentadas na Tabela 3 da mesma; qualquer um dos grupos de sequências de VH CDR apresentados na Tabela 4 da mesma; qualquer um dos grupos de sequências de VL CDR apresentados na Tabela 5 da mesma; qualquer uma das sequências de nucleotídeos de

domínio variável apresentadas na Tabela 6 da mesma; ou qualquer uma das sequências de domínio variável humanizado apresentadas na Tabela 11 da mesma. Alguns anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem incluir combinações diferentes de tais sequências ou variantes com pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou pelo menos 99,5% de identidade de sequência. Em alguns casos, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da invenção podem incluir uma ou mais das sequências de domínio variável listadas abaixo na Tabela 2. Os domínios variáveis da cadeia leve apresentados podem ser expressados com ou sem um resíduo de arginina C-terminal. Este resíduo tipicamente liga os domínios variáveis da cadeia leve aos domínios constantes da cadeia leve e pode ser expressado como parte do domínio constante da cadeia leve ao invés do domínio variável de cadeia leve. Em alguns casos, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem incluir uma sequência de aminoácidos com de cerca de 50% a cerca de 99,9% identidade de sequência (*e.g.* de cerca de 50% a cerca de 60%, de cerca de 55% a cerca de 65%, de cerca de 60% a cerca de 70%, de cerca de 65% a cerca de 75%, de cerca de 70% a cerca de 80%, de cerca de 75% a cerca de 85%, de cerca de 80% a cerca de 90%, de cerca de 85% a cerca de 95%, de cerca de 90% a cerca de 99,9%, de cerca de 95% a cerca de 99,9%, cerca de 97%, cerca de 97,5%, cerca de 98%, cerca de 98,5%, cerca de 99%, cerca de 99,5%, cerca de 99,6%, cerca de 99,7% ou cerca de 99,8%) com uma ou mais das sequências de domínio variável listadas na Tabela 2. Em alguns casos, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos da invenção podem incluir uma sequência de aminoácidos tendo um ou mais fragmentos de qualquer uma das sequências listadas.

Tabela 2. Sequências de domínios variáveis

Domínio	Sequência	SEQ ID NO
domínio mSIA101 VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAH WVKQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFRGKATLTA DKSSSTAYMQLNSLSSDDSAVYFCKRSLSTPYWGQG TLVTVSA	1
domínio mSIA101 VL	DIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLNLRGNHK NYLTWYRQKPGLPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSG SGTDFALTISVQAEDLAVYYCQNDYTPYTFGGGT KLEIKR	2
domínio mSIA102 VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAH WVKQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVKATLTA DKSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYFCKRSYYGDWGQG TTLTVSS	3
domínio mSIA102 VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSHLAWYQ QKQKSPQLLVYGATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSL KIHSLSQSEDFGSYYCQHFVGAPFTFGSGTKLEIK	4
domínio mSIA103 VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAH WVKQKPEQGLDWIGYISPGNGDIKYNEKFKDKVTLTA DKSSSTACMHLNSLTSEDSAVYFCKRSLALDYWGQ GTLTVSS	5
domínio mSIA103 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTNIAWY QQKPGRSPKVLIIYASSTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTL TISNVQSEDLTDYFCQYSSPPLTFGVGKLELK	6
domínio hSIA101 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDHAH WVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFRGRVT MTADKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYW GQGLTVTVSS	7
domínio hSIA101 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLRGNHKN YLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGS GTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTPYTFGQGTK VEIK	8
domínio hSIA102 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAH WVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVRATLTA DKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQG TLVTVSS	9
domínio hSIA102 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQ QKPGKAPKLLVYGATNLASGVPSRFSGSGSGTQFTL TISSLQPEDFATYYCQHFVGAPFTFGQGTKVEIK	10
domínio hSIA103 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDHAH WVRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFKDRT MTADKSSSTAYMQLRSLRSDDTAVYFCKRSLALD YWGQGLTVTVSS	11
domínio hSIA103 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWY QQKPGKAPKVLIIYASSTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYFCQYSSPPLTFGQGTKVEIK	12

[00192] Em alguns casos, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da invenção podem incluir qualquer uma das sequências de IgG apresentadas na Tabela 3. Em alguns casos, os anticorpos ou fragmentos dos mesmos podem incluir uma sequência de aminoácidos com de cerca de 50% a cerca de 99,9% de identidade de sequência (e.g. de cerca de 50% a cerca de 60%, de cerca de 55% a cerca de 65%, de cerca de 60% a cerca de 70%, de cerca de 65% a cerca de 75%, de cerca de 70% a cerca de 80%, de cerca de

75% a cerca de 85%, de cerca de 80% a cerca de 90%, de cerca de 85% a cerca de 95%, de cerca de 90% a cerca de 99,9%, de cerca de 95% a cerca de 99,9%, cerca de 97%, cerca de 97,5%, cerca de 98%, cerca de 98,5%, cerca de 99%, cerca de 99,5%, cerca de 99,6%, cerca de 99,7% ou cerca de 99,8%) com uma ou mais das sequências de domínio constante listadas. Em alguns casos, os anticorpos ou fragmentos dos mesmos da invenção podem incluir uma sequência de aminoácidos tendo um ou mais fragmentos de qualquer uma das sequências listadas.

Tabela 3. Sequências de domínios constantes de IgG

Domínio	Sequência	SEQ ID NO
Regiões de domínio constante da cadeia pesada de IgG2a murina	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVF IFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVE VHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCK VNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQV TLTCMVTDMPEDIVVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGDS YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS RTPGK	13
Regiões constantes da cadeia leve <i>kappa</i> de IgG2a murina	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKEDEYER HNSYTCEATHKTTSTSPIVKSFNRNEC	14
Regiões constantes da cadeia pesada de IgG1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	15
Regiões constantes da cadeia leve de IgG1 humana	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16

[00193] Em algumas modalidades, a revelação inclui fragmentos de anticorpo produzidos usando uma ou mais das sequências de anticorpo ou variantes relacionadas descritas acima. Tais fragmentos de anticorpo podem incluir fragmentos scFvs, Fab, ou quaisquer outros fragmentos de anticorpo, incluindo qualquer um daqueles aqui descrito.

Anticorpos humanizados

[00194] As formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (*e.g.*, murinos) são anticorpos quiméricos que contêm sequências mínimas

derivadas de imunoglobulina não humana. Em sua maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nas quais os resíduos da região hipervariável de um anticorpo do recipiente são substituídos por resíduos da região hipervariável de um anticorpo de uma espécie não humana (anticorpo doador) como camundongo, rato, coelho ou primata não humano tendo as desejadas especificidade, afinidade, e capacidade.

[00195] Para a construção de plasmídeos de expressão codificantes de anticorpos completamente humanizados com regiões constantes humanas, sequências de DNA codificantes de região variável de anticorpo podem ser inseridas em vetores de expressão (*e.g.*, vetores de expressão de mamíferos) entre um promotor e/ou intensificador a montante, por exemplo, promotor/intensificador imediato/precoce de citomegalovírus (CMV IE, *Cytomegalovirus Immediate/Early Promoter/Enhancer*), mais a sequência de sinal de imunoglobulina e um gene de região constante de imunoglobulina a jusante. Amostras de DNA podem ser, então, preparadas para transfecção em células de mamíferos.

[00196] Para a geração de linhagens celulares e a seleção de anticorpos completamente humanizados, pares de DNAs plasmidiais de cadeias pesadas e leves podem ser transfectados em células para expressão. Em algumas modalidades, células NSO de mamífero podem ser usada. As linhagens celulares produtoras de anticorpos humanizados podem ser expandidas para expressão de anticorpos que podem ser colhidos e purificados do meio de cultura de células.

[00197] Em algumas modalidades, os anticorpos humanizados podem ter reatividade cruzada com espécies não humanas. Reatividade cruzada com espécies pode permitir que os anticorpos sejam usados em animais diferentes para vários propósitos. Por exemplo, os anticorpos reativos cruzados podem ser usados em estudos animais pré-clínicos para prover informação sobre as

eficácia e/ou toxicidade do anticorpo. Espécies não humanas podem incluir camundongo, rato, coelho, cão, porco, cabra, ovelha, ou primata não humano como macaco *Cinomolgo*.

Síntese de IgG

[00198] Os anticorpos IgG (*e.g.* IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) incluindo uma ou mais sequências de aminoácidos de domínio variável e/ou de CDR aqui apresentadas (ou fragmento ou variantes das mesmas) podem ser sintetizados para teste e/ou desenvolvimento de produto posterior. Tais anticorpos podem ser produzidos pela inserção de um ou mais segmentos de cDNA codificante de sequências de aminoácidos desejadas em vetores de expressão adequados para a produção de IgG. Os vetores de expressão podem incluir vetores de expressão em mamíferos adequados para expressão de IgG em células de mamíferos. A expressão de IgGs em mamíferos pode ser realizada para garantir que os anticorpos produzidos incluam modificações (*e.g.* glicosilação) características de proteínas de mamíferos e/ou para garantir que as preparações de anticorpo não tenham endotoxina e/ou outros contaminantes de sistemas de expressão bacterianos que podem estar presentes nas preparações de proteína.

Hospedeiros imunogênicos

[00199] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser desenvolvidos mediante o uso de animais não humanos como hospedeiros para imunização, aqui referidos como “hospedeiros imunogênicos”. Em algumas modalidades, os hospedeiros imunogênicos são mamíferos. Em algumas modalidades, os hospedeiros imunogênicos são camundongos nocauteados transgênicos. Os antígenos tendo sítios-alvo e/ou epítomos-alvo de anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados para contatar os hospedeiros imunogênicos com a finalidade de estimular uma resposta imune e produzir anticorpos no hospedeiro imunogênico que especificamente se ligam aos sítios-alvo e/ou

aos epítomos-alvo presentes nos antígenos introduzidos.

[00200] Os anticorpos produzidos mediante imunização podem ser isolados de soro dos os hospedeiros imunogênicos. As células produtoras de anticorpo dos hospedeiros imunogênicos podem também ser usadas para gerar linhagens celulares que produzem o anticorpo. Em algumas modalidades, a triagem de anticorpos e/ou de células produtoras de anticorpo do hospedeiro imunogênico pode ser realizada mediante o uso de ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISAs) e/ou arranjos de glicanas.

Análise estrutural e análise de sequência e otimização de anticorpo

[00201] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser submetidos à análise de sequência e/ou à análise estrutural em que são analisados para características que podem afetar a química de anticorpo, a afinidade de anticorpo, a especificidade de anticorpo, o enovelamento de proteína, a estabilidade de anticorpo, a fabricação de anticorpo, a expressão de anticorpo e/ou a imunogenicidade (*i.e.*, reações imunes em sujeitos sendo tratados com tais anticorpos) de anticorpo. Tal análise pode incluir comparações entre anticorpos que se ligam aos mesmos epítomos ou aos epítomos similares.

[00202] Sequências de anticorpos de anticorpos que se ligam ao mesmo epítomo podem ser analisadas para variação em sequências de cadeias leves e/ou pesadas. Tal análise pode incluir sequências de linhagem germinativa e/ou sequências de CDR. A informação obtida de tal análise pode ser usada para identificar (e opcionalmente modificar, deletar, substituir ou reparar) resíduos de aminoácidos conservados; segmentos conservados de aminoácidos; posições de aminoácido com características de cadeia lateral conservada; comprimentos de CDR conservada; e outros atributos conservados dentre os anticorpos que se ligam ao mesmo epítomo. Esta informação pode ser usada para desenhar variantes ou para informar procedimentos de otimização de anticorpo para melhorar a afinidade de

anticorpo, a especificidade de anticorpo, o enovelamento de proteína de anticorpo, a estabilidade de anticorpo, a fabricação de anticorpo, a expressão de anticorpo e/ou a imunogenicidade de anticorpo.

[00203] A análise de sequência pode incluir alinhamento de dois ou mais anticorpos que se ligam aos mesmos epítomos ou aos epítomos similares para identificar similaridades. Tal análise pode comparar a sequência e/ou o comprimento de regiões de anticorpo (*e.g.*, CDRs, domínios variáveis, segmentos de linhagem germinativa). Inserções de aminoácido, deleções de aminoácido, e substituições de aminoácido podem ser identificadas e avaliadas. Diferenças de sequências podem ser comparadas em relação à afinidade e/ou à especificidade do anticorpo.

[00204] Em alguns casos, as análises de sequência são conduzidas para identificar (e opcionalmente modificar, deletar, substituir ou reparar) uma ou mais cisteínas não pareadas ou um ou mais dissulfetos irregulares; sítios de glicosilação (*e.g.*, sítios NXS/T N-ligados); sítios de clivagem por ácido, sítios de oxidação de aminoácido, conformidade com sequências de linhagem germinativa; sítios de desamidação de asparagina; sítios de isomerização de aspartato; sítios de formação de piroglutamato N-terminal; e regiões (*patches*) passíveis de agregação em CDRs.

[00205] Em alguns casos, a presente invenção provê variantes com análise de sequência informada de anticorpos aqui apresentados. Como aqui usado, o termo “variante com análise de sequência informada” refere-se a uma variante de anticorpo que tem sido modificada com base em uma ou mais conclusões derivadas da análise de sequência de anticorpo. Em alguns casos, os anticorpos da invenção podem ser modificados para produzir variantes de anticorpos que incluem modificações em um(a) ou mais de a afinidade de anticorpo, a especificidade de anticorpo, o enovelamento de proteína de anticorpo, a estabilidade de anticorpo, a fabricação de anticorpo, a expressão de anticorpo e/ou a imunogenicidade de anticorpo.

[00206] Algumas variantes com análise de sequência informada incluem uma ou mais modificações em comprimento de CDR. Os anticorpos com comprimento de CDR modificado podem incluir um ou mais aminoácidos adicionados ou deletados em uma ou mais CDRs relativos a uma sequência de anticorpo original. Em alguns casos, as variantes com análise de sequência informada podem incluir uma substituição de uma ou mais CDRs por uma ou mais CDRs derivadas de outro anticorpo (*e.g.*, um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo ou ao epítopo similar). Em alguns casos, variantes com análise de sequência informada podem incluir uma substituição de um domínio variável de cadeia pesada ou da cadeia leve proveniente de outro anticorpo (*e.g.*, um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo ou ao epítopo similar). As variantes com análise de sequência informada podem incluir modificações em um ou mais genes de linhagem germinativa que expressam o anticorpo. Tais modificações pode incluir mutações pontuais, mutações regionais, mutações de inserção ou mutações de deleção. Em alguns casos, as modificações em gene de linhagem germinativa são realizadas para mover CDRs de um gene de linhagem germinativa conhecido para outro. As variantes com análise de sequência informada podem incluir outras variantes aqui descritas, incluindo, mas não limitadas a, scFvs, monocorpos, diacorpos, intracorpos, CARs, miméticos de anticorpo, etc.

[00207] Em algumas modalidades, a análise de sequência e/ou estrutural pode ser usada para informar a construção de bibliotecas de apresentação de fragmentos de anticorpos (incluindo, mas não limitadas a, bibliotecas de scFv, bibliotecas de apresentação em fago, e bibliotecas de apresentação em levedura). Em um exemplo, alinhamento de sequências pode ser realizado para alinhar dois ou mais anticorpos com um antígeno ou epítopo comum, e podem ser identificados resíduos de aminoácidos que estão conservados dentre os anticorpos alinhados ou que são variáveis dentre os anticorpos alinhados. Em tais casos, bibliotecas de apresentação de

fragmentos de anticorpo podem ser construída de modo que a variabilidade dentre os membros da biblioteca seja predominantemente limitada aos aminoácidos variáveis identificados na análise de sequência. Em alguns casos, tais bibliotecas podem ser usadas para identificar variantes com afinidade e/ou especificidade alteradas para um antígeno-alvo (*e.g.*, STn) ou um epítopo específico do antígeno alvo (*e.g.*, os epítopos reconhecidos pelos anticorpos dos Grupos 1, 2, 3 e 4 como descrito no Exemplo 1, aqui abaixo).

[00208] Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser modificados para remover, substituir ou diferentemente eliminar um ou mais resíduos de cisteína não pareados. Em alguns casos, os resíduos de cisteína não pareados podem ser reativos e em alguns casos podem afetar a afinidade e/ou a especificidade do anticorpo. Consequentemente, alguns anticorpos da invenção têm sido modificados para eliminar resíduos de cisteína não pareados. Em alguns casos, tais variantes podem ter especificidade e/ou afinidade para epítopo modificadas. Em alguns casos, a modificação de resíduos de cisteína não pareados pode alterar o enovelamento do anticorpo. Em alguns casos, estas variantes incluem uma substituição ou deleção de um ou mais resíduos de cisteína. Em alguns casos, estas variantes incluem um ou mais resíduos de aminoácidos adicionais (incluindo, mas não limitados a, a adição de um ou mais resíduos de cisteína) para prevenir ou reduzir os efeitos indesejados dos resíduos de cisteína não pareados. Em alguns casos, os resíduos de cisteína são substituídos por um aminoácido tendo uma cadeia lateral hidrofóbica (*e.g.*, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina metionina, fenilalanina ou triptofano).

Teste e caracterização de anticorpos

[00209] Os anticorpos aqui descritos podem ser testados e/ou caracterizados usando uma variedade de métodos. Tais métodos podem ser usados para determinar uma variedade de características que podem incluir, mas não são limitadas a, afinidade de anticorpo; especificidade de anticorpo; e

atividade de anticorpo (*e.g.*, ativação ou inibição de vias de sinalização celular ou outras atividades biológicas ou celulares). O teste de anticorpos pode adicionalmente incluir teste *in vivo* (*e.g.*, estudos em animais e/ou humanos) para um(a) ou mais de toxicidade, efeito terapêutico, farmacodinâmica, farmacocinética, deposição, metabolismo, e excreção. O teste em animais pode incluir, mas não é limitado a, teste em camundongos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, porcos, primatas (*e.g.*, macacos Cinomolgos), ovelhas, cabras, cavalos, e gado bovino.

Ensaaios com base em células

[00210] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser testados ou caracterizados mediante o uso de um ou mais ensaios com base em células. Tais ensaios com base em células podem ser realizados *in vitro* com células em cultura. Em alguns casos, os ensaios com base em células podem ser realizados *in vivo*. Exemplos de ensaios *in vivo* com base em células incluem modelos de tumor nos quais as células tumorais são injetadas ou diferentemente introduzidas em um hospedeiro.

[00211] Em alguns casos, as células usadas em ensaios com base em células podem expressar uma ou mais glicanas-alvo reconhecidas por um ou mais anticorpos da invenção. Tais glicanas podem ser naturalmente expressadas por tais células ou, alternativamente, as células podem ser induzidas para expressarem uma ou mais glicanas desejadas para os propósitos de um ensaio específico. A expressão induzida pode ser mediante um ou mais tratamentos que suprarregulam a expressão de proteínas ou enzimas glicosiladas que regulam a glicosilação. Em outros casos, a expressão induzida pode ser transfecção, transdução, ou outra forma de indução de um ou mais genes ou transcritos para a expressão endógena de uma ou mais proteínas ou enzimas glicosiladas envolvidas na regulação de glicosilação.

[00212] Em alguns casos, os ensaios com base em células aqui usados podem incluir o uso de células cancerosas. Muitas linhagens celulares

cancerosas estão disponíveis para experimentos para testar os anticorpos da invenção. Tais células podem expressar a glicana-alvo ou podem ser induzidas para expressarem glicanas-alvo. Adicionalmente, as linhagens celulares cancerosas podem ser usadas para testar os anticorpos da invenção, se as linhagens celulares cancerosas são representativas de células-tronco cancerosas. Linhagens celulares de célula-tronco cancerosa (CSC, *Cancer Stem Cell*) podem ser isoladas ou diferenciadas das células cancerosas crescidas em cultura (*e.g.*, mediante separação com base em marcadores específicos para células-tronco cancerosas). As linhagens celulares em ensaios com base em células podem incluir, mas não são limitadas a, linhagens celulares de mama, de cólon, de ovário, de linfócito, de medula óssea, e de pele. As linhagens celulares específicas podem incluir, mas não são limitadas a, células SNU-1, células LS-174T, células MC38, células TOV-112D, células TOV-21G, células Jurkat E6.1, células K-562, células B16-F0, células B16-F10, células LSI 80, células COLO205, células TB4, células HT29, células Panc1, células HPAC, células HPAFII, células RKO, células SW480, e células SNU-C2A.

[00213] Em algumas modalidades, linhagens celulares de câncer ovariano podem ser usadas. Tais linhagens celulares podem incluir, mas não são limitadas às linhagens celulares KOV3, OVCAR3, OV90 e A2870. Em alguns casos, células CSC podem ser isoladas destas linhagens celulares pelo isolamento das células expressoras de marcadores celulares CD44 e/ou CD133.

[00214] As células OVCAR3 foram primeiro estabelecidas usando ascite maligna obtida de uma paciente sofrendo de adenocarcinoma ovariano maligno (Hamilton, T.C. *et al.*, 1983. *Cancer Res.* 43: 5379-89). Populações de células-tronco cancerosas podem ser isoladas das culturas de células OVCAR3 mediante a seleção com base em marcadores de superfície celular específicos como CD44 (envolvido na adesão celular e na migração celular),

CD133 e CD117 (Liang, D. *et al.*, 2012. *BMC Cancer*. 12: 201, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). As células OV90 são células de câncer ovariano epitelial que foram similarmente derivadas de ascite humana (consulte a Patente U.S. nº 5.710.038). As células OV-90 podem também expressar CD44 quando ativadas (Meunier, L. *et al.*, 2010. *Transl. Oncol.* 3(4): 230-8).

Arranjos de glicanas

[00215] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser desenvolvidos mediante o uso de arranjos de glicanas. Como aqui usado, o termo “arranjo de glicanas” refere-se a uma ferramenta usada para identificar agentes que interagem com numerosas glicanas diferentes ligadas ao substrato do arranjo. Em algumas modalidades, os arranjos de glicanas incluem numerosas glicanas quimicamente sintetizadas, aqui referidas como “sondas de glicanas”. Em algumas modalidades, os arranjos de glicanas incluem pelo menos 2, pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90, pelo menos 100, pelo menos 150, pelo menos 350, pelo menos 1.000 ou pelo menos 1.500 sondas de glicanas. Em algumas modalidades, os arranjos de glicanas podem ser customizados para apresentarem um conjunto desejado de sondas de glicanas. Em algumas modalidades, as sondas de glicanas podem estar ligadas ao substrato do arranjo por uma molécula conectora. Tais conectores podem incluir moléculas incluindo, mas não limitadas a, -O(CH₂)₂CH₂)NH₂ e O(CH₂)₃NHCOCH₂(OCH₂CH₂)₆NH₂.

[00216] Em algumas modalidades, um arranjo de glicanas pode ter mais que 70 glicanas quimicamente sintetizadas, a maioria das quais são apresentadas como pares de glicanas contendo Neu5Ac e Neu5G. Alguns exemplos de sondas de glicanas podem incluir: Neu5Ac- α -2-6-GalNAc (AcSTn); Neu5Gc- α -2-6-GalNAc (GcSTn); Neu5,9Ac2- α -2,6-GalNAc;

Neu9Ac5Gc- α -2,6-GalNAc, e GalNAc (Tn). A especificidade de ligação do anticorpo a AcSTn versus GcSTn pode ser determinada usando o arranjo ou outros métodos de determinação de especificidade conhecidos na técnica. Além disso, o perfil de ligação de anticorpos ao STn O-acetilado pode ser determinado. A perda de O-acetilação em STn é relevante para câncer porque a expressão associada com câncer correlaciona-se com o reconhecimento aumentado de STn por anticorpos (Ogata, S. *et al.*, “Tumor-associated sialylated antigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa”. *Cancer Res.* 1995 May 1;55(9): 1869-74) Em alguns casos, os arranjos de glicanas podem ser usados para determinar o reconhecimento de STn versus Tn.

Técnicas de triagem de bibliotecas de apresentação de fragmentos de anticorpo

[00217] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos e/ou otimizados usando métodos de alto desempenho de descoberta. Tais métodos podem incluir qualquer uma das técnicas de apresentação (*e.g.* técnicas de triagem de bibliotecas de apresentação) reveladas no Pedido de Patente Internacional nº WO2014074532, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências. Em algumas modalidades, anticorpos sintéticos podem ser desenhados, selecionados ou otimizados pela triagem de antígenos-alvo usando tecnologias de apresentação (*e.g.* tecnologia de apresentação em fago). As bibliotecas de apresentação em fago podem incluir milhões a bilhões de partículas de fago, dada uma expressora de fragmentos de anticorpo singulares sobre os capsídeos virais deles. Tais bibliotecas podem prover recursos ricamente diversos que podem ser usados para selecionar potencialmente centenas de fragmentos de anticorpo com níveis diversos de afinidade para um ou mais antígenos de interesse (McCafferty, *et al.*, 1990. *Nature*. 348:552-4; Edwards, B.M. *et al.*, 2003. *JMB*. 334: 103-18; Schofield,

D. *et al.*, 2007. *Genome Biol.* 8, R254 e Pershad, K. *et al.*, 2010. *Protein Engineering Design and Selection*. 23:279-88; cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Com frequência, os fragmentos de anticorpo presentes em tais bibliotecas incluem fragmentos scFv de anticorpo que incluem uma proteína de fusão de domínios de anticorpo VH e VL unidos por um conector flexível. Em alguns casos, scFvs podem conter a mesma sequência com a exceção de sequências singulares codificantes de alças variáveis das regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Em alguns casos, scFvs são expressados como proteínas de fusão, ligadas às proteínas capsidiais virais (*e.g.* a terminação-N da proteína capsidial viral pIII). As cadeias VL podem ser expressadas separadamente para montagem com as cadeias VH no periplasma antes da incorporação complexa nos capsídeos virais. Os membros de biblioteca precipitados podem ser sequenciados a partir do fago ligado para obter cDNA codificante de scFvs desejados. Tais sequências podem ser diretamente incorporadas em sequências de anticorpo para produção de anticorpos recombinantes, ou mutadas e utilizadas para otimização adicional mediante maturação de afinidade *in vitro*.

Desenvolvimento de anticorpos citotóxicos

[00218] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser capazes de induzir citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC, *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*) e/ou fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP, *Antibody-Dependent Cell Phagocytosis*). ADCC é um mecanismo imune pelo qual as células são lisadas como resultado do ataque de células imunes. Tais células imunes podem incluir células CD56+, células assassinas naturais (NK, *Natural Killer*) CD3-, monócitos e neutrófilos (Strohl, W.R. “Therapeutic Antibody Engineering”. Woodhead Publishing, Philadelphia PA., 2012. Ch. 8, p186, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00219] Em alguns casos, os anticorpos da presente invenção podem ser modificados para incluir um dado isótipo dependendo de se ou não ADCC ou ADCP é desejada após ligação ao anticorpo. Tais anticorpos, por exemplo, podem ser modificados de acordo com qualquer um dos métodos revelados por Alderson, K.L. *et al.*, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. 2011:379123). No caso de anticorpos de camundongo, isótipos diferentes de anticorpos são mais eficazes na promoção de ADCC. IgG2a, por exemplo, é mais eficaz na indução de ADCC do que IgG2b. Alguns anticorpos da presente invenção, incluindo anticorpos IgG2b de camundongo podem ser remodelados para serem anticorpos IgG2a. Tais anticorpos remodelados podem ser mais eficazes na indução de ADCC após a ligação aos antígenos associados com células. Em algumas modalidades, os anticorpos são remodelados pela alteração ou introdução de uma ou mais modificações pós-traducionais para aprimorar a atividade biológica ADCC e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC, *Complement-Dependent Cytotoxicity*).

[00220] Em algumas modalidades, genes codificantes de regiões variáveis de anticorpos desenvolvidos de acordo com os métodos da presente invenção podem ser clonados em vetores de expressão em mamíferos codificantes de regiões Fc humanas. Tais regiões Fc podem ser regiões Fc de IgG1 κ humana. Regiões Fc de IgG1 κ podem incluir mutações de aminoácido conhecidas por intensificarem a ligação ao receptor de Fc e a ADCC.

Conjugados de anticorpo-fármaco

[00221] Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser desenvolvidos para aplicações terapêuticas de conjugado de anticorpo-fármaco (CAF). Os CAFs são anticorpos aos quais uma ou mais cargas (*e.g.*, agentes terapêuticos) são ligadas [*e.g.* diretamente ou por meio de conector (*e.g.* um conector clivável ou um conector não clivável)]. Os CAFs são úteis para distribuição de agentes terapêuticos (*e.g.*, fármacos ou agentes citotóxicos) para um(a) ou mais células-alvo ou tecidos-alvo (Panowski, S. *et*

al., 2014. *mAbs* 6:1, 34-45). Em alguns casos, os CAFs podem ser desenhados para se ligarem a um antígeno de superfície sobre uma célula-alvo. Após a ligação, o completo inteiro anticorpo-antígeno pode ser internalizado e direcionado para um lisossomo celular. Os CAFs podem ser, então, degradados, liberando a carga ligada. Se a carga é um agente citotóxico, a célula-alvo pode ser morta ou diferentemente desativada. Os agentes citotóxicos podem incluir, mas não são limitados a, inibidores de citoesqueleto [*e.g.*, inibidores da polimerização de tubulina, e inibidores de proteínas motoras cinosinas com função específica na formação dos fusos mitóticos e meióticos (KSP, *Kinesin Spindle Protein inhibitors*)], agentes danificadores de DNA (*e.g.*, caliqueamicinas, duocarmicinas, e dímeros de pirrolobenzodiazepina como talirina e tesirina), inibidores de topoisomerase [*e.g.*, compostos e derivados de camptotecina como 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38) e derivado de exatecano DXd], inibidores de transcrição (*e.g.*, inibidores de RNA-polimerase como amanitina), e inibidores de quinase [*e.g.*, inibidores de fosfoinosítido-3-quinase (PI3K, *PhosphoInositide-3-Kinase*) ou inibidores de proteína quinase-quinase ativada por mitógeno (MEK, *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*)].

[00222] Os inibidores da polimerização de tubulina podem incluir, mas não são limitados a, maitansinas (*e.g.*, entansina [DM1] e ravtansina [DM4]), auristatinas, tubulisinas, e alcaloides de Vinca ou derivados dos mesmos. Auristatinas exemplificadoras incluem auristatina E (também conhecida como um derivado de dolastatina-10), auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil-auristatina E (MMAE), monometil-auristatina F (MMAF), auristatina F e dolastatina. Compostos de tubulisina exemplificadores incluem tubulisinas A, B, C, D, E, F, G, H, I, U, e V de ocorrência natural, e análogos de tubulisina como pretubulisina D (PTb-D43) e N¹⁴-desacetoxitubulisina H (Tb1). Alcaloides de Vinca exemplificadores incluem vincristina, vimblastina, vindesina, e navelbina (vinorelbina). Em

algumas modalidades, os agentes citotóxicos podem incluir derivados de auristatina [e.g. 1-aminopropan-2-il-auristatina-F, auristatina-F-hidroxipropilamida, auristatina-F-propilamida, auristatina-F-fenilenodiamina (AFP)]; derivados de tubulisina; derivados de alcaloides de Vinca [e.g. N-(3-hidroxipropil)vindesina (HPV)], e qualquer um daqueles descritos em Patentes U.S. n°s 8.524.214; 8.685.383; 8.808.679; e 9.254.339; Publicações de Pedidos de Patente U.S. n°s US20150314008A1, US20160220696A1 e US20160022829A1; cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00223] Em algumas modalidades, os conjugados de anticorpo-fármaco (CAFs) da invenção podem compreender, ainda, um ou mais carreadores poliméricos que conectam o anticorpo e os agentes terapêuticos (e.g., conjugados de anticorpo-polímero-fármaco). Como aqui usado, o termo “carreador polimérico” refere-se a um polímero ou um polímero modificado, que pode estar covalentemente ligado a um ou mais agentes terapêuticos e/ou anticorpos. Os carreadores poliméricos podem prover sítios de conjugação adicionais para agentes terapêuticos, aumentando a razão entre fármaco e anticorpo e intensificando os efeitos terapêuticos de CAFs. Em algumas modalidades, carreadores poliméricos usados nesta invenção podem ser solúveis em água e/ou biodegradáveis. Tais carreadores poliméricos incluem, mas não são limitados a, poli(glicol etilênico) (PEG, *Poly(Ethylene Glycol)*), poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (poli-HPMA), poli(α -aminoácidos) [e.g., poli(L-lisina), poli(ácido L-glutâmico), e poli((N-hidroxialquil)glutamina)], polímeros de carboidrato [e.g., dextrinas, hidroxietilamido (HES, *HydroxyEthylStarch*), e poli(ácido siálico)], glicopolissacarídeos (e.g., homopolissacarídeo como celulose, amilose, dextrana, levana, fucoidana, carragenana, inulina, pectina, amilopectina, glicogênio e lixenana; ou homopolissacarídeo como agarose, hialuronana, sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, sulfato de queratana, ácido

algínico e heparina), glicolipídios, glicoconjugados, poligliceróis, poli(álcoois vinílicos), poli(ácido acrílico), policetal e poliacetal [*e.g.*, poli(1-hidroximetiletileno-hidroximetilformal)], também conhecido como PHF ou FLEXIMER®, descrito nas Patentes U.S. n°s 5.811.510; 5.863.990; e 5.958.398; cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências], e derivados, dendrímeros, copolímeros e misturas dos mesmos. Por exemplo, o carreador polimérico pode incluir um copolímero de um poliacetal/policetal (*e.g.*, PHF) e um polímero hidrofílico como poliacrilatos, polímeros polivinílicos, poliésteres, poliortoésteres, poliamidas, polipeptídeos, e derivados dos mesmos.

[00224] Em algumas modalidades, os agentes terapêutico são ligados (*e.g.*, covalentemente ligados) aos anticorpos da invenção diretamente ou por meio de conectores. Em algumas modalidades, os agentes terapêutico são ligados aos carreadores poliméricos diretamente ou por meio de conectores, e os carreadores poliméricos são ligados aos anticorpos diretamente ou por meio de conectores. Em algumas modalidades, os conectores podem compreender uma porção oxálico, malônico, succínico, glutárico, adípico, pimélico, subérico, azelaico, sebácico, ftálico, isoftálico, tereftálico, ácido diglicólico, tartárico, glutâmico, fumárico, ou aspártico, incluindo derivados amida, imida, ou imida cíclica de cada uma das mesmas, e cada uma opcionalmente substituída. Conectores exemplificadores podem incluir qualquer um daqueles revelados em Patentes U.S. n°s 8.524.214; 8.685.383; 8.808.679; 9.254.339; e/ou 9.555.112, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00225] Em algumas modalidades, os conectores podem ser conectores cliváveis. Os conectores cliváveis podem ser clivados sob determinadas condições (como alterações em pH, temperatura, ou redução) ou clivados por enzimas (*e.g.*, proteases e glicuronidases) para permitir a liberação de agentes terapêuticos dos CAFs. Tais conectores podem incluir uma ligação lábil como

uma ligação éster, ligação amida, ou ligação dissulfeto. Conectores cliváveis não limitadores podem incluir conectores sensíveis ao pH (*e.g.*, hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, tioéter, ortoéster, acetal, ou cetal); conectores sensíveis à redução [*e.g.*, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidila (SPDP, *N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate*), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidila (SPDB, *N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate*), 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidila (SPP, *N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate*), S-acetiltioacetato de N-succinimidila (SATA, *N-succinimidyl-S-acetylthioacetate*) e N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno ou 4-(1-(piridin-2-ildissulfanil)etil)benzoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila (SMPT)]; conectores fotossensíveis; e conectores enzimaticamente cliváveis [*e.g.*, conectores peptídicos como valina-citrulina, valina-citrulina-p-aminobenzoiloxicarbonila (vc-PAB), maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenzoiloxicarbonila (MC-vc-PAB), conectores cliváveis por glicuronidases, como glicuronídeo-MABC, ou conectores cliváveis por esterases].

[00226] Em outras modalidades, os conectores podem ser conectores não cliváveis. Os conectores não cliváveis aumentam a estabilidade plasmática dos CAFs comparados com os conectores cliváveis. Conectores não cliváveis exemplificadores incluem maleimida-alcano e maleimida-ciclohexano (MCC).

[00227] Os conjugados de anticorpo-fármaco (CAFs) da invenção podem ser preparados usando qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, podem ser modificados para conter um grupo funcional que pode reagir com um grupo funcional no anticorpo. Os conjugados de anticorpo-fármaco (CAFs) podem ser preparados pela reação dos dois grupos funcionais para formar um conjugado. Em alguns casos, carreadores poliméricos podem ser modificados para conter grupos funcionais que podem reagir com o grupo

funcional nos agentes terapêuticos e o grupo funcional no anticorpo sob diferentes condições químicas. Anticorpos, carreadores poliméricos, e agentes terapêuticos podem ser ligados para formar os conjugados de anticorpo-polímero-fármaco mediante reações químicas sequenciais. A conjugação com anticorpos pode utilizar um resíduo de lisina ou de cisteína como o sítio de conjugação. Em algumas modalidades, os anticorpos podem ser modificados para terem resíduos de lisina ou de cisteína adicionais. Tais abordagens podem evitar a disrupção da estrutura do anticorpo (*e.g.*, ligações dissulfeto intercadeia) e manter as estabilidade e/ou atividade do anticorpo.

[00228] Como aqui descrito, a razão entre fármaco e anticorpo (RFA) é o número médio de agentes terapêuticos (*e.g.*, fármacos ou agentes citotóxicos) conjugados com anticorpos. Em algumas modalidades, a razão entre fármaco e anticorpo de um CAF da invenção é pelo menos 1:1, pelo menos 2:1, pelo menos 4:1, pelo menos 6:1, pelo menos 8:1, pelo menos 10:1, pelo menos 12:1, pelo menos 15:1, pelo menos 20:1 ou pelo menos 25:1.

[00229] Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser testados para a capacidade deles para promoverem a morte celular quando desenvolvidos como CAFs. Ensaios de viabilidade podem ser realizados na presença de conjugados de anticorpo-secundário-fármaco. Os anticorpos com potente inibição de crescimento celular podem ser então usados para desenhar conjugados de anticorpo-fármaco (CAF) diretos. O uso de tais conjugados de anticorpo-secundário-fármaco em ensaios citotóxicos com base em células pode permitir a pré-triagem rápida de muitos candidatos ao CAF. Com base em tais ensaios, um candidato anticorpo não conjugado é diretamente adicionado às células na presença de um anticorpo secundário que é conjugado com um ou mais agentes citotóxicos (aqui referido como um CA2°F). A internalização do complexo de anticorpo/CA2°F para dentro de células que expressam uma alta densidade do antígeno-alvo pode realizar uma liberação de fármaco dependente de dose dentro das células, causando um

efeito citotóxico para matar as células (*e.g.*, células tumorais), enquanto que as células expressoras de uma densidade baixa do antígeno-alvo não são afetadas (*e.g.*, células normais).

[00230] Os CAFs da invenção podem ser desenhados para reconhecerem células cancerosas-alvo. Tais CAFs podem incluir anticorpos direcionados para um ou mais antígenos de carboidrato associados com tumor (TACA, *Tumor-Associated Carbohydrate Antigen*). Em alguns casos, os CAFs da invenção são anticorpos anti-STn. Em algumas modalidades, os CAFs incluem um ou mais dos domínios variáveis apresentados na Tabela 2. Tal CAF pode também incluir pelo menos uma região constante de IgG humana, incluindo, mas não limitada a, qualquer uma daquelas apresentadas na Tabela 3.

Desenvolvimento de receptores quiméricos de antígenos

[00231] Em algumas modalidades, sequências de anticorpo da invenção podem ser usadas para desenvolver um receptor quimérico de antígeno (CAR, *Chimeric Antigen Receptor*). Os CARs são receptores de transmembrana expressados sobre células imunes que facilitam o reconhecimento e a matança de células-alvo (*e.g.* células tumorais). Os CARs tipicamente incluem três partes fundamentais. Estas incluem um ectodomínio (também conhecido como o domínio de reconhecimento), um domínio transmembrana e um domínio intracelular (de sinalização). Os ectodomínios facilitam a ligação aos antígenos celulares sobre as células-alvo, enquanto que os domínios intracelulares tipicamente incluem funções de sinalização celular para promover a matança de células-alvo ligadas. Ademais, podem ter um domínio extracelular com um ou mais domínios variáveis de anticorpo aqui descritos ou fragmentos dos mesmos. Os CARs da invenção também incluem um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática. Os CARs podem ser desenhados para incluírem um(a) ou mais segmentos de um anticorpo, domínios variáveis de anticorpo e/ou CDR(s) de anticorpo, de modo que

quando tais CARs são expressados sobre células efectoras imunes, as células efectoras imunes ligam-se e eliminam quaisquer células que são reconhecidas pelas porções do anticorpo dos CARs.

[00232] As características dos CARs incluem a capacidade deles para redirecionarem especificidade e reatividade de células-T para um alvo selecionado em uma maneira não restrita ao MHC (*Major Histocompatibility Complex*, complexo principal de histocompatibilidade), explorando as propriedades de ligação ao antígeno de anticorpos monoclonais. O reconhecimento de antígeno não restrito ao MHC concede às células-T expressoras de CARs a capacidade para reconhecerem o antígeno independente de processamento do antígeno, desviando-se, assim, de um mecanismo principal de escape do tumor. Além disso, quando expressados em células-T, os CARs vantajosamente não se dimerizam com as cadeias alfa e beta de receptor de célula-T (TCR, *T Cell Receptor*) endógeno.

[00233] Os CARs modificados para reconhecerem tumores podem ter especificidade para um ou mais antígenos de carboidrato associados com tumor (TACAs, *Tumor Associated Carbohydrate Antigens*). Em algumas modalidades, os ectodomínios destes CARs podem incluir um ou mais domínios variáveis de anticorpo ou um fragmento dos mesmos. Em algumas modalidades, os CARs são expressados em células-T, e podem ser referidos como “células-T modificadas com CAR” ou “CAR-Ts”. As CAR-Ts podem ser modificadas com ectodomínios de CAR tendo um ou mais domínios variáveis de anticorpo.

Atributos estruturais de receptores quiméricos de antígenos

[00234] Com a tecnologia de transferência gênica, as células-T podem ser modificadas para estavelmente expressarem anticorpos sobre a superfície delas, conferindo uma desejada especificidade por antígeno. Receptores quiméricos de antígenos (CARs, *Chimeric Antigen Receptors*) combinam um domínio de reconhecimento de um anticorpo específico com um domínio

intracelular da cadeia CD3-zeta ou da proteína FcγRI tendo propriedades de ativação de células-T em uma única proteína de fusão quimérica. A tecnologia de CAR provê reconhecimento, não restrito ao MHC, de células-alvo pelas células-T. A remoção da restrição ao MHC de células-T facilita o uso destas moléculas em qualquer paciente e também, em ambas as células-T CD8⁺ e CD4⁺, habitualmente restritas aos epítomos de MHC de classe I ou II, respectivamente. O uso de regiões de ligação ao Ab (*Antibody*, Anticorpo) permite que as células-T respondam aos epítomos formados não apenas pela proteína, mas outrossim pelos carboidrato e lipídio. Esta abordagem de receptor quimérico é especialmente adequada para imunoterapia de câncer, sendo capaz de se desviar de muitos dos mecanismos pelos quais os tumores evitam o imunorreconhecimento, como a infrarregulação de MHC, a carência de expressão de moléculas coestimulatórias, a resistência a CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*, linfócito-T citotóxico), e a indução de supressão de células-T, e onde o uso de melhor combinação de ambos CTL CD8⁺ e células-T CD4⁺ para ótima eficácia antitumoral. Tem sido demonstrado que esta abordagem é aplicável em uma ampla variedade de antígenos tumorais, adicionalmente aos vírus com (Finney, *et al.*, *J. Immunology*, 2004, 172:104-113).

[00235] Embora os receptores quiméricos de antígenos possam engatilhar a ativação de células-T em uma maneira similar àquela de receptores de célula-T endógenos, na prática, a aplicação clínica de tecnologia de CAR tem sido impedida pela expansão inadequada *in vivo* de células-T com receptor quimérico de antígeno. Por exemplo, os CARs de primeira geração incluíam como domínio de sinalização deles a região citoplasmática da cadeia γ do receptor Fc ou CD3ζ. Estes CARs de primeira geração foram testados em estudos clínicos de fase I em pacientes com câncer ovariano, câncer renal, linfoma, e neuroblastoma, e foi descoberto que induzem respostas modestas, eficazmente redirecionando a citotoxicidade de células-T mas falhando em permitir a proliferação e a sobrevivência de células-T após

exposição repetida ao antígeno. Os protótipos para CATs de segunda geração envolviam receptores abrangendo ambos CD28 e CD3ζ, e CARs de segunda geração têm sido testados para o tratamento de malignidades de células-B e de outros cânceres (Sadelain, *et al.*, (2009) *Current Opinion in Immunology*, 21(2):215-223). Dessa forma, os CARs têm rapidamente expandido em um arranjo diverso de receptores com diferentes propriedades funcionais.

[00236] Mais recentemente, foi descoberto que as respostas de células-T mediadas por CAR podem ser intensificadas com a adição de um domínio coestimulatório. Em modelos pré-clínicos, foi descoberto que a inclusão do domínio de sinalização CD137 (4-1BB) significativamente aumenta a atividade antitumoral e a persistência *in vivo* de receptores quiméricos de antígenos em comparação com a cadeia CD3-zeta sozinha (Porter, *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2011, 365:725-733).

[00237] Dessa forma, em algumas modalidades da presente revelação, seqüências de anticorpo da invenção podem ser usadas para desenvolver um receptor quimérico de antígeno (CAR). Em algumas modalidades, os CARs são receptores transmembrana expressados sobre células imunes que facilitam o reconhecimento e a matança de células-alvo (*e.g.* células tumorais).

[00238] Em muitos cânceres, antígenos específicos de tumor para reconhecimento não têm sido definidos, mas em neoplasmas de células-B, CD19 é um alvo atrativo. A expressão de CD19 é restrita às células-B malignas e normais e aos precursores de célula-B. Um teste clínico piloto de tratamento com células-T autólogas expressoras de um receptor quimérico de antígeno anti-CD19 (CART19) foi realizado em pacientes com leucemia linfóide crônica (CLL, *Chronic Lymphoid Leukemia*) deficiente em p53, avançada. A geração de uma resposta imune específica para CD19 em medula óssea foi demonstrada pela liberação temporal de citocinas e ablação de células de leucemia que coincidiu com a infiltração máxima de células-T com receptor quimérico de antígeno. (Porter, *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2011,

365:725-733).

[00239] Outros atributos estruturais de CARs podem incluir qualquer um daqueles revelados em várias Publicações PCT atribuídas a City of Hope e tendo o inventor comum Michael Jensen. Por exemplo, a publicação PCT nº WO 00/23573 descreve células-T redirecionadas específicas para CD20, geneticamente modificadas, expressoras de uma proteína de superfície celular tendo um domínio extracelular que inclui um receptor específico para CD20, um domínio de sinalização intracelular, e um domínio transmembrana. Uso de tais células para imunoterapia celular de malignidades D20⁺ e para ab-rogação de função de célula-B inconveniente. Em uma modalidade, a proteína de superfície celular é um receptor FvFc:ζ de cadeia única onde Fv designa as cadeias VH e VL de um anticorpo monoclonal de cadeia única para CD20 ligado por peptídeo, Fc representa uma região de dobradiça-CH2-CH3 de uma IgG1 humana, e ζ (zeta) representa o domínio de sinalização intracelular da cadeia CD3-zeta humana. Um método de preparação de uma célula-T redirecionada expressora de um receptor quimérico de célula-T por eletroporação usando DNA nu codificante do receptor. Similarmente, a Publicação PCT nº WO 02/077029 descreve células imunes redirecionadas específicas para CD19, geneticamente modificadas, expressoras de uma proteína de superfície celular tendo um domínio extracelular que inclui um receptor que é específico para CD19, um domínio de sinalização intracelular, e um domínio transmembrana. Uso de tais células para imunoterapia celular de malignidades CD19⁺ e para ab-rogação de qualquer função de célula-B inconveniente. Em uma modalidade, a célula imune é uma célula-T e a proteína de superfície celular é um receptor FvFc:ζ onde Fv designa as cadeias VH e VL de um anticorpo monoclonal de cadeia única para CD19, Fc representa pelo menos parte de uma região constante de uma IgG1, e ζ (zeta) representa o domínio de sinalização intracelular da cadeia zeta do complexo receptor de antígeno de célula-T (cadeia CD3-zeta humana). O domínio

extracelular scFvFc e o domínio intracelular zeta são ligados por um domínio transmembrana como o domínio transmembrana CD4. Um método de preparação de uma célula-T redirecionada expressora de um receptor quimérico de célula-T por eletroporação usando DNA nu codificante do receptor. Estes receptores quiméricos de antígenos têm a capacidade, quando expressados em célula-T, para redirecionarem o reconhecimento de antígeno com base na especificidade do anticorpo monoclonal. O desenho de receptores scFvFc: com especificidades-alvo para epítomos de superfície de células tumorais é uma estratégia conceitualmente atrativa para gerar células efectoras imunes antitumorais para terapia adotiva porque não se baseia na imunidade antitumoral pré-existente. Estes receptores são “universais” pelo fato de que se ligam ao antígeno em uma maneira independente de MHC, por conseguinte, um constructo de receptor pode ser usado para tratar uma população de pacientes com tumores positivos para antígeno. As Publicações PCT de City of Hope n°s WO 02/088334, WO 2007/059298 e WO 2010/065818 descrevem “zetacinas” compostas de um domínio extracelular que inclui um ligante de receptor solúvel ligado a uma região de suporte capaz de ancorar o domínio extracelular a uma superfície celular, uma região transmembrana e um domínio de sinalização intracelular. Zetacinas, quando expressadas sobre a superfície de linfócitos-T, direcionam a atividade de célula-T para aquelas células específicas expressoras de um receptor para o qual o ligante de receptor solúvel é específico.

[00240] Atributos adicionais de CARs podem incluir qualquer um daqueles revelados em duas Publicações PCT atribuídas à University of Texas [Universidade do Texas] e tendo um inventor comum Lawrence Cooper. A Publicação PCT n° WO 2009/091826 descreve composições que incluem um polipeptídeo receptor quimérico (ou receptor quimérico de antígeno, CAR) de célula-T específico para CD19 humano (designado hCD19CAR) que inclui um domínio de sinalização intracelular, um domínio transmembrana e um

domínio extracelular, o domínio extracelular incluindo uma região de ligação ao CD19 humano. Em outro aspecto, a região de ligação ao CD19 é um $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv ou scFv. O domínio intracelular pode incluir um domínio de sinalização intracelular CD3 ζ humano e pode incluir, ainda, um segmento intracelular de CD28 humano. Em determinados aspectos, o domínio transmembrana é um domínio transmembrana CD28. A Publicação PCT nº WO 2013/074916 descreve métodos e composições para imunoterapia utilizando células-T CAR⁺ geneticamente modificadas para eliminar a expressão de HLA e/ou de receptor de célula-T. Em modalidades específicas, as células-T negativas para HLA e/ou negativas para receptor de célula-T são geradas usando, por exemplo, nucleases dedo-de-zinco. As células-T CAR⁺ de doadores saudáveis alogeneicos podem ser administradas a qualquer paciente sem causar doença de enxerto versus hospedeiro (DEVH), atuando como reagentes universais para tratamento padronizado de condições médicas como câncer, autoimunidade, e infecção.

[00241] A Publicação PCT nº WO 2011/041093 atribuída ao U.S. Department of Health and Human Services descreve receptores quiméricos de antígenos anti-receptor de fator de crescimento endotelial vascular-2 que incluem um domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo KDR-1121 ou DC101, um domínio de dobradiça extracelular, um domínio transmembrana do receptor de célula-T, e um domínio de sinalização do receptor de célula-T intracelular, e o uso deles no tratamento de câncer.

[00242] As Publicações PCT nºs WO 2012/079000 e WO 2013/040557, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências, são atribuídas à Universidade da Pensilvânia [University of Pennsylvania] e compartilham o inventor comum Carl H. June; estas publicações descrevem CARs compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembrana, uma região de sinalização coestimulatória, e um domínio de sinalização CD3-zeta, e métodos para

geração de células-T transfectadas com RNA CAR, respectivamente.

[00243] A Publicação PCT nº WO2013/126712, também atribuída à University of Pennsylvania [Universidade da Pensilvânia] e compartilhando o inventor comum Carl H. June, descreve composições e métodos para geração de uma população persistente de células-T apresentando expansão exponencial prolongada em cultura que é independente de ligante e independente da adição de citocinas exógenas ou células alimentadoras, que são úteis para o tratamento de câncer. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um domínio de ligação anti-cMet. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um domínio de ligação anti-mesotelina. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno é um domínio de ligação anti-CD19. O domínio de dobradiça é IgG4, o domínio transmembrana é um domínio transmembrana CD28. Em algumas modalidades, a região de sinalização coestimulatória é uma região de sinalização de CD28. Também é provido um vetor compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificante de um receptor quimérico de antígeno (CAR), e o CAR compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, um domínio de dobradiça, um domínio transmembrana, uma região de sinalização coestimulatória, e um domínio de sinalização CD3-zeta.

[00244] A Publicação PCT nº WO 2014/039513 atribuída à University of Pennsylvania [Universidade da Pensilvânia] descreve composições e métodos para inibição de uma ou mais isoformas de diacilglicerol-quinase (DGK, *Diacylglycerol Kinase*) em uma célula com o propósito de intensificar a atividade citolítica da célula. As células podem ser usadas em transferência de célula-T adotiva na qual, a célula é modificada para expressar um receptor quimérico de antígeno (CAR). A inibição de DGK em células-T usada na transferência de célula-T adotiva aumenta a atividade citolítica das células-T e, por conseguinte, pode ser usada no tratamento de uma variedade de condições, incluindo câncer, infecção, e distúrbios imunes.

[00245] A Publicação PCT nº WO 2014/055771 atribuída à University of Pennsylvania [Universidade da Pensilvânia] descreve composições e métodos para tratamento de câncer ovariano. Especificamente, a invenção refere-se à administração de uma célula-T geneticamente modificada tendo domínio de ligação do receptor alfa-folato (FR-alfa) e domínio coestimulatório CD27 para tratar câncer ovariano. Em uma modalidade, é dito que o domínio de ligação do FR-alfa é completamente humano, prevenindo, com isso, uma resposta imune do hospedeiro.

[00246] Em algumas modalidades, os CARs da invenção podem ser modificados para tumores-alvo. Tais CARs podem ter especificidade por um ou mais TACAs. Em alguns casos, ectodomínios destes CARs podem compreender uma ou mais domínios variáveis de anticorpo aqui apresentados ou um fragmento dos mesmos. Em algumas modalidades, os CARs da invenção são expressados em células-T, aqui referidas como “células-T modificadas com CAR” ou “CAR-Ts”. As CAR-Ts podem ser modificadas com ectodomínios CAR tendo um ou mais domínios variáveis de anticorpo aqui apresentados.

Anticorpos multiespecíficos

[00247] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ligar-se a mais que um epítopo. Como aqui usados, os termos “multicorpo” ou “anticorpo multiespecífico” referem-se a um anticorpo em que duas ou mais regiões variáveis ligam-se a epítopos diferentes. Os epítopos podem estar no mesmo alvo ou em alvos diferentes. Em determinadas modalidades, um anticorpo multiespecífico é um “anticorpo biespecífico”, que reconhece dois epítopos diferentes no mesmo antígeno ou em antígenos diferentes.

Anticorpos biespecíficos

[00248] Os anticorpos biespecíficos são capazes de se ligarem a dois antígenos diferentes. Tais anticorpos tipicamente compreendem duas regiões

de ligação ao antígeno provenientes de dois anticorpos diferentes. Por exemplo, um anticorpo monoclonal biespecífico (BsMAb, BsAb, *Bispecific Monoclonal Antibody*) é uma proteína artificial composta de fragmentos de dois anticorpos monoclonais diferentes, permitindo, assim, que o BsAb ligue-se a dois tipos diferentes de antígeno. Uma aplicação comum para esta tecnologia é em imunoterapia de câncer, onde os BsMAbs são modificados para simultaneamente se ligarem a uma célula citotóxica (usando um receptor como CD3) e um alvo como uma célula tumoral a ser destruída.

[00249] Os anticorpos biespecíficos podem incluir qualquer um daqueles descritos em Riethmuller, G., 2012. *Cancer Immunity*. 12:12-18; Marvin, J.S. *et al.*, 2005. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26(6):649-58; e Schaefer, W. *et al.*, 2011. *PNAS*. 108(27): 11187-92, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00250] Têm sido desenvolvidas novas gerações de BsMAb, chamados de “anticorpos biespecíficos trifuncionais”. Estes consistem em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, cada uma de dois anticorpos diferentes, onde as duas regiões (os braços) Fab são direcionadas contra dois antígenos, e a região Fc (o pé) compreende as duas cadeias pesadas e forma o terceiro sítio de ligação.

[00251] Dos dois parátomos que formam os topos dos domínios variáveis de um anticorpo biespecífico, um pode ser direcionado contra um antígeno-alvo e o outro contra um antígeno de linfócito-T como CD3. No caso de anticorpos trifuncionais, a região Fc pode adicionalmente se ligar a uma célula que expressa receptores Fc, como um macrófago, uma célula assassina natural (NK, *Natural Killer*) ou uma célula dendrítica. Em resumo, a célula-alvo é conectada a uma ou duas células do sistema imune, que subsequentemente a destrói.

[00252] Outros tipos de anticorpos biespecíficos têm sido desenhados para suplantarem determinados problemas, como meia-vida curta,

imunogenicidade e efeitos colaterais causados pela liberação de citocinas. Incluem Fabs quimicamente ligados, consistindo apenas nas regiões Fab, e vários tipos de fragmentos variáveis de cadeia única (scFvs, *single-chain variable fragments*) bivalentes e trivalentes, proteínas de fusão que imitam os domínios variáveis de dois anticorpos. O desenvolvimento mais avançado destes novos formatos são engajadores biespecíficos de células-T (BiTEs, *bispecific T-cell engagers*) e mAb2's, os anticorpos modificados para conter um fragmento de ligação ao antígeno Fcab ao invés da região constante de Fc.

[00253] Um fragmento Fv de anticorpo de cadeia única, biespecífico (Bs-scFv, *Bispecific, single-chain antibody Fv fragment*) foi usado com sucesso para matar células cancerosas. Alguns cânceres humanos são causados por defeitos funcionais em p53 que são restaurados por terapia gênica com p53 de tipo selvagem. Weisbart, *et al.*, descrevem a construção e a expressão de um anticorpo de cadeia única biespecífico penetrante em células de câncer de cólon vivas, liga-se a p53 intracelular, e reconhece e restaura sua função de tipo selvagem (Weisbart, *et al.*, *Int. J. Oncol.* 2004 Oct;25(4):1113-8; e Weisbart, *et al.*, *Int. J. Oncol.* 2004 Dec;25(6): 1867-73). Nestes estudos, um fragmento Fv de anticorpo de cadeia única, biespecífico (Bs-scFv) foi construído a partir de (i) um fragmento Fv de cadeia única de mAb 3E10 penetrante em células vivas e posiciona-se dentro do núcleo, e (ii) um fragmento Fv de cadeia única de um anticorpo não penetrante, mAb PAb421 que se liga à terminação-C de p53. A ligação de PAb421 restaura as funções de tipo selvagem de alguns mutantes de p53, incluindo aqueles de células de câncer de cólon humano SW480. O Bs-scFv penetrou as células SW480 e foi citotóxico, sugerindo uma capacidade para restaurar a atividade do p53 mutante. Células COS-7 (células renais de macaco com p53 de tipo selvagem) serviram como um controle porque são não responsivas ao PAb421 devido à presença de antígeno T grande de SV40 que inibe a ligação de PAb421 a p53. Bs-scFv penetrou células COS-7 mas não foi citotóxico,

eliminando, com isso, a toxicidade não específica de Bs-scFv não relacionado à ligação de p53. Os fragmentos Fv sozinhos não foram citotóxicos, indicando que a matança foi devido à transdução de p53. Uma mutação única de CDR1 de PAb421 VH eliminou a ligação Bs-scFv a p53 e ab-rogou a citotoxicidade para células SW480 sem alterar a penetração celular, confirmando, adicionalmente, o requisito de ligação de PAb421 a p53 para citotoxicidade (Weisbart, *et al.*, *Int. J. Oncol.* 2004 Oct; 25(4):1113- 8; e Weisbart, *et al.*, *Int. J. Oncol.* 2004 Dec; 25(6): 1867-73).

[00254] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser diacorpos. Os diacorpos são anticorpos de cadeia única biespecíficos (bscAb, *Bispecific single-chain Antibody*) funcionais. Estas moléculas bivalentes de ligação ao antígeno são compostas de dímeros não covalentes de scFvs, e podem ser produzidas em células de mamíferos usando métodos recombinantes. (Consulte, *e.g.*, Mack *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 7021-7025, 1995). Novos diacorpos têm entrado em desenvolvimento clínico. Uma versão de diacorpo marcado com iodo-123 do anticorpo quimérico cT84.66 anti-CEA tem sido avaliada para detecção imunocintilográfica pré-cirúrgica de câncer colorretal em um estudo financiado pelo Beckman Research Institute do City of Hope (Clinicaltrials.gov NCT00647153) (Nelson, A. L. *MAbs*: 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[00255] Com o uso de genética molecular, dois scFvs podem ser modificados em tandem em um polipeptídeo único, separados por um domínio conector, chamado de um “scFv em tandem” (tascFv). Tem sido descoberto que os tascFvs são muito pouco solúveis e exigem reenovelamento quando produzidos em bactérias, ou podem ser fabricados em sistemas celulares de mamíferos, o que evita os requisitos de reenovelamento mas pode resultar em rendimentos muito baixos. A construção de um tascFv com genes para dois scFvs diferentes produz “fragmentos variáveis de cadeia única

biespecíficos” (bis-scFvs, *bispecific single-chain variable fragments*). Apenas dois tascFvs têm sido clinicamente desenvolvidos para fins comerciais; ambos são agentes biespecíficos em desenvolvimento de fase inicial ativa pela Micromet para indicações oncológicas, e são descritos como “Engajadores biespecíficos de células-T” (BiTE, *Bispecific T-cell Engagers*). Blinatumomabe é um tascFv biespecífico anti-CD19/anti-CD3 que potencializa as respostas de células-T ao linfoma de não Hodgkin de células-B em Fase 2. MT110 é um tascFv biespecífico anti-EP-CAM/anti-CD3 que potencializa as respostas de células-T aos tumores sólidos em Fase 1. “TandAbs” tetravalentes, biespecíficos, estão também sendo pesquisados por Affimed (Nelson, A. L., *MAbs*.2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[00256] Também são incluídos os maxicorpos (scFV bivalente fusionado na terminação amino do Fc (domínios CH2-CH3) de IgG.

[00257] Os anticorpos engajadores biespecíficos de células-T (BiTE) são desenhados para transientemente engajarem células-T citotóxicas para lise de células-alvo selecionadas. Estes tipicamente incluem dois scFvs (um ligando-se ao CD3 sobre células-T e um ligando-se a um antígeno-alvo sobre a superfície de uma célula que é reconhecida para destruição). Em algumas modalidades, os dois scFvs são unidos por um conector. Em outras modalidades, os dois scFvs são regiões diferentes em um anticorpo. A atividade clínica de anticorpos BiTE corrobora as descobertas de que células-T autólogas, expandidas *ex vivo* derivadas de tecido tumoral, ou transfectadas com receptores específicos de célula-T, têm mostrado potencial terapêutico no tratamento de tumores sólidos. Embora estas abordagens personalizadas provem que as células-T sozinhas podem ter atividade terapêutica considerável, mesmo em câncer de estágio tardio, são inconvenientes para realizar uma base ampla. Isto é diferente para os anticorpos anti-antígeno linfocitário-T citotóxico 4 (CTLA-4, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), que facilitam a geração de clones de células-T específicos para tumores, e também

de anticorpos biespecíficos e triespecíficos que diretamente engajam uma grande proporção de células-T de pacientes para lise de células cancerosas. O potencial de engajamento global de células-T para terapia de cânceres humanos por anticorpos engajadores de células-T está sob investigação ativa (Baeuerle PA, *et al.*, *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 2009, 11(1):22-30 e Baeuerle PA e Reinhardt C, *Cancer Res*. 2009, 69(12): 4941-4, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00258] Moléculas de terceira geração incluem anticorpos “miniaturizados”. Dentre os melhores exemplos de miniaturização de mAb são os imunofármacos modulares pequenos (SMIPs, *Small Modular Immunopharmaceuticals*) da Trubion Pharmaceuticals. Estas moléculas, que podem ser monovalentes ou bivalentes, são moléculas de cadeia única recombinantes contendo um domínio de ligação ao antígeno VL, um domínio de ligação ao antígeno VH, e um ou domínios “efetores” constantes, todos conectados por domínios conectores. Presumivelmente, uma tal molécula poderia oferecer as vantagens de penetração aumentada em tecido ou em tumor reivindicada pelos fragmentos enquanto que retém as funções efectoras imunes conferidas pelos domínios constantes. Pelo menos três SMIPs “miniaturizados” têm entrado em desenvolvimento clínico. TRU-015, um SMIP anti-CD20 desenvolvido em colaboração com a Wyeth, é o projeto mais avançado, tendo progredido para a Fase 2 para artrite reumatoide (AR). Tentativas iniciais em lúpus eritematoso sistêmico (LES) e linfomas de células-B foram enfim descontinuadas. Trubion e Facet Biotechnology estão colaborando no desenvolvimento de TRU-016, um SMIP anti-CD37, para o tratamento de CLL e outras neoplasias linfoides, um projeto que tem alcançado para a Fase 2. Wyeth tem licenciado o SMIP SBI-087 anti-CD20 para o tratamento de doenças autoimunes, incluindo AR, LES, e possivelmente esclerose múltipla, embora estes projetos permaneçam nos

estágios iniciais de teste clínico. (Nelson, A. L., *MAbs*. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[00259] Genmab está pesquisando a aplicação de sua tecnologia “Unibody” (Unicorpo), na qual a região de dobradiça tem sido removida das moléculas de IgG4. Embora as moléculas de IgG4 sejam instáveis e possam trocar entre si heterodímeros de cadeias leves e pesadas, a deleção da região de dobradiça previne completamente o pareamento de cadeia pesada - cadeia pesada, deixando heterodímeros de cadeia leve/pesada monovalentes elevadamente específicos, enquanto que retém a região Fc para garantir a estabilidade e a meia-vida prolongada *in vivo*. Esta configuração pode minimizar o risco para ativação imune ou crescimento oncogênico, porque a IgG4 interage fracamente com FcRs e *unibodies* (unicorpos) monovalentes falham em promover a formação de complexo de sinalização intracelular. Estas argumentações são, contudo, predominantemente comprovadas por evidência laboratorial, ao invés de evidência clínica. Biotechnol também está desenvolvendo um mAb “miniaturizado”, CAB051, que é um anticorpo “compactado” de 100 kDa anti-HER2 em pesquisa pré-clínica (Nelson, A. L., *MAbs*. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[00260] Agentes terapêuticos recombinantes compostos de domínios de ligação a antígeno único também têm sido desenvolvidos, embora atualmente totalizem apenas 4% do *pipeline* clínico. Estas moléculas são extremamente pequenas, com pesos moleculares aproximadamente de um décimo daqueles observados nos mAbs de tamanho completo. Arana e Domantis modificam moléculas compostas de domínios de ligação ao antígeno de cadeias leves ou pesadas de imunoglobulina humana, embora apenas Arana tenha uma candidata em teste clínico, ART-621, uma molécula anti-TNF α em estudo de Fase 2 para o tratamento de psoríase e de artrite reumatoide. Ablynx produz “nanocorpos” derivados de regiões variáveis das cadeias pesadas de ligação ao antígeno (V_{HHS}) de anticorpos de cadeia pesada

encontrados em camelos e lhamas, que não têm cadeias leves. Dois anticorpos anti-Fator-de-von-Willebrand da Ablynx têm avançado para o desenvolvimento clínico, incluindo ALX-0081, em desenvolvimento de Fase 2, como uma terapia intravenosa para prevenir trombose em pacientes submetendo-se à intervenção coronariana percutânea para síndrome coronariana aguda, e ALX-0681, uma molécula de Fase 1 para administração subcutânea pretendida para ambos os pacientes com síndrome coronariana aguda e púrpura trombocitopênica trombótica (Nelson, A. L., *MAbs*. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

Desenvolvimento de anticorpos multiespecíficos

[00261] Em algumas modalidades, sequências de anticorpo da invenção podem ser usadas para desenvolvimento de anticorpos multiespecíficos (*e.g.*, biespecíficos, triespecíficos, ou de multiespecificidade maior). Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para epítomos diferentes de um antígeno-alvo da presente invenção, ou podem ser específicos para ambos um antígeno-alvo da presente invenção, e um epítopo heterólogo, como uma glicana heteróloga, um peptídeo heterólogo ou material de suporte heterólogo. (Consulte, *e.g.*, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, A. *et al.*, “Trispecific F(ab)₃ derivatives that use cooperative signaling por meio de the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells”. *J. Immunol.* 1991 Jul 1; 147(1):60-9; Patentes U.S. nº 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; e Kostelny, S.A. *et al.*, “Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers”. *J. Immunol.* 1992 Mar 1; 148(5): 1547-53); Patente U.S. nº 5.932.448).

[00262] São reveladas e reivindicadas na Publicação PCT nº WO2014144573 do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, tecnologias de multimerização para a preparação de agentes de ligação multiespecíficos diméricos (*e.g.*, proteínas de fusão compreendendo componentes de

anticorpo) com propriedades melhoradas em comparação com agentes de ligação multiespecíficos sem a capacidade de dimerização.

[00263] São revelados e reivindicados na Publicação PCT nº WO2014144357 da Merck Patent GMBH, anticorpos tetravalentes biespecíficos (TetBiAbs, *Tetravalent Bispecific Antibodies*), e métodos de preparação e métodos de uso de TetBiAbs para diagnóstico e tratamento de câncer e distúrbios imunes. TetBiAbs caracterizam-se por um segundo par de fragmentos Fab com uma segunda especificidade para antígeno ligado à terminação-C de um anticorpo, provendo, assim, uma molécula que é bivalente para cada uma das duas especificidades para antígeno. O anticorpo tetravalente é produzido por métodos de modificação genética, pela ligação de uma cadeia pesada de anticorpo covalentemente a uma cadeia leve de Fab, que se associa com sua cadeia pesada de Fab coexpressada, cognata.

[00264] São revelados e reivindicados na Publicação PCT nº WO2014028560 da IBC Pharmaceuticals, Inc., anticorpos biespecíficos (bsAb, *Bispecific Antibodies*) com redirecionamento de células-T, com pelo menos um sítio de ligação para um antígeno de célula-T e pelo menos um sítio de ligação para um antígeno sobre uma célula doente ou um patógeno, para tratamento de doença. Preferivelmente, este bsAb é um anticorpo biespecífico anti-CD3 x anti-CD19, embora anticorpos contra outros antígenos de célula-T e/ou antígenos associados com doenças possam ser usados. O complexo é capaz de reconhecer células-T efectoras para induzir citotoxicidade mediada por célula-T de células associadas com uma doença, como câncer, doença autoimune ou doença infecciosa. A resposta imune citotóxica é intensificada pela coadministração de agentes com base em interferon que compreendem interferon- α , interferon- β ; interferon- λ 1, interferon- λ 2 ou interferon- λ 3.

[00265] São revelados e reivindicados na Publicação PCT nº WO2013092001 da Synimmune GMBH, uma molécula de anticorpo

biespecífico, e também um método para produção da mesma, seu uso e uma molécula de ácido nucleico codificante da molécula de anticorpo biespecífico. Em particular é provida uma molécula de anticorpo que é capaz de mediar ativação de células imunes restrita à célula-alvo.

[00266] É revelado e reivindicado na Publicação PCT nº WO2012007167, um anticorpo modular multiespecífico que especificamente se liga a pelo menos um glicopéptido e um receptor da classe erbB sobre a superfície de uma célula tumoral, ligando cruzadamente, assim, o glicopéptido e o receptor, cujo anticorpo tem atividade apoptótica que realiza citólise independente de células NK.

[00267] São revelados e reivindicados nas Publicações PCT nºs WO2012048332 e WO2013055404, *meditopes*, anticorpos ligantes de *meditope*, sistemas de distribuição de *meditope*, e também uma interface de ligação *framework* de anticorpo monoclonal para *meditope*, e métodos para uso deles. Especificamente, foi mostrado que dois peptídeos de ligação ao anticorpo, C-QFDLSTRRLK-C (“cQFD”; número de identificação de sequência 1 do mesmo; SEQ ID NO: 17 aqui) e C-QYNLSSRALK-C (“cQYN”; número de identificação de sequência 2 do mesmo; SEQ ID NO: 18 aqui) têm novas propriedades de ligação ao mAb. Também chamados de “*meditopes*”, foi mostrado que cQFD e cQYN ligam-se a uma região do *framework* de Fab do mAb cetuximabe anti-EGFR e não se ligam às regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que se ligam ao antígeno. A região de ligação no *framework* de Fab é diferente dos outros antígenos ligantes a *framework*, como os superantígenos proteína-A estafilocócica (SpA, *Staphylococcal protein A*) (Graille *et al.*, 2000) e proteína-L de *Peptostreptococcus magnus* (PpL, *Peptostreptococcus magnus protein L*) (Graille *et al.*, 2001). Consequentemente, uma modalidade revelada é uma interface de ligação *framework* de um anticorpo murino-humano singular compreendendo uma região *framework* de um anticorpo murino-humano

singular ou fragmento funcional do mesmo que se liga a um *meditope* cíclico.

[00268] Patentes e publicações de patente exemplificadoras de interesse são: Patentes U.S. nºs 5.585.089; 5.693.761; e 5.693.762, todas depositadas em 7 de Junho de 1995, e Patente U.S. nº 6.180.370, todas atribuídas à Protein Design Labs, Inc., descrevem métodos para produção de, e composições de, imunoglobulinas humanizadas tendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDR's) e possíveis aminoácidos adicionais de uma imunoglobulina doadora e uma região *framework* de uma imunoglobulina humana aceptora. É dito que cada cadeia de imunoglobulina humanizada habitualmente compreende, além das CDR's, aminoácidos da região *framework* da imunoglobulina doadora que são, *e.g.*, capazes de interagirem com as CDRs para efetuar afinidade de ligação, como um ou mais aminoácidos que estão imediatamente adjacentes a uma CDR na imunoglobulina doadora ou aqueles dentro de cerca de 3 nm (3 Å) como predito por modelagem molecular. As cadeias pesadas e leves podem, cada uma, ser desenhadas pelo uso de qualquer um dos ou todos os critérios de posição. Quando combinadas em um anticorpo intacto, é dito que as imunoglobulinas humanizadas da presente invenção são substancialmente não imunogênicas em humanos e mantêm substancialmente a mesma afinidade para o antígeno que a afinidade da imunoglobulina doadora, como uma proteína ou outro composto contendo um epítipo.

[00269] A Patente U.S. nº 5.951.983, atribuída às Universite Catholique De Louvain e Bio Transplant, Inc., descreve um anticorpo humanizado contra linfócitos-T. São descritas na mesma as regiões *framework* de um gene V *kappa* humano designado como HUM5400 (número de acesso ao EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) de X55400) do clone de anticorpo humano Amu 5-3 (número de acesso ao GenBank de U00562).

[00270] A Patente U.S. nº 5.091.513, da Creative Biomolecules, Inc.,

descreve uma família de proteínas sintéticas tendo afinidade por um antígeno pré-selecionado. As proteínas são caracterizadas por uma ou mais sequências de aminoácidos constituindo uma região que se comporta como um sítio de ligação de anticorpo biossintético (BABS, *Biosynthetic Antibody Binding Site*). Os sítios compreendem 1) dímeros sintéticos de VH e VL não covalentemente associados ou ligados por dissulfeto, 2) cadeias únicas VH-VL ou VL-VH em que VH e VL são conectadas por um conector polipeptídico, ou 3) domínios VH ou VL individuais. Os domínios de ligação compreendem regiões *framework* e CDR ligadas, que podem ser derivadas de imunoglobulinas separadas. As proteínas podem também incluir outras sequências de polipeptídeos que funcionam, *e.g.*, como uma enzima, uma toxina, um sítio de ligação, ou sítio de ligação a um meio de imobilização ou a um átomo radioativo. São revelados métodos para produção das proteínas, para desenho de BABS tendo qualquer especificidade que pode ser induzida por geração *in vivo* de anticorpo, e para produção de análogos do mesmo.

[00271] A Patente U.S. nº 8.399.625, da ESBATech, uma Alcon Biomedical Research Unit, LLC, descreve *frameworks* aceptores de anticorpo e métodos para transplante de anticorpos não humanos, *e.g.*, anticorpos de coelho, usando um *framework* acceptor de anticorpo particularmente bem apropriado.

Intracorporos

[00272] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser intracorporos. Os intracorporos são uma forma de anticorpo que não é secretada de uma célula na qual ela é produzida, mas, ao contrário, reconhece uma ou mais proteínas intracelulares. Os intracorporos são expressados e funcionam intracelularmente, e podem ser usados para realizar uma multiplicidade de processos celulares incluindo, mas não limitados a, tráfego intracelular, transcrição, tradução, processos metabólicos, sinalização proliferativa e divisão celular. Em algumas modalidades, os métodos aqui

descritos incluem terapias com base em intracorporos. Em algumas tais modalidades, sequências de domínio variável e/ou sequências de CDR aqui reveladas são incorporadas em um ou mais constructos para terapia com base em intracorporos. Por exemplo, os intracorporos podem reconhecer uma ou mais proteínas intracelulares glicadas ou podem modular a interação entre uma ou mais proteínas intracelulares glicadas e uma proteína alternativa.

[00273] Há mais de duas décadas, anticorpos intracelulares contra alvos intracelulares foram primeiro descritos (Biocca, Neuberger e Cattaneo *EMBO J.* 9: 101-108, 1990). A expressão intracelular de intracorporos em compartimentos diferentes de células de mamíferos mostra bloqueio ou modulação da função de moléculas endógenas (Biocca, *et al.*, *EMBO J.* 9: 101-108, 1990; Colby *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 17616-21, 2004). Os intracorporos podem alterar o enovelamento de proteína, as interações de proteína-proteína, de proteína-DNA, de proteína-RNA e a modificação de proteína. Podem induzir um nocaute fenotípico e funcionar como agentes neutralizadores pela ligação direta ao antígeno-alvo, pelo desvio de seu tráfego intracelular ou pela inibição de sua associação com parceiros de ligação. Têm sido predominantemente utilizados como ferramentas de pesquisa e são emergentes como moléculas terapêuticas para o tratamento de doenças humanas como patologias virais, câncer e doenças de enovelamento incorreto [de proteínas]. O biocomércio rapidamente crescente dos anticorpos recombinantes provê intracorporos com especificidade de ligação, estabilidade e solubilidade intensificadas, juntamente com imunogenicidade mais baixa, para uso deles em terapia (Biocca, *Abstract in Antibody Expression and Production Cell Engineering*, Volume 7, 2011, pp. 179-195).

[00274] Em algumas modalidades, os intracorporos têm vantagens sobre o RNA interferente (iRNA, *interfering RNA*); por exemplo, tem sido mostrado que o iRNA exerce múltiplos efeitos não específicos, enquanto que tem sido

mostrado que os intracorporos têm altas especificidade e afinidade por antígenos-alvo. Ademais, como proteínas, os intracorporos possuem uma meia-vida ativa muito mais longa do que o iRNA. Por conseguinte, quando a meia-vida ativa da molécula-alvo intracelular é longa, o silenciamento gênico mediante o iRNA pode ser lento para produzir um efeito, enquanto que os efeitos da expressão de intracorporo podem ser quase instantâneos. Por fim, é possível desenhar intracorporos para bloquear determinadas interações de ligação de uma molécula-alvo específica, enquanto que se poupam outras.

Desenvolvimento de intracorporos

[00275] Os intracorporos são, com frequência, fragmentos variáveis de cadeia única (scFvs, *single chain variable fragments*) expressados a partir de uma molécula de ácido nucleico recombinante e modificados para serem retidos intracelularmente (*e.g.*, retidos no citoplasma, no retículo endoplasmático, ou no periplasma). Os intracorporos podem ser usados, por exemplo, para remover a função de uma proteína à qual o intracorporo se liga. A expressão de intracorporos pode também ser regulada mediante o uso de promotores induzíveis no vetor de expressão de ácido nucleico compreendendo o intracorporo. Os intracorporos podem ser produzidos usando métodos conhecidos na técnica, como aqueles revelados e revistos em: (Marasco *et al.*, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893; Chen *et al.*, 1994, *Hum. Gene Ther.* 5:595-601; Chen *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5932-5936; Maciejewski *et al.*, 1995, *Nature Med.*, 1: 667-673; Marasco, 1995, *Immunotech.*, 1: 1-19; Mhashilkar, *et al.*, 1995, *EMBO J.* 14: 1542- 51; Chen *et al.*, 1996, *Hum. Gene Therap.*, 7: 1515-1525; Marasco, *Gene Ther.* 4:11-15, 1997; Rondon e Marasco, 1997, *Annu. Rev. Microbiol.* 51:257-283; Cohen, *et al.*, 1998, *Oncogene* 17:2445-56; Proba *et al.*, 1998, *J. Mol. Biol.* 275:245-253; Cohen *et al.*, 1998, *Oncogene* 17:2445-2456; Hassanzadeh, *et al.*, 1998, *FEBS Lett.* 437:81-6; Richardson *et al.*, 1998, *Gene Ther.* 5:635-44; Ohage e Steipe, 1999, *J. Mol. Biol.* 291:1119-1128;

Ohage *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* 291:1129-1134; Wirtz e Steipe, 1999, *Protein Sci.* 8:2245-2250; Zhu *et al.*, 1999, *J. Immunol. Methods* 231:207-222; Arafat *et al.*, 2000, *Cancer Gene Ther.* 7:1250-6; der Maur *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277:45075-85; Mhashilkar *et al.*, 2002, *Gene Ther.* 9:307-19; e Wheeler *et al.*, 2003, *FASEB J.* 17: 1733-5; e as referências citadas nas mesmas). Em particular, um intracampo CCR5 tem sido produzido por Steinberger *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:805-810). Consulte, em geral, Marasco, WA, 1998, “Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications” Springer:New York; e para uma revisão de scFvs, consulte “The Pharmacology of Monoclonal Antibodies”, 1994, vol. 113, Rosenberg e Moore *eds.* Springer-Verlag, New York, pp. 269-315.

[00276] Em algumas modalidades, sequências de anticorpo são usadas para desenvolver intracorpos. Os intracorpos são, com frequência, recombinantemente expressados como fragmentos de domínio único como domínios VH e VL isolados ou como um anticorpo de fragmento variável de cadeia única (scFv, *single chain variable fragment*) dentro da célula. Por exemplo, os intracorpos são, com frequência, expressados como um polipeptídeo único para formar um anticorpo de cadeia única compreendendo os domínios variáveis das cadeias pesada e leve unidos por um polipeptídeo conector flexível. Os intracorpos tipicamente não têm ligações dissulfeto e são capazes de modular a expressão ou a atividade de genes-alvo mediante a atividade de ligação específica deles. Os anticorpos de domínio único podem também ser expressados como um fragmento de região variável de cadeia única unido à região constante da cadeia leve.

[00277] Como é conhecido na técnica, um intracampo pode ser modificado em vetores de polinucleotídeos recombinantes para codificar sinais de tráfego subcelular em sua terminação-N ou -C para permitir a expressão em altas concentrações nos compartimentos subcelulares onde uma proteína-alvo está localizada. Por exemplo, os intracorpos direcionados para o

retículo endoplasmático (RE) são modificados para incorporarem um peptídeo líder e, opcionalmente, um sinal de retenção C-terminal em retículo endoplasmático (RE), como o motivo de aminoácidos KDEL (SEQ ID NO: 23). Os intracorporos pretendidos para exercerem atividade no núcleo são modificados para incluírem um sinal de localização nuclear. Porções lipídicas são unidas aos intracorporos com o propósito de ancorar o intracorporo no lado citosólico da membrana plasmática. Os intracorporos podem também ser direcionados para exercerem função no citosol. Por exemplo, intracorporos citosólicos são usados para sequestrar fatores dentro do citosol, prevenindo, com isso, que eles sejam transportados para a destinação celular natural deles.

[00278] Há determinados desafios técnicos com a expressão de intracorporos. Em particular, o enovelamento conformacional e a estabilidade estrutural de proteína do intracorporo recém-sintetizado dentro da célula são afetados pelas condições redutoras do ambiente intracelular. Em terapia clínica humana, há preocupações de segurança quanto à aplicação de DNA recombinante transfectado, que é usado para realizar a expressão de intracorporo dentro da célula. Vários vetores virais comumente usados em manipulação genética são particularmente preocupantes. Por conseguinte, uma abordagem para evitar estes problemas é fusionar os domínios de transdução de proteína (PTDs, *Protein Transduction Domains*) em anticorpos scFv, para criar um anticorpo ‘que permeia célula’ ou ‘Transcorporo’. Os Transcorporos são anticorpos que permeiam célula em que um domínio de transdução de proteína (PTD) é fusionado com anticorpos de fragmento variável de cadeia única (scFv) (Heng e Cao, 2005, *Med. Hypotheses*. 64:1105-8).

[00279] Após interação com um gene-alvo, um intracorporo modula a função da proteína-alvo e/ou realiza nocaute fenotípico/funcional por mecanismos como aceleração de degradação de proteína-alvo e sequestro da proteína-alvo em um compartimento subcelular não fisiológico. Outros

mecanismos de inativação gênica mediada por intracampo podem depender do epítipo para o qual o intracampo é direcionado, como ligação ao sítio catalítico em uma proteína-alvo ou aos epítipos que estão envolvidos em interações de proteína-proteína, de proteína-DNA, ou de proteína-RNA.

[00280] Em uma modalidade, os intracampos são usados para capturar um alvo no núcleo, prevenindo, com isso, sua atividade dentro do núcleo. Sinais de direcionamento nuclear são modificados em tais intracampos com o propósito realizar o direcionamento desejado. Tais intracampos são desenhados para se ligarem especificamente a um domínio-alvo específico. Em outra modalidade, os intracampos citosólicos que especificamente se ligam a uma proteína-alvos são usados para prevenir que o alvo tenha acesso ao núcleo, prevenindo, com isso, que ele exerça qualquer atividade biológica dentro do núcleo (*e.g.*, prevenindo que o alvo forme complexos de transcrição com outros fatores).

[00281] Com o propósito de especificamente direcionar a expressão de tais intracampos para células específicas, a transcrição do intracampo é posta sob o controle regulatório de um intensificador e/ou promotor tumor-específico apropriado. Com o propósito de direcionar a expressão de anticampo especificamente para a próstata, por exemplo, o promotor e/ou intensificador PSA pode ser utilizado (consulte, por exemplo, Patente U.S. nº 5.919.652 publicada em 6 de Julho de 1999).

[00282] Os domínios de transdução de proteína (PTDs) são sequências de peptídeo curtas que permitem que as proteínas atravessem a membrana celular e sejam internalizadas dentro do citosol, mediante vias de internalização e secretórias atípicas. Há numerosas vantagens diferentes que um 'Transcampo' poderia possuir sobre os intracampos convencionais expressados dentro da célula. Em primeiro lugar, o enovelamento conformacional 'correto' e a formação de ligação dissulfeto podem ocorrer antes da introdução para dentro da célula-alvo. Com mais importância, o uso

de anticorpos que permeiam célula ou ‘Transcorpos’ evitaria as opressivas preocupações éticas e de segurança que envolvem a aplicação de tecnologia de DNA recombinante em terapia clínica humana, que é requerida para expressão de intracampo dentro da células. Os ‘Transcorpos’ introduzidos na célula possuiriam apenas uma meia-vida ativa limitada, sem resultar em nenhuma alteração genética permanente. Isto diminuiria quaisquer preocupações de segurança com respeito à aplicação deles em terapia clínica humana (Heng e Cao 2005, *Med. Hypotheses*. 64:1105-8).

[00283] Os intracampo são agentes terapêuticos promissores para o tratamento de doenças de enovelamento incorreto [de proteínas], incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e doença de príon, por causa da capacidade virtualmente infinita deles para especificamente reconhecerem as diferentes conformações de uma proteína, incluindo isoformas patológicas, e porque eles podem ser direcionados para sítios de agregação potenciais (ambos sítios intracelulares e extracelulares). Estas moléculas podem funcionar como agentes neutralizadores contra proteínas amiloidogênicas pela prevenção da agregação delas, e/ou como desviadores moleculares de tráfego intracelular pelo redirecionamento da proteína a partir de seu sítio de agregação potencial (Cardinale, e Biocca, *Curr. Mol. Med.* 2008, 8:2-11).

[00284] Publicações de Patente exemplificadoras que descrevem anticorpos intracelulares ou intracampo são apresentadas aqui abaixo, cada uma das quais é incorporada em sua totalidade como referência.

[00285] A Publicação PCT nº WO03014960 e a Patente U.S. nº 7.608.453 concedidas a Cattaneo, *et al.*, descrevem um método de tecnologia de captura de anticorpo intracelular de identificação de pelo menos uma sequência consenso de um anticorpo intracelular (ICS) compreendendo as etapas de: criar uma base de dados compreendendo sequências de anticorpos intracelulares validados (base de dados VIDA) e alinhar as sequências de

anticorpos intracelulares validados de acordo com Kabat; determinar a frequência com a qual ocorre um aminoácido específico em cada uma das posições dos anticorpos alinhados; selecionar um valor limiar de frequência (LP ou limiar de consenso) na faixa de 70% a 100%; identificar as posições do alinhamento nas quais a frequência de um aminoácido específico é maior que ou igual ao valor LP; e identificar o aminoácido mais frequente, na posição de dito alinhamento.

[00286] As Publicações PCT n°s WO0054057; WO03077945; WO2004046185; WO2004046186; WO2004046187; WO2004046188; WO2004046189; Publicações de Pedidos de Patente n°s US2005272107; US2005276800; US2005288492; US2010143939; Patentes U.S. concedidas n°s 7.569.390 e 7.897.347 e Patentes Europeias concedidas n°s EP1560853; e EP1166121 todas atribuídas ao Medical Research Council e incluindo os inventores Cattaneo, *et al.*, descrevem imunoglobulinas de domínio único intracelular, e um método para determinação da capacidade de um domínio único de imunoglobulina se ligar a um alvo em um ambiente intracelular, e também métodos para geração de anticorpos intracelulares.

[00287] A Publicação PCT n° WO0235237; a Publicação de Patente U.S. n° 2003235850 e a Patente Europeia concedida n° g EP1328814 nomeando Cattaneo como um inventor e atribuídas à S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore descrevem um método para a identificação *in vivo* de epítomos de um antígeno intracelular.

[00288] A Publicação PCT n° WO2004046192 e a Patente Europeia n° EP1565558 atribuídas à Lay Line Genomics SPA e nomeando Cattaneo como um inventor descrevem um método para isolamento de anticorpos intracelulares que interrompem e neutralizam a interação entre um ligante de proteína x e um ligante de proteína y dentro de uma célula. Também são revelados um método para identificar um ligante de proteína x capaz de ligar-se a um ligante y conhecido usando anticorpos intracelulares capazes para a

interação entre x e y; e um método para o isolamento de um conjunto de fragmentos de anticorpo contra uma proporção significativa das interações de proteína-proteína de uma dada célula (interatoma) ou contra as interações de proteínas que constituem uma rede ou por meio de intracelular.

[00289] A Publicação de Pedido de Patente U.S. nº 2006034834 e a Publicação PCT nº WO9914353 intituladas “Intrabody-mediated control of immune reactions” e atribuídas ao Dana Farber Cancer Institute Inc. nomeando os inventores Marasco e Mhashilkar são direcionadas aos métodos de alteração da regulação do sistema imune, *e.g.*, pelo reconhecimento seletivo de molécula de receptor imunomodulatório individual ou de classes de moléculas de receptores imunomodulatórios (IRMs, *Immunomodulatory Receptor Molecules*) sobre células compreendendo transduzir as células com um anticorpo intracelularmente expressado, ou intracorpo, contra as IRMs. Em uma modalidade preferida, o intracorpo compreende um anticorpo de cadeia única contra uma IRM, *e.g.*, moléculas de MHC-1.

[00290] A Publicação PCT nº WO2013033420 atribuída aos Dana Farber Cancer Institute Inc. e Whitehead Biomedical Institute, e nomeando os inventores Bradner, Rahl e Young, descreve métodos e composições úteis para inibição de uma proteína de bromodomínio e um elemento regulatório de imunoglobulina (Ig) e infrarregulação da expressão de um oncogene translocado com um locus de Ig, e também para tratamento de um câncer (*e.g.*, malignidade hematológica) caracterizados pela expressão aumentada de um oncogene que é translocado com um locus de Ig. Intracorpos são em geral descritos.

[00291] A Publicação PCT nº WO02086096 e a Publicação de Pedido de Patente U.S. nº 2003104402 intituladas “Methods of producing or identifying intrabodies in eukaryotic cells”, atribuídas ao University of Rochester Medical Center e nomeando os inventores Zauderer, Wei e Smith, descrevem um método de alta eficiência de expressão de moléculas de

imunoglobulinas intracelulares e de bibliotecas de imunoglobulinas intracelulares em células eucarióticas usando um método de recombinação trimolecular. São adicionalmente fornecidos métodos de seleção e triagem de moléculas de imunoglobulinas intracelulares e fragmentos das mesmas, e kits para produção, triagem e seleção de moléculas de imunoglobulinas intracelulares, e também as moléculas de imunoglobulinas intracelulares e fragmentos produzidos(as) usando estes métodos.

[00292] A Publicação PCT nº WO2013023251 atribuída à Affinity Biosciences PTY LTD e nomeando os inventores Beasley, Niven e Kiefel, descreve polipeptídeos, como moléculas de anticorpos e polinucleotídeos codificantes de tais polipeptídeos, e bibliotecas dos mesmos, em que os polipeptídeos expressados demonstram altas estabilidade e solubilidade. Em particular, são descritos polipeptídeos compreendendo domínios VL e VH pareados que demonstram expressão solúvel e enovelamento em um ambiente redutor ou intracelular, em que uma biblioteca de scFv humano foi triada, resultando no isolamento de genes de scFv solúvel que tem regiões *framework* idênticas à sequência de linhagem germinativa humana e também excelentes termoestabilidade e tolerância de enxerto de CDR3 no arcabouço de scFv.

[00293] O Pedido de Patente Europeia nº EP2314622 e as Publicações PCT nºs WO03008451 e WO03 097697 atribuídos às Esbatech AG e Universidade de Zurique e nomeando os inventores Ewert, Huber, Honneger e Plueckthun, descrevem a modificação de domínios variáveis humanos e proveem composições úteis como *frameworks* para a criação de fragmentos Fv de cadeia única (scFv) de anticorpo muito estáveis e solúveis. Estes *frameworks* têm sido selecionados para desempenho intracelular e são, por conseguinte, idealmente apropriados para a criação de fragmentos scFv de anticorpo ou de bibliotecas de scFv de anticorpo para aplicações onde estabilidade e solubilidade são fatores limitantes para o desempenho de

fragmentos de anticorpo, como no ambiente redutor de uma célula. Tais *frameworks* podem também ser usados para identificar sequências consenso e resíduos elevadamente conservados(as) que demonstram solubilidade e estabilidade intensificadas.

[00294] A Publicação PCT nº WO02067849 e a Publicação de Pedido de Patente U.S. nº 2004047891 intituladas “Systems devices and methods for intrabody targeted delivery and reloading of therapeutic agents”, descrevem sistemas, dispositivos e métodos para distribuição de moléculas direcionada por intracorporos. Mais particularmente, algumas modalidades referem-se ao sistema de distribuição de fármacos recarregável, que permite a distribuição direcionada de agentes terapêuticos para uma região tecidual de um sujeito, em uma maneira localizada e em tempo hábil.

[00295] A Publicação PCT nº WO2005063817 e a Patente U.S. nº US 7.884.054 atribuídas à Amgen Inc. e nomeando os inventores Zhou, Shen e Martin, descrevem métodos para identificação de anticorpos funcionais, incluindo intracorporos. Em particular, é descrito um intracorporo homodimérico, em que cada cadeia de polipeptídeo do homodímero compreende uma região Fc, um scFv, e uma sequência de localização intracelular. A sequência de localização intracelular pode fazer com que o intracorporo esteja localizado no RE (Retículo Endoplasmático) ou no Complexo de Golgi. Opcionalmente, cada cadeia de polipeptídeo compreende não mais que um scFv.

[00296] A Publicação PCT nº WO2013138795 de Vogan, *et al.* e atribuída à Permeon Biologies Inc., descreve composições penetrantes em célula para distribuição de anticorpos intracelulares e porções do tipo anticorpo e métodos para distribuição deles(as) (aqui referidos como “porções AAM” ou “uma porção AAM”) para dentro de uma célula. Sem ater-se à teoria, a presente revelação é com base, pelo menos em parte, na descoberta de que uma porção AAM pode ser distribuída para dentro de uma célula pela complexação da porção AAM com um polipeptídeo penetrante em célula

tendo carga superficial positiva (referido aqui como um “Polipeptídeo Penetrante Surf+”). São também providos exemplos de algumas aplicações da tecnologia Intraphilin™.

[00297] A Publicação PCT nº WO2010004432 atribuída ao Instituto Pasteur, descreve imunoglobulinas de *Camelidae* (camelos, dromedários, lhamas e alpacas), cerca de 50% das quais são anticorpos destituídos de cadeia leve. Estes anticorpos de cadeia pesada interagem com o antígeno devido apenas a um domínio variável único referido como domínio(s) VHH(s), VHH ou anticorpo(s) VHH. Não obstante a ausência de cadeia leve, estes anticorpos homodiméricos apresentam um amplo repertório de ligação ao antígeno pelo aumento das regiões hipervariáveis deles, e podem atuar como um transcorpo e/ou intracorpo *in vitro* e também *in vivo*, quando o domínio VHH é direcionado contra um alvo intracelular.

[00298] A Publicação PCT nº WO2014106639 descreve um método para identificação de um alvo celular envolvido em um fenótipo celular pela identificação de um intracorpo que pode modificar um fenótipo celular e identificar um alvo celular direto ou indireto do intracorpo. Em particular, os intracorpos 3H2-1, 3H2-VH e 5H4 são capazes de inibição da reação de desgranulação em mastócitos disparada por um estímulo alérgico; ademais, os intracorpos 3H2-1 e 5H4 reconheceram direta ou indiretamente uma proteína da família ABCF1 e da família C120RF4, respectivamente. É dito que estes inibidores de ABCF1 e C120RF4 são úteis em terapia, em particular para tratamento de condições alérgicas e/ou inflamatórias.

[00299] A Publicação PCT nº WO0140276 atribuída à Urogenesis Inc., descreve, em geral, a possibilidade de inibição de proteínas STEAP (*Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate*, antígeno epitelial transmembranar de seis passagens da próstata) usando anticorpos intracelulares (intracorpos).

[00300] A Publicação PCT nº WO02086505 atribuída à University of

Manchester [Universidade de Manchester] e a Publicação de Pedido de Patente U.S. nº US2004115740 nomeando os inventores Simon e Benton, descrevem um método para a análise intracelular de uma molécula-alvo, em que é dito que intracópos são preferidos. Em uma modalidade, é descrito um vetor (designado pScFv-ECFP) capaz de expressar um anticorpo anti-MUC1 acoplado com CFP.

[00301] As Publicações PCT nºs WO03095641 e WO0143778 atribuídas à Gene Therapy Systems Inc., descrevem composições e métodos para distribuição de proteína intracelular, e intracópos são em geral descritos.

[00302] A Publicação PCT nº WO03086276 atribuída à Selective Genetics Inc., descreve uma tecnologia de plataforma para o tratamento de infecções intracelulares. Composições e métodos descritos na mesma incluem vetores não-alvo-específicos que reconhecem células infectáveis por meio de ligantes ligados que se ligam e se internalizam mediante receptores/porções de superfície celular associados(as) com infecção. Os vetores compreendem sequências de ácidos nucleicos exógenas que são expressadas após internalização para dentro de uma célula-alvo. Os ligantes e as moléculas de ácidos nucleicos associados(as) com o vetor podem ser alterados(as) para reconhecerem agentes infecciosos diferentes. Além disso, a invenção provê métodos de identificação de epítomos e ligantes capazes de direcionar a internalização de um vetor e capazes de bloquear a entrada viral.

[00303] A Publicação PCT nº WO03062415 atribuída à Universidade Erasmo de Roterdam, descreve um organismo transgênico compreendendo um constructo de polinucleotídeo codificante de um anticorpo intracelular que interrompe a catálise da produção do xenoantígeno galactose α 1,3 galactose e/ou um constructo de polinucleotídeo que codifica um anticorpo intracelular que se liga especificamente a uma proteína retroviral, como uma proteína de partícula PERV. Células, tecidos e órgãos do organismo transgênico podem ser usados em xenotransplantação.

[00304] A Publicação PCT nº WO2004099775 intitulada “Means for detecting protein conformation and applications thereof”, descreve o uso de fragmentos scFv como anticorpos conformação-específicos para especificamente detectar um estado conformacional de proteína, sendo dito que têm aplicações como sensores para seguimento do comportamento de proteínas endógenas em células vivas, após expressão intracelular.

[00305] A Publicação PCT nº WO2008070363 atribuída à Imclone Systems Inc., descreve um intracampo de domínio único que se liga a uma proteína intracelular ou a um domínio intracelular de uma proteína intracelular, como Etk, a tirosina-quinase endotelial e epitelial (*endothelial and epithelial tyrosine kinase*), que é um membro da família Tec de tirosina-quinases não receptoras. Também é provido um método de inibição de uma enzima intracelular, e de tratamento de um tumor em um paciente pela administração do intracampo ou de um ácido nucleico expressor do intracampo.

[00306] A Publicação PCT nº WO2009018438 atribuída à Cornell Research Foundation Inc., descreve um método de identificação de uma proteína que se liga a uma molécula-alvo e tem funcionalidade intracelular, pela provisão de um constructo compreendendo uma molécula de DNA codificante da proteína que se liga à molécula-alvo, com a molécula de DNA estando acoplada com uma sequência de paralisação. Uma célula hospedeira é transformada com o constructo e então cultivada sob condições eficazes para formar, dentro da célula hospedeira, um complexo da proteína cuja tradução tem sido paralisada, o mRNA codificando a proteína, e ribossomos. A proteína no complexo está em uma forma ativa, apropriadamente enovelada e o complexo é recuperado da célula. Este método pode ser realizado com uma preparação de extrato isenta de células contendo ribossomos ao invés de uma célula hospedeira. A presente invenção refere-se, também, a um constructo que inclui uma molécula de DNA codificante de uma proteína que se liga a uma molécula-alvo e uma sequência de paralisação SecM acoplada com a

molécula de DNA. A molécula de DNA e a sequência de paralisação SecM são acopladas com distância suficiente entre elas para permitir a expressão da proteína codificada delas, dentro da célula, em uma forma ativa, apropriadamente enovelada. O uso de intracorporos é em geral descrito.

[00307] A Publicação PCT nº WO2014030780 atribuída ao Mogam Biotech Research Institute, descreve um método chamado de engenharia de proteína Tat-associada (TAPE, *Tat-Associated Protein Engineering*), para triagem de uma proteína-alvo tendo solubilidade mais alta e termoestabilidade excelente, em particular, um domínio variável (VH ou VL) de imunoglobulina derivado de células germinativas humanas, pela preparação de um constructo gênico onde a proteína-alvo e uma proteína resistente a antibiótico são ligadas à sequência sinal Tat, e então expressão disto dentro de *E. coli*. Também são revelados anticorpos de domínios VH e VL humanos ou modificados ou arcabouços de anticorpos de domínios VH e VL humanos ou modificados tendo solubilidade e excelente termoestabilidade, que são triados pelo método TAPE. Também é provida uma biblioteca incluindo sequências de CDR randômicas no arcabouço de anticorpo de domínio VH ou VL humano ou modificado triado pelo método TAPE, um método de preparação da mesma, um anticorpo de domínio VH ou VL tendo capacidade de ligação à proteína-alvo triado pelo uso da biblioteca, e uma composição farmacêutica incluindo o anticorpo de domínio.

[00308] A Publicação de Patente Europeia nº EP2422811 descreve um anticorpo que se liga a um epítipo intracelular; tais intracorporos compreendem pelo menos uma porção de um anticorpo que é capaz de especificamente se ligar a um antígeno e preferivelmente não contém sequências funcionais codificantes para sua secreção e, por conseguinte, permanecem dentro da célula. Em uma modalidade, o intracorpo compreende um scFv. O polipeptídeo scFv compreende, ainda, um conector polipeptídico entre os domínios VH e VL que permite que o scFv forme a estrutura desejada para a

ligação ao antígeno. Também é descrita uma modalidade específica na qual o intracampo liga-se ao domínio citoplasmático de um receptor de Eph (*Ephrin*, Efrina) e previne sua sinalização (*e.g.*, autofosforilação). Em outra modalidade específica, um intracampo liga-se ao domínio citoplasmático de uma Efrina de tipo-B (*e.g.*, Efrina-B1, Efrina-B2 ou Efrina-B3).

[00309] A Publicação PCT nº WO2011003896 e o Pedido de Patente Europeu nº EP2275442 descrevem PCNA-Cromocorpos funcionais intracelulares feitos usando molécula de ácido nucleico codificante de um polipeptídeo que especificamente se liga ao antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Exemplos de tais polipeptídeos compreendendo substituições conservativas de um ou mais aminoácidos em uma ou duas regiões *framework* incluem MANVQLNESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSDISPSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNANKNRLYLQMNSLTPEDT GEYFCTKVQSPRTRIPAPSSQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 19) e MANVQLNESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSEISPSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNANKNRLYLQMNSLTPEDTG EYFCTKVQSPRTRIPAPSSQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 20), incluindo as regiões *framework* dos polipeptídeos. Nos exemplos, têm sido determinadas as regiões *framework* e também as regiões CDR envolvidas na ligação de PCNA.

[00310] O Pedido de Patente Europeu nº EP2703485 descreve um método para seleção de plasmócitos ou plasmoblastos, e também para produção de anticorpos específicos para antígeno-alvo, e novos anticorpos monoclonais. Em uma modalidade, foram identificadas células expressoras de imunoglobulina intracelular.

Agentes revestidos de anticorpo

[00311] Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de anticorpo aqui descritos podem ser usados para preparar uma composição

inclui um agente revestido de anticorpo. Como aqui usado, o termo “agente revestido de anticorpo” refere-se a qualquer partícula, nanopartícula, molécula, proteína, proteína de fusão, lipídio, lipossoma, membrana celular, célula, ou outra estrutura que inclui um ou mais anticorpos ou fragmentos de anticorpo associados com superfície. Os agentes revestidos de anticorpo podem reconhecer um(a) ou mais glicanas, proteínas, células, tecidos, e/ou órgãos com base na especificidade do anticorpo ou dos fragmentos de anticorpo usado(s) para revestimento.

[00312] Os agentes revestidos de anticorpo podem incluir carga associada, encerrada ou embebida. A carga pode ser um marcador detectável. Alguma carga pode incluir um ou mais agentes terapêuticos. Tais agentes terapêuticos podem incluir, mas não são limitados a, fármacos, agentes quimioterapêuticos, e agentes citotóxicos. Os agentes citotóxicos podem ser usados para matar ou diferentemente desativar uma célula. Os agentes citotóxicos podem incluir, mas não são limitados a, inibidores de citoesqueleto [*e.g.*, inibidores da polimerização de tubulina como tansinas ou auristatinas (*e.g.*, monometil-auristatina E [MMAE] e monometil-auristatina F [MMAF], e inibidores de proteínas motoras cinosinas com função específica na formação dos fusos mitóticos e meióticos (KSP)], agentes danificadores de DNA (*e.g.*, caliqueamicinas, duocarmicinas, e dímeros de pirrolobenzodiazepina como talirina e tesirina), inibidores de topoisomerase [*e.g.*, compostos e derivados de camptotecina como 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38) e derivado de exatecano DXd], inibidores de transcrição (*e.g.*, inibidores de RNA-polimerase como amanitina), e inibidores de quinase [*e.g.*, inibidores de fosfoinosítídeo-3-quinase (PI3K ou inibidores de proteína quinase-quinase ativada por mitógeno (MEK)].

[00313] Em algumas modalidades, os agentes revestidos de anticorpo podem incluir nanopartículas revestidas com um ou mais anticorpos ou fragmentos de anticorpo aqui descritos. Tais agentes revestidos de anticorpo

podem reconhecer um a ou mais glicanas, incluindo, mas não limitados às, glicanas associadas com célula. Alguns tais agentes revestidos de anticorpo incluem um ou mais agentes citotóxicos.

Proteínas e Variantes

[00314] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem existir como um polipeptídeo completo, uma pluralidade de polipeptídeos ou fragmentos de polipeptídeos, que independentemente podem ser codificados por um ou mais ácidos nucleicos, uma pluralidade de ácidos nucleicos ou variantes de qualquer um dos supracitados. Como aqui usado, “polipeptídeo” significa um polímero de resíduos de aminoácidos (natural ou não natural) ligados juntos mais frequentemente por ligações peptídicas. O termo, como aqui usado, refere-se aos polipeptídeos, e peptídeos de qualquer tamanho, estrutura, ou função. Em alguns casos o polipeptídeo codificado é menor que cerca de 50 aminoácidos e o polipeptídeo é então chamado de um peptídeo. Se o polipeptídeo é um peptídeo, será de comprimento de pelo menos cerca de 2, 3, 4, ou pelo menos 5 resíduos de aminoácidos. Por conseguinte, os polipeptídeos incluem produtos de gene, polipeptídeos naturalmente ocorrentes, polipeptídeos sintéticos, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos ou outros equivalentes, e análogos dos supracitados. Um polipeptídeo pode ser uma molécula única ou pode ser um complexo multimolecular como um dímero, trímero ou tetrâmero. Podem também incluir polipeptídeos de cadeia única ou de multicadeias e podem estar associados ou ligados. O termo polipeptídeo pode também aplicar-se aos polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um análogo químico artificial de um aminoácido correspondente naturalmente ocorrente.

[00315] O termo “variante de polipeptídeo” refere-se às moléculas cujas sequências de aminoácidos diferem de uma sequência nativa ou referencial. As variantes de sequências de aminoácidos podem possuir

substituições, deleções, e/ou inserções em determinadas posições dentro da sequência de aminoácidos, em comparação com uma sequência nativa ou referencial. Ordinariamente, as variantes possuirão pelo menos cerca de 50% de identidade (homologia) com uma sequência nativa ou referencial, e preferivelmente, serão pelo menos cerca de 80%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% idênticas (homólogas) a uma sequência nativa ou referencial.

[00316] Em algumas modalidades são providos “miméticos variantes”. Como aqui usado, o termo “mimético variante” é um que contém um ou mais aminoácidos que imitariam uma sequência ativada. Por exemplo, glutamato pode servir como um mimético para fosforo-treonina e/ou fosforo-serina. Alternativamente, os miméticos variantes podem resultar em desativação ou em um produto inativado contendo o mimético, *e.g.*, fenilalanina pode atuar como uma substituição inativadora no lugar de tirosina; ou alanina pode atuar como uma substituição inativadora no lugar de serina. As sequências de aminoácidos dos anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem incluir aminoácidos naturalmente ocorrentes e como tais podem ser consideradas como proteínas, peptídeos, polipeptídeos, ou fragmentos dos mesmos. Alternativamente, os anticorpos interagentes com glicanas podem incluir ambos aminoácidos naturalmente e não naturalmente ocorrentes.

[00317] O termo “variante de sequência de aminoácidos” refere-se às moléculas com algumas diferenças nas sequências de aminoácidos delas em comparação com uma sequência nativa ou de partida. As variantes de sequências de aminoácidos podem possuir substituições, deleções, e/ou inserções em determinadas posições dentro da sequência de aminoácidos. A sequência “nativa” ou “de partida” não deve ser confundida com uma sequência de tipo selvagem. Como aqui usada, uma sequência nativa ou de partida é um termo relativo que se refere a uma molécula original contra a qual uma comparação pode ser feita. As moléculas ou sequências “nativas” ou

“de partida” podem representar o tipo selvagem (aquela sequência encontrada na natureza) mas não têm que ser a sequência de tipo selvagem.

[00318] Ordinariamente, as variantes possuirão pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5% pelo menos 99,8%, ou pelo menos 99,9% de identidade de sequência em comparação com uma sequência nativa. “Identidade de sequência”, como se aplica às sequências de aminoácidos ou sequências de nucleotídeos, é definida como a percentagem de resíduos na sequência candidata que são idênticos aos resíduos na segunda sequência após o alinhamento das sequências e considerando-se lacunas e fragmentos, se necessário, para alcançar a máxima identidade de sequência percentual. O cálculo da identidade percentual de duas sequências poliméricas, por exemplo, pode ser realizado pelo alinhamento das duas sequências para propósitos de comparação ótima (*e.g.*, lacunas podem ser introduzidas em uma das ou em ambas as primeira e segunda sequências poliméricas para alinhamento ótimo e as sequências não idênticas podem ser desconsideradas para propósitos de comparação). Em determinadas modalidades, o comprimento de uma sequência alinhada para propósitos de comparação é pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% do comprimento da sequência referencial. Os resíduos nas posições correspondentes são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência está ocupada pelo mesmo resíduo que da posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas naquela posição. A identidade percentual entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências, considerando-se o número de lacunas, e o comprimento de cada lacuna, que precisa ser introduzido para alinhamento ótimo das duas sequências. A comparação de

sequências e a determinação de identidade percentual entre as duas sequências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático. Por exemplo, a identidade percentual entre duas sequências de nucleotídeos pode ser determinada usando métodos como aqueles descritos em “Computational Molecular Biology”, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; “Biocomputing: Informatics and Genome Projects”, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; “Sequence Analysis in Molecular Biology”, von Heinje, G., Academic Press, 1987; “Computer Analysis of Sequence Data, Part I”, Griffin, A. M., e Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; e “Sequence Analysis Primer”, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; cada um dos quais é aqui incorporado como referência. Por exemplo, a identidade percentual entre duas sequências pode ser determinada usando o algoritmo de Meyers e Miller (*CABIOS*, 1989, 4:11-17), que tem sido incorporado ao programa ALIGN (versão 1.2) usando uma tabela de peso de resíduo PAM120 (*PAM120 weight residue table*), uma penalidade para comprimento de lacunas de 12 e uma penalidade para lacunas de 4. A identidade percentual entre duas sequências de nucleotídeos pode, alternativamente, ser determinada usando o programa GAP no pacote de programas de computador GCG usando uma matriz NWSgapdna.CMP. Métodos comumente utilizados para determinar a identidade percentual entre sequências incluem, mas não são limitados àqueles revelados em Carillo, H., e Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988); aqui incorporado como referência. Técnicas para determinação de identidade são codificadas em programas de computador publicamente disponíveis. Programa de computador exemplificador para determinar homologia entre duas sequências incluem, mas não são limitados a, pacote de programas de computador GCG, Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, e FASTA Altschul, S. F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215, 403 (1990)).

[00319] “Homólogas”, como aplicado às sequências de aminoácidos, significa a sequência correspondente de outras espécies tendo identidade substancial com uma segunda sequência de uma segunda espécie.

[00320] “Análogas” significa que incluem variantes de polipeptídeo que diferem em uma ou mais alterações de aminoácido, *e.g.*, substituições, adições ou deleções de resíduos de aminoácidos que ainda mantêm as propriedades do polipeptídeo parental.

[00321] A presente invenção considera vários tipos de anticorpos interagentes com glicanas que são com base em aminoácidos incluindo variantes e derivados. Estes incluem variantes e derivados substitucionais, insercionais, delecionais e covalentes. Como tais, estão incluídas dentro do escopo desta invenção as moléculas de anticorpos interagentes com glicanas contendo substituições, inserções e/ou adições, deleções e modificações covalentes. Por exemplo, aminoácidos ou etiquetas (*tags*) de sequência, como uma ou mais lisinas, podem ser adicionados(as) às sequências de peptídeo da invenção (*e.g.*, nas extremidades N-terminal ou C-terminal). As etiquetas (*tags*) de sequência podem ser usadas para purificação ou localização de peptídeo. Lisinas podem ser usadas para aumentar a solubilidade de peptídeo ou para permitir biotinylação. Alternativamente, resíduos de aminoácidos localizados nas regiões terminais carboxila e amino da sequência de aminoácidos de um peptídeo ou de uma proteína podem ser opcionalmente deletados provendo sequências truncadas. Determinados aminoácidos (*e.g.*, resíduos C-terminais ou N-terminais) podem ser, alternativamente, deletados dependendo do uso da sequência, como por exemplo, expressão da sequência como parte de uma sequência maior que é solúvel, ou ligada a um suporte.

[00322] “Variantes substitucionais”, quando se referem às proteínas, são aquelas que têm pelo menos um resíduo de aminoácido em uma sequência nativa ou de partida removido e um aminoácido diferente inserido no lugar dele na mesma posição. As substituições podem ser únicas, onde apenas um

aminoácido na molécula tem sido substituído, ou podem ser múltiplas, onde dois ou mais aminoácidos têm sido substituídos na mesma molécula.

[00323] Como aqui usado, o termo “substituição conservativa de aminoácido” refere-se à substituição de um aminoácido que está normalmente presente na sequência por um aminoácido diferente de tamanho similar, carga similar, ou polaridade similar. Exemplos de substituições conservativas incluem a substituição de um resíduo não polar (hidrofóbico) como isoleucina, valina e leucina por outro resíduo não polar. Igualmente, exemplos de substituições conservativas incluem a substituição de um resíduo polar (hidrofílico) por outro como entre arginina e lisina, entre glutamina e asparagina, e entre glicina e serina. Adicionalmente, a substituição de um resíduo básico como lisina, arginina ou histidina por outro, ou a substituição de um resíduo ácido como ácido aspártico ou ácido glutâmico por outro resíduo ácido são exemplos adicionais de substituições conservativas. Exemplos de substituições não conservativas incluem a substituição de um resíduo de aminoácido não polar (hidrofóbico) como isoleucina, valina, leucina, alanina, metionina por um resíduo polar (hidrofílico) como cisteína, glutamina, ácido glutâmico ou lisina e/ou de um resíduo polar por um resíduo não polar.

[00324] “Variantes insercionais”, quando se referem às proteínas, são aquelas com um ou mais aminoácidos inseridos imediatamente adjacente a um aminoácido em uma posição específica em uma sequência nativa ou de partida. “Imediatamente adjacente” a um aminoácido significa conectado ao grupo funcional quer alfa-carboxila quer alfa-amino do aminoácido.

[00325] “Variantes delecionais”, quando se referem às proteínas, são aquelas com remoção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos nativa ou de partida. Ordinariamente, variações delecionais terão um ou mais aminoácidos deletados em uma região específica da molécula.

[00326] Como aqui usado, o termo “derivado” é usado comumente com

“variante” e refere-se a uma molécula que tem sido modificada ou alterada em qualquer maneira relativa a uma molécula referencial ou molécula de partida. Em algumas modalidades, os derivados incluem proteínas nativas ou de partida que têm sido modificadas com agente derivatizante orgânico proteináceo ou não proteináceo, e modificações pós-traducionais. As modificações covalentes são tradicionalmente introduzidas pela reação de resíduos de aminoácidos selecionados da proteína com um agente derivatizante orgânico que é capaz de reagir com os resíduos terminais selecionados ou com as cadeias laterais selecionadas, ou por mecanismos de aproveitamento de modificações pós-traducionais que funcionam em células hospedeiras recombinantes selecionadas. Os derivados covalentes resultantes são úteis em programas direcionados para a identificação de resíduos importantes para atividade biológica, para imunoenaios, ou para a preparação de anticorpos anti-proteína para purificação por imunoafinidade da glicoproteína recombinante. Tais modificações estão dentro do conhecimento ordinário na técnica e são realizados sem experimentação excessiva.

[00327] Determinadas modificações pós-traducionais são o resultado da ação de células hospedeiras recombinantes sobre o polipeptídeo expressado. Resíduos glutamila e asparaginila são frequentemente pós-traducionalmente desamidados para os correspondentes resíduos glutamila e aspartila. Alternativamente, estes resíduos são desamidados sob condições suavemente acídicas. Qualquer forma destes resíduos pode estar presente nas proteínas usadas de acordo com a presente invenção.

[00328] Outras modificações pós-traducionais incluem hidroxilação de prolina e de lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos serila ou treonila, metilação dos grupos alfa-amino das cadeias laterais de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, “Proteins: Structure and Molecular Properties”, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)).

[00329] Os derivados covalentes especificamente incluem moléculas

de fusão nas quais as proteínas da invenção estão covalentemente ligadas a um polímero não proteináceo. O polímero não proteináceo ordinariamente é um polímero sintético hidrofílico, *i.e.* um polímero não normalmente encontrado na natureza. Entretanto, os polímeros que existem na natureza e são produzidos por métodos recombinantes ou *in vitro* são úteis, como o são os polímeros que são isolados da natureza. Polímeros polivinílicos hidrofílicos estão dentro do escopo desta invenção, *e.g.* poli(álcool vinílico) e polivinilpirrolidona. São particularmente úteis os éteres polivinilalquilênicos como poli(glicol etilênico), poli(glicol propilênico). As proteínas podem ser ligadas a vários polímeros não proteináceos, como poli(glicol etilênico), poli(glicol propilênico) ou polioxialquilenos, na maneira apresentada nas Patentes U.S. nºs 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ou 4.179.337.

[00330] “Atributos”, quando se referem às proteínas, são definidos como diferentes componentes com base em sequência de aminoácidos de uma molécula. Os atributos das proteínas da presente invenção incluem manifestações na superfície, formato conformacional local, dobras, alças, meias-alças, domínios, meios-domínios, sítios, terminações ou qualquer combinação dos mesmos.

[00331] Como aqui usado quando se refere às proteínas, o termo “manifestação na superfície” refere-se a um componente com base em polipeptídeo de uma proteína que aparece sobre uma superfície mais externa.

[00332] Como aqui usado quando se refere às proteínas, o termo “formato conformacional local” significa uma manifestação estrutural com base em polipeptídeo de uma proteína que está localizada dentro de um espaço definível da proteína.

[00333] Como aqui usado quando se refere às proteínas, o termo “dobra” significa a conformação resultante de uma sequência de aminoácidos após minimização de energia. Uma dobra pode ocorrer no nível secundário ou

terciário do processo de enovelamento. Exemplos de dobras de nível secundário incluem folhas-beta e hélices-alfa. Exemplos de dobras terciárias incluem domínios e regiões formados(as) devido à agregação ou separação de forças energéticas. As regiões formadas nesta maneira incluem bolsas hidrofílicas, e semelhantes.

[00334] Como aqui usado, o termo “volta”, no que se refere à conformação de proteína, significa uma dobra que altera a direção da cadeia principal de um peptídeo ou polipeptídeo e pode envolver um, dois, três ou mais resíduos de aminoácidos.

[00335] Como aqui usado quando se refere às proteínas, o termo “alça” refere-se a um atributo estrutural de um peptídeo ou polipeptídeo que inverte a direção da cadeia principal de um peptídeo ou polipeptídeo e inclui quatro ou cinco resíduos de aminoácidos. Oliva *et al.* têm definido pelo menos 5 classes de alças de proteína (*J. Mol. Biol.* 266 (4): 814-830; 1997).

[00336] Como aqui usado quando se refere às proteínas, o termo “meia-alça” refere-se a uma porção de uma alça identificada tendo pelo menos metade do número de resíduos de aminoácidos que o da alça da qual ela é derivada. É entendido que as alças nem sempre podem conter um número par de resíduos de aminoácidos. Portanto, naqueles casos onde uma alça contém ou é identificada como incluindo um número ímpar de aminoácidos, uma meia-alça da alça ímpar-numerada incluirá a porção de número inteiro ou a porção de número inteiro seguinte da alça (número de aminoácidos da alça/2+/-0,5 aminoácidos). Por exemplo, uma alça identificada como uma alça de 7 aminoácidos produz meias-alças de 3 aminoácidos ou 4 aminoácidos ($7/2=3,5\pm0,5$ sendo 3 ou 4).

[00337] Como aqui usado quando se refere às proteínas, o termo “domínio” refere-se a um motivo de um polipeptídeo tendo uma ou mais propriedades ou características estruturais ou funcionais identificáveis (*e.g.*, capacidade de ligação, servindo como um sítio para as interações de proteína-

proteína.

[00338] Como aqui usado quando se refere às proteínas, o termo “meio-domínio” significa uma porção de um domínio identificado tendo pelo menos metade do número de resíduos de aminoácidos que o do domínio do qual ela é derivada. É entendido que os domínios nem sempre podem conter um número par de resíduos de aminoácidos. Portanto, naqueles casos onde um domínio contém ou é identificado como incluindo um número ímpar de aminoácidos, um meio-domínio do domínio ímpar-numerado incluirá a porção de número inteiro ou a porção de número inteiro seguinte do domínio (número de aminoácidos do domínio/2+/-0,5 aminoácidos). Por exemplo, um domínio identificado como um domínio de 7 aminoácidos produziria meios-domínios de 3 aminoácidos ou 4 aminoácidos ($7/2=3,5\pm0,5$ sendo 3 ou 4). É também entendido que subdomínios podem ser identificados dentro de domínios ou meios-domínios, estes subdomínios possuindo menos que todas as propriedades estruturais ou funcionais identificadas nos domínios ou meios-domínios dos quais eles foram derivados. É também entendido que os aminoácidos de qualquer um dos tipos de domínio aqui não precisam ser contíguos ao longo da cadeia principal do polipeptídeo (*i.e.*, aminoácidos não adjacentes podem dobrar-se estruturalmente para produzir um domínio, meio-domínio ou subdomínio).

[00339] Como aqui usado quando se refere às proteínas, o termo “sítio” no que se refere às modalidades com base em aminoácido é usado como sinônimo de “resíduo de aminoácido” e “cadeia lateral de aminoácido”. Um sítio representa uma posição dentro de um peptídeo ou polipeptídeo que pode modificada, manipulada, alterada, derivada ou variada dentro das moléculas com base em polipeptídeo da presente invenção.

[00340] Como aqui usados, os termos “terminações ou terminação” quando se referem às proteínas, referem-se a uma extremidade de um peptídeo ou polipeptídeo. Tal extremidade não é limitada apenas ao primeiro

sítio ou ao sítio final do peptídeo ou polipeptídeo mas pode incluir aminoácidos adicionais nas regiões terminais. As moléculas com base em polipeptídeo da presente invenção podem ser caracterizadas como tendo tanto uma terminação-N (terminada por um aminoácido com um grupo amino (NH₂) livre) quanto uma terminação-C (terminada por um aminoácido com um grupo carboxila (COOH) livre). As proteínas da invenção são em alguns casos compostas de múltiplas cadeias de polipeptídeo unidas por ligações dissulfeto ou por forças não covalentes (multímeros, oligômeros). Estes tipos de proteínas terão múltiplas terminações-N e -C. Alternativamente, as terminações dos polipeptídeos podem estar modificadas de modo que elas começam ou terminam, conforme o caso, com uma porção com base em não polipeptídeo como um conjugado orgânico.

[00341] Quando quaisquer dos atributos têm sido identificados ou definidos como um componente de uma molécula da invenção, qualquer uma de várias manipulações e/ou modificações destes atributos pode ser realizada por movimentação, permutação, inversão, deleção, randomização ou duplicação. Além disso, é entendido que a manipulação de atributos pode resultar no mesmo resultado que uma modificação das moléculas da invenção. Por exemplo, uma manipulação que envolveu a deleção de um domínio resultaria na alteração do comprimento de uma molécula da mesma forma que a modificação de um ácido nucleico para codificar uma molécula de comprimento menor que o comprimento completo.

[00342] As modificações e manipulações podem ser realizadas por métodos conhecidos na técnica como mutagênese sítio-direcionada. As moléculas modificadas resultantes podem ser então testadas para atividade usando ensaios *in vitro* ou *in vivo* como aqueles aqui descritos ou qualquer outro ensaio de triagem conhecido na técnica.

Variações isotópicas

[00343] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção

podem conter um ou mais átomos que são isótopos. Como aqui usado, o termo “isótopo” refere-se a um elemento químico que tem um ou mais nêutrons adicionais. Em uma modalidade, os compostos da presente invenção podem estar deuterados. Como aqui usado, o termo “deuterado” refere-se a uma substância que tem tido um ou mais átomos de hidrogênio substituídos por isótopos de deutério. Os isótopos de deutério são isótopos de hidrogênio. O núcleo do hidrogênio contém um próton enquanto que o núcleo do deutério contém ambos um próton e um nêutron. Os anticorpos interagentes com glicanas podem estar deuterados com o propósito de alterar uma propriedade física do composto, como estabilidade, ou para permitir que os compostos sejam usados em aplicações diagnósticas e experimentais.

Conjugados e Combinações

[00344] É considerado pela presente invenção que os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem estar complexados, conjugados ou combinados com uma ou mais moléculas homólogas ou heterólogas. Como aqui usado, “molécula homóloga” significa uma molécula que é similar em pelo menos uma de estrutura ou função relativa a uma molécula de partida enquanto que uma “molécula heteróloga” é uma que difere em pelo menos uma de estrutura ou função relativa a uma molécula de partida. Homólogas estruturais são, portanto, moléculas que são substancialmente estruturalmente similares. Podem ser idênticas. Homólogas funcionais são moléculas substancialmente funcionalmente similares. Podem ser idênticas.

[00345] Os anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem incluir conjugados. Tais conjugados da invenção podem conter uma substância naturalmente ocorrente ou um ligante naturalmente ocorrente, como uma proteína (*e.g.*, albumina sérica humana (ASH), lipoproteína de baixa densidade (LDL, *Low-Density Lipoprotein*), lipoproteína de alta densidade (HDL, *High-Density Lipoprotein*), ou globulina); um carboidrato

(*e.g.*, uma dextrana, pululana, quitina, quitosana, inulina, ciclodextrina ou ácido hialurônico); ou um lipídio. O ligante pode também ser uma molécula recombinante ou sintética, como um polímero sintético, *e.g.*, um poliaminoácido sintético, um oligonucleotídeo (*e.g.* um aptâmero). Exemplos de poliaminoácidos incluem [poliaminoácido é] uma polilisina (PLL), poli(ácido L-aspartico), poli(ácido L-glutâmico), copolímero de estireno-anidrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactídeo-co-glicolídeo), copolímero de éter divinílico - anidrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), poli(glicol etilênico) (PEG), poli(álcool vinílico) (PVA, *PolyVinyl Alcohol*), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, ou polifosfazina. Exemplo de poliaminas incluem: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopeptídeo-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, lipídio catiônico, porfirina catiônica, sal quaternário de uma poliamina, ou um peptídeo alfa-helicoidal.

[00346] Os conjugados podem também incluir grupos reconhecedores (*targeting groups*), *e.g.*, um grupo ou agente reconhecedor de célula ou tecido, *e.g.*, uma lectina, uma glicoproteína, um lipídio ou uma proteína, *e.g.*, um anticorpo, que se liga a um tipo de célula específico como uma célula renal. Um grupo reconhecedor pode ser uma tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína-A tensoativa, carboidrato de mucina, lactose multivalente, galactose multivalente, *N*-acetil-galactosamina, *N*-acetil-glicosamina manose multivalente, fucose multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactose multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, um lipídio, colesterol, um esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, um peptídeo RGD (ácido arginil-glicil-aspartico), um mimético de peptídeo RGD ou um aptâmero.

[00347] Os grupos reconhecedores podem ser proteínas, *e.g.*,

glicoproteínas, ou peptídeos, *e.g.*, moléculas tendo uma afinidade específica por um coligante, ou anticorpos *e.g.*, um anticorpo, que se liga a um tipo de célula específico como uma célula cancerosa, célula endotelial, ou célula óssea. Os grupos reconhecedores podem também incluir hormônios e receptores de hormônios. Também podem incluir espécies não peptídicas, como lipídios, lectinas, carboidratos, vitaminas, cofatores, lactose multivalente, galactose multivalente, *N*-acetil-galactosamina, *N*-acetil-glicosamina, manose multivalente, fucose multivalente, ou aptâmeros.

[00348] O grupo reconhecedor pode ser qualquer ligante que é capaz de reconhecer um receptor específico. Exemplos incluem, sem limitação, folato, GalNAc, galactose, manose, manose-6P, aptâmeros, ligantes de receptor de integrina, ligantes de receptor de quimiocina, transferrina, biotina, ligantes de receptor de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, LDL, e ligantes de HDL. Em modalidades específicas, o grupo reconhecedor é um aptâmero. O aptâmero pode estar não modificado ou ter qualquer combinação das modificações aqui reveladas.

[00349] Em ainda outras modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas estão covalentemente conjugados com um polipeptídeo penetrante em célula. O peptídeo penetrante em célula pode também incluir uma sequência sinal. Os conjugados da invenção podem ser desenhados para terem estabilidade aumentada; transfecção celular aumentada; e/ou biodistribuição alterada (*e.g.*, direcionados para tipos de célula ou tecidos específicos).

[00350] As porções conjugantes podem ser adicionadas aos anticorpos interagentes com glicanas de modo que elas permitem marcação (*labeling*) ou sinalização (*flagging*) de alvos para depuração. Tais moléculas etiquetadoras/sinalizadoras (*tagging/flagging molecules*) incluem, mas não são limitadas a, ubiquitina, moléculas fluorescentes, hemaglutinina de influenza humana (HA), c-myc [um segmento de 10 aminoácidos do proto-oncogene humano myc com a sequência EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 21)],

histidina (His), *flag* [um peptídeo curto de sequência DYKDDDDK (SEQ ID NO: 22)], glutationa-S-transferase (GST), V5 (um epítipo de paramixovírus de vírus simiano 5), biotina, avidina, estreptavidina, peroxidase de rábano (HRP, *Horse Radish Peroxidase*) e digoxigenina.

[00351] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas podem ser combinados uns com os outros ou com outra molécula no tratamento de uma doença ou condição.

Ácidos nucleicos

[00352] A presente invenção abrange moléculas de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos codificam os anticorpos da invenção (incluindo, mas não limitados a, anticorpos, fragmentos de anticorpo, intracorpos e receptores quiméricos de antígenos). Tais moléculas de ácido nucleico incluem, sem limitação, moléculas de DNA, moléculas de RNA, polinucleotídeos, oligonucleotídeos, moléculas de mRNA, vetores, plasmídeos e outros constructos. Como aqui usado, o termo “constructo” refere-se a qualquer molécula de ácido nucleico recombinante incluindo, mas não limitada a, plasmídeos, cosmídeos, moléculas de polinucleotídeos autonomamente replicantes ou moléculas de polinucleotídeos de RNA ou DNA de fita dupla ou de fita simples circular ou linear. A presente invenção abrange também células programadas ou geradas para expressarem moléculas de ácidos nucleicos codificantes de anticorpos interagentes com glicanas. Tais células podem ser geradas mediante o uso de transfecção, eletroporação, distribuição viral e semelhantes. Vírus modificados com constructos da invenção podem incluir, mas não são limitados a, lentivírus, adenovírus, fagos e vírus adenoassociados. Em alguns casos, os ácidos nucleicos da invenção incluem ácidos nucleicos com códon otimizados. Métodos de geração de ácidos nucleicos com códon otimizados são conhecidos na técnica e podem incluir, mas não são limitados àqueles descritos em Patentes U.S. nºs 5.786.464 e 6.114.148, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados

em suas totalidades como referências. Em algumas modalidades, as sequências de ácidos nucleicos estão com códons otimizados para melhorar a expressão de proteína ou para remover sítios crípticos de encadeamento (*cryptic splice sites*).

II. Métodos e usos

Terapêuticos

[00353] Os métodos da presente revelação incluem, mas não são limitados a, métodos de utilização de um ou mais anticorpos interagentes com glicanas para propósitos terapêuticos, diagnósticos, quantitativos, de bioprocessamento, experimentais, e/ou investigativos. Tais anticorpos interagentes com glicanas podem incluir anticorpos anti-STn.

Aplicações relacionadas com câncer

[00354] A glicosilação aberrante é um atributo inconfundível de transformação de célula cancerosa. Múltiplas formas de glicosilação aberrante têm sido descritas em cânceres humanos, identificando os antígenos de carboidrato associados com tumor (TACAs) específicos como uma classe de moléculas de superfície celular adequadas para reconhecimento de tumor específico (Cheever, M.A. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2009 Sep 1; 15(17):5323-37). A expressão de antígeno TACA tem sido encontrada em cânceres epiteliais incluindo, mas não limitados a, câncer de mama, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de estômago, e câncer de fígado. A expressão de antígeno TACA tem sido encontrada em cânceres embrionários incluindo, mas não limitados a, tumores do saco vitelino. Além disso, a expressão de antígeno TACA tem sido encontrada em muitos melanomas, carcinomas, e leucemias de vários tecidos (Heimburg-Molinaro *et al.*, *Vaccine.* 2011 Nov 8; 29(48): 8802-8826). Os anticorpos da invenção que reconhecem um ou mais TACA são aqui referidos como “anticorpos anti-TACA”.

[00355] Tem sido estimado que cerca de 80% de todos os carcinomas

expressam uma glicana truncada, o Antígeno Tn. Com poucas exceções, Tn e a forma sialilada Sialil-Tn (STn), não são expressados em tecidos saudáveis, normais. Ademais, o ácido siálico imunogênico não humano, ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), parece ser diferencialmente expressado em carcinomas como câncer de mama na forma de Neu5Gc-STn (GcSTn).

[00356] Múltiplas formas de glicosilação aberrante têm sido descritas em cânceres humanos, identificando glicanas específicas como uma classe de moléculas de superfície celular adequadas para reconhecimento de tumor específico (Cheever, M.A. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2009 Sep 1; 15(17): 5323-37). Por exemplo, vários tipos de cânceres humanos (como câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer de pulmão, e câncer ovariano dentre outros) mostram alta expressão de antígeno STn, que é raro em tecidos humanos normais (Karlen, P. *et al.*, *Gastroenterology.* 1998 Dec; 115(6): 1395-404; Ohno, S. *et al.*, *AntiCancer Res.* 2006 Nov-Dec; 26(6A):4047-53). Além disso, a presença de STn em mucinas associadas a tumores refere-se ao câncer com prognóstico desfavorável e é com isto considerado um epítipo atrativo para detecção de câncer e terapia direcionada para câncer (Cao, Y. *et al.*, *Virchows Arch.* 1997 Sep;431(3): 159-66; Julien, S. *et al.*, *Br J. Cancer.* 2009 Jun 2; 100(11): 1746-54; Itzkowitz, S.H. *et al.*, *Cancer.* 1990 Nov 1;66(9): 1960-6; Motoo, Y. *et al.*, *Oncology.* 1991;48(4):321-6; Kobayashi, H. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 1992 Jan; 10(1):95-101). A formação de Tn e STn está associada com mutações somáticas no gene *Cosmc* que codifica uma chaperona molecular requerida para a formação da T-sintase ativa (Ju, T. *et al.*, *Nature.* 2005 Oct 27;437(7063):1252; Ju, T. *et al.*, *Cancer Res.* 2008 Mar 15;68(6): 1636-46). Também pode resultar da expressão aumentada da sialil-transferase, ST6GalNAc I (Ikehara, Y. *et al.*, *Glycobiology.* 1999 Nov; 9(11): 1213-24; Brockhausen, I. *et al.*, *Biol. Chem.* 2001 Feb; 382(2):219-32). A expressão de novo de STn pode modular células de carcinoma, alterar o fenótipo maligno, e resultar em comportamentos

celulares mais agressivos (Pinho, S. *et al.*, *Cancer Lett.* 2007 May 8; 249(2): 157-70). Embora STn seja elevadamente expressado em tecidos malignos, níveis baixos também são encontrados em células humanas saudáveis (Jass, J.R. *et al.*, *J. Pathol.* 1995 Jun; 176(2): 143-9; Kirkeby, S. *et al.*, *Arch. Oral Biol.* 2010 Nov; 55(11):830-41). STn sozinho tem atraído atenção como um alvo para detecção e terapia de câncer (Cheever, M.A. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2009 Sep 1; 15(17):5323-37).

[00357] Adicionalmente à presença de STn, outras alterações de glicosilação têm sido descritas em câncer. Uma delas envolve Neu5Gc. Os ácidos *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) e Neu5Gc são os dois principais ácidos siálicos sobre superfícies celulares de mamíferos. Neu5Ac e Neu5Gc diferem apenas pelo fato de que Neu5Gc compreende um átomo de oxigênio adicional associado com grupo químico ligado ao carbono 5. Devido à perda de um gene funcional, humanos podem apenas sintetizar ácido siálico na forma de Neu5Ac, mas não na forma de Neu5Gc. Entretanto, Neu5Gc pode ser metabolicamente incorporado em humanos a partir de fontes dietárias derivadas de animais como carnes vermelhas (Tangvoranuntakul, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003 Oct 14; 100(21): 12045-50; Nguyen, D.H. *et al.*, *J. Immunol.* 2005 Jul 1; 175(1):228-36; US7,682,794, US8,084,219, US2012/0142903, WO2010030666 e WO2010030666, aqui incorporados em suas totalidades como referências). Neu5Gc é significativamente abundante em tumores humanos (Higashi, H. *et al.*, *Cancer Res.* 1985 Aug; 45(8):3796-802; Miyoshi I. *et al.*, *Mol. Immunol.* 1986. 23: 631-638; Hirabayashi, Y. *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 1987. 78: 614-620; Kawachi. S, *et al.*, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1988. 85: 381-383; Devine, P.L. *et al.*, *Cancer Res.* 1991. 51: 5826- 5836; Malykh, Y.N. *et al.*, *Biochimie.* 2001. 83: 623-634 e Inoue, S. *et al.*, 2010. *Glycobiology.* 20(6): 752-762) e consideravelmente baixo em tecidos humanos normais, o que tem sido despercebido durante várias décadas (Diaz, S.L. *et al.*, *PLoS One.* 2009. 4: e4241;

Tangvoranuntakul, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. 100: 12045-12050; Varki, A. *et al.*, *Glycoconj J*. 2009. 26: 231-245). A acumulação metabólica aumentada de Neu5Gc derivado de dieta em tecido canceroso comparado com tecidos humanos saudáveis é provavelmente explicada por pelo menos três fatores: crescimento rápido com subprodução de Neu5Ac endógeno competente, macropinocitose intensificada induzida por fatores de crescimento (Dharmawardhane, S. *et al.*, *Mol. Biol. Cell*. 2000 Oct; 11(10):3341-52; Simonsen, A. *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001 Aug; 13(4):485-92; Johannes, L. *et al.*, *Traffic*. 2002 Jul; 3(7):443- 51; Amyere, M. *et al.*, *Int. J. Med. Microbiol*. 2002 Feb; 291(6-7):487-94), e a suprarregulação, por hipóxia, da expressão gênica do gene de transportador de ácido siálico lisossomal (sialina) (Yin, J. *et al.*, *Cancer Res*. 2006 Mar 15; 66(6):2937-45). Além disso, todos os humanos testados até agora incluem um reservatório de anticorpos policlonais contra Neu5Gc não humano, que o torna o primeiro exemplo de um xenoautoantígeno (Padler-Karavani, V. *et al.*, *Glycobiology*. 2008 Oct; 18(10):818-30; Varki, N.M. *et al.*, *Annu. Rev. Pathol*. 2011; 6:365-93). Foi mostrado que a acumulação de Neu5Gc dietário em tumores malignos diante de uma resposta anti-Neu5Gc facilita a progressão de tumor pela indução de uma inflamação crônica de baixo grau (Hedlund, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008 Dec 2; 105(48):18936-41). Portanto, epítomos de glicana contendo Neu5Gc sobre tumores humanos representam uma possibilidade valiosa para direcionamento de fármacos. Um estudo recente sugere a existência de anticorpos contra STn contendo Neu5Gc (GcSTn), mas não contra Neu5Ac-STn (AcSTn), em pacientes com câncer e explora o potencial deles como um biomarcador específico para detecção de câncer (Padler-Karavani, V. *et al.*, *Cancer Res*. 2011 May 1; 71(9):3352-63).

[00358] MUC1 é uma glicoproteína-chave de superfície celular que é normalmente excessivamente glicosilada mas é subglicosilada em células tumorais. Glicosilação muito baixa de MUC1 resulta em exposição de

antígenos imunogênicos. Estes podem estar ao longo da sequência central de peptídeo de MUC1 ou ao longo de resíduos centrais de carboidrato. Estes TACAs incluem, mas não são limitados a, *N*-acetilgalactosamina (Tn), sialil(α 2,6)*N*-acetilgalactosamina (STn) e galactose(β 1-3)*N*-acetilgalactosamina (também conhecido como antígeno de Thomsen-Friedenreich ou TF). Tem sido estimado que cerca de 80% de todos os carcinomas expressam Tn ao longo dos carboidratos centrais de MUC1 com STn sendo intensamente expressado sobre células de carcinoma humano e ligado à progressão e metástase de câncer. Com poucas exceções, Tn e STn não são expressados em tecidos saudáveis normais. Ácido siálico forma um epítipo proeminente em STn. A invenção aproveita o fato de que a expressão de glicana aberrante Neu5Gc-STn (GcSTn) parece ser elevadamente específica para vários carcinomas.

[00359] No caso de MUC1, a incorporação de Neu5Gc em STn produz um alvo tumor-específico, um sítio que é um alvo atrativo para terapias com base em anticorpo para tratar tecido tumoral. Em algumas modalidades da presente invenção, os anticorpos interagentes com glicanas reconhecem células cancerosas expressoras de MUC1 compreendendo Neu5Gc. Até agora, Neu5Gc tem sido detectado em glicoconjugados de numerosos tecidos cancerosos humanos incluindo, mas não limitados a, câncer de cólon, tecido de retinoblastoma, melanoma, câncer de mama e tecido de tumor do saco vitelino. Em algumas modalidades da presente invenção, são considerados métodos para tratamento, com anticorpos interagentes com glicanas, destas formas de câncer e também de outras formas de câncer, não especificamente aqui listadas, caracterizadas pela presença de células cancerosas compreendendo Neu5Gc.

[00360] Têm sido identificados antígenos adicionais compreendendo glicanas que são expressados em correlação com câncer (Heimburg-Molinaro, J. *et al.*, "Cancer vaccines and carbohydrate epitopes". *Vaccine*. 2011 Nov 8;

29(48):8802-26). Estes antígenos de carboidrato associados com tumor incluem, mas não são limitados a, antígenos relacionados ao grupo sanguíneo de Lewis [incluindo, mas não limitados a, Lewis^Y (Le^Y), Lewis^X (Le^X), Sialil-Lewis^X (SLe^X) e Sialil-Lewis^A (SLe^A)], antígenos relacionados a glicoesfingolipídios [incluindo, mas não limitados a, Globo H, antígeno embrionário estágio-específico 3 (SSEA-3) e glicoesfingolipídios que incluem ácido siálico], antígenos relacionados a gangliosídeos [incluindo, mas não limitados a, gangliosídeos GD2, GD3, GM2, fucosil-GM1 e Neu5GcGM3] e antígenos relacionados a poli(ácido siálico).

[00361] Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos da presente invenção podem ser direcionados para antígenos do grupo sanguíneo de Lewis. Os antígenos de grupo sanguíneo de Lewis compreendem um resíduo de fucose ligado a GlcNAc por uma ligação α 1-3 ou uma ligação α 1-4. Podem ser encontrados tanto em glicolipídios quanto em glicoproteínas. Os antígenos de grupo sanguíneo de Lewis podem ser encontrados no fluido corporal de indivíduos que são secretores destes antígenos. O surgimento deles sobre células vermelhas é devido à absorção de antígenos de Lewis do soro pelas células vermelhas.

[00362] Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos da presente invenção podem ser direcionados para Le^Y. Le^Y (também conhecido como CD174) é composto de Gal β 1,4GlcNAc tendo resíduos de fucose α 1,2-ligados e também α 1,3-ligados produzindo o epítipo Fuca(1,2)Gal β (1,4)Fuca(1,3)GlcNAc. É sintetizado a partir do antígeno H por α 1,3-fucosiltransferases que ligam a α 1,3-fucose ao resíduo GlcNAc da cadeia parental. Le^Y pode ser expressado em um variedade de cânceres incluindo, mas não limitados a, câncer ovariano, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de pulmão e câncer epitelial. Devido ao seu baixo nível de expressão em tecidos normais e ao seu elevado nível de expressão em muitos cânceres, o antígeno Le^Y é um alvo atrativo para

anticorpos terapêuticos.

[00363] Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos da presente invenção podem ser direcionados para Le^X. Le^X compreende o epítopo Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -R. Ele também é conhecido como CD15 e antígeno embrionário estágio-específico 1 (SSEA-1). Este antígeno foi primeiro reconhecido como sendo imunorreativo com soros coletados de um camundongo submetido à imunização com células de teratocarcinoma F9. Foi também descoberto que Le^X correlaciona-se com o desenvolvimento embrionário em estágios específicos. Ele também é expressado em uma variedade de tecidos tanto na presença quanto na ausência de câncer, mas pode também ser encontrado em câncer de mama e câncer ovariano onde ele é apenas expressado por células cancerosas.

[00364] Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos da presente invenção podem ser direcionados para SLe^A e/ou SLe^X. SLe^A e SLe^X compreendem as estruturas [Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -R] e [Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -R] respectivamente. A expressão deles é suprarregulada em células de câncer. A presença destes antígenos em soro correlaciona-se com malignidade e prognóstico desfavorável. SLe^X é predominantemente encontrado em um epítipo terminal de mucina. Ele é expressado em numerosos cânceres diferentes incluindo câncer de mama, câncer ovariano, melanoma, câncer de cólon, câncer de fígado, câncer de pulmão e câncer de próstata. Em algumas modalidades da presente invenção, os alvos SLe^A e SLe^X compreendem Neu5Gc (aqui referidos como GcSLe^A e GcSLe^X, respectivamente).

[00365] Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos da presente invenção podem ser direcionados para glicolipídios e/ou epítopos presentes em glicolipídios, incluindo, mas não limitados a, glicosfingolipídios. Os glicosfingolipídios compreendem uma ceramida lipídica ligada a uma glicana por um grupo hidroxila de ceramida. Sobre a membrana celular os

glicoesfingolipídios formam agrupamentos (*clusters*) referidos como “balsas lipídicas”.

[00366] Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos da presente invenção podem ser direcionados para Globo H. Globo H é um glicoesfingolipídio relacionado a câncer primeiro identificado em células de câncer de mama. A porção glicana de Globo H compreende $\text{Fu}\alpha(1-2)\text{Gal}\beta(1-3)\text{GalNAc}\beta(1-3)\text{Gal}\alpha(1-4)\text{Gal}\beta(1-4)\text{Glc}\beta(1)$. Embora encontrado em numerosos tecidos epiteliais normais, Globo H tem sido identificado em associação com muitos tecidos tumorais incluindo, mas não limitados a, tumor de pulmão de células pequenas, tumor de mama, tumor de próstata, tumor de pulmão, tumor pancreático, tumor gástrico, tumor ovariano e tumor endometrial.

[00367] Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos da presente invenção podem ser direcionados para gangliosídeos. Os gangliosídeos são glicoesfingolipídios compreendendo ácido siálico. De acordo com a nomenclatura de gangliosídeos, G é usado como uma abreviação para gangliosídeo. Esta abreviação é seguida pelas letras M, D ou T que se referem ao número de resíduos de ácido siálico ligados (1, 2 ou 3 respectivamente). Finalmente os números 1, 2 ou 3 são usados para se referirem à ordem da distância de migração de cada um quando analisados por cromatografia em camada fina (em que 3 percorre a distância mais longa, seguido por 2, e então por 1). Os gangliosídeos são conhecidos por estarem envolvidos em crescimento e metástase relacionados com câncer e são expressados sobre a superfície celular de células tumorais. Os gangliosídeos expressados sobre células tumorais podem incluir, mas não são limitados a, GD2, GD3, GM2 e fucosil-GM1 (também referido aqui como Fuc-GM1). Em algumas modalidades da presente invenção, anticorpos interagentes com glicanas são direcionados para GD3. GD3 é um regulador de crescimento celular. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados para GD3 são usados para

modular o crescimento celular e/ou a angiogênese celular. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados para GD3 são usados para modular a fixação celular. Em algumas modalidades da presente invenção, os anticorpos interagentes com glicanas são direcionados para GM2. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados para GM2 são usados para modular o contato de célula para célula. Em algumas modalidades, os alvos gangliosídeos da presente invenção compreendem Neu5Gc. Em algumas modalidades, tais alvos podem incluir uma variante de GM3 compreendendo Neu5Gc (aqui referida como GcGM3). O componente glicana de GcGM3 é Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glc. GcGM3 é um componente conhecido de células tumorais.

[00368] Em algumas modalidades, TACAs reconhecidos pelos anticorpos anti-TACA da presente invenção podem incluir, mas não são limitados a, qualquer um daqueles listados nas Publicações de Patentes U.S. n^{os} US2013/0236486A1, US2013/0108624A1, US2010/0178292A1, US2010/0104572A1, US2012/0039984A1, US2009/0196916A1, e US2009/0041836A1, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00369] O método da presente revelação inclui métodos de tratamento de câncer com um ou mais dos anticorpos aqui descritos. Tais anticorpos podem incluir um ou mais dos domínios variáveis apresentados na Tabela 2. Os anticorpos podem incluir, ainda, um ou mais domínios constantes de IgG apresentados na Tabela 3. Os anticorpos podem ser anticorpos humanizados. Os anticorpos podem ser conjugados de anticorpo-fármaco que incluem um agente terapêutico, incluindo, mas não limitado a, qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente terapêutico pode ser um agente citotóxico, incluindo, mas não limitados a, qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente citotóxico pode ser MMAE. O agente citotóxico pode ser unido ao anticorpo por um conector.

STn em Câncer

[00370] O sistema imune tem múltiplos mecanismos para promover a atividade imune anticélula tumoral incluindo atividade imune tanto inata quanto adaptativa. Como aqui usado, o termo “atividade imune anticélula tumoral” refere-se a qualquer atividade do sistema imune que mata ou previne o crescimento e/ou a proliferação de células tumorais. Em alguns casos, a atividade imune antitumoral inclui o reconhecimento e a matança de células tumorais por células assassinas naturais (NK) e a fagocitose por macrófagos. Respostas imunes antitumorais adaptativas incluem a captação de antígeno tumoral e a apresentação pelas células apresentadoras de antígeno (APCs, *Antigen Presenting Cells*) como células dendríticas (DCs, *Dendritic Cells*) resultando na modulação de atividade antitumoral de células-T e/ou na expansão de células-B com secreção de anticorpos tumor-específicos. A ligação de anticorpos tumor-específicos aos tumores pode resultar em mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) e de citotoxicidade dependente de complemento (CDC, *Complement-Dependent Cytotoxicity*) de morte de célula tumoral.

[00371] Como aqui usado, o termo “célula tumoral imunorresistente” refere-se a uma célula tumoral que reduz a ou evade-se da atividade imune anticélula tumoral. Alguns estudos indicam que a expressão de STn (um TACA conhecido) sobre superfícies de células tumorais ou secretado para dentro do microambiente de célula tumoral pode promover a evasão de célula tumoral da atividade imune antitumoral. Como aqui usado, o termo “microambiente de célula tumoral” refere-se a qualquer área adjacente a ou circundando uma célula tumoral. Tais áreas incluem, mas não são limitadas a, áreas entre células tumorais, entre células tumorais e células não tumorais, fluidos circundantes e componentes circundantes da matriz extracelular.

[00372] Foi demonstrado por Ogata *et al.* (Ogata, S. *et al.*, 1992. *Canc.*

Res. 52:4741-6, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências) que mucinas sialiladas compreendendo STn reduzem o reconhecimento de células tumorais por células NK. Este estudo descobriu que a presença de mucina submaxilar ovina, bovina e porcina (OSM, BSM e PSM, respectivamente) resultou em inibição quase cem por cento de citotoxicidade (consulte a Tabela 2 de Ogata *et al.*). Outros estudos de autoria de Jandus *et al.*, demonstram que algumas células tumorais podem evadir-se da destruição por células NK devido à expressão de ligantes de sialoglicana que podem interagir com receptores *siglec* de célula NK resultando na inibição de célula NK (Jandus, C. *et al.*, 2014, *JCI*. pii: 65899, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00373] Estudos de autoria de Toda *et al.*, demonstram que STn pode ligar-se aos receptores CD22 sobre células-B, resultando em transdução de sinal decrescida e ativação reduzida de células-B (Toda, M. *et al.*, 2008. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372(1):45-50, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Células dendríticas (DCs) podem afetar a atividade imune adaptativa pela modulação da atividade de células-T. Estudos de autoria de Carrascal *et al.* descobriram que a expressão de STn por células de câncer de bexiga induziu tolerância em DCs, reduzindo a capacidade delas para induzir atividade imune anticélula tumoral em células-T (Carrascal, MA *et al.*, 2014. *Mol. Oncol.* pii: S1574-7891(14)00047-7, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Estes estudos revelaram que DCs, que entram em contato com células de câncer de bexiga positivas para STn, apresentaram perfil tolerogênico de expressão de CD80, CD86, IL-12 e TNF- α . Além disso, foi descoberto que DCs modularam células-T regulatórias de modo que as células-T tiveram baixa expressão de IFN γ e alta expressão de FoxP3. Outros estudos de autoria de van Vliet e outros, indicam que a expressão em superfície de DC de lectina de macrófago tipo galactose (MGL, *Macrophage*

Galactose-Type Lectin) pode resultar em direcionamento daquelas células para tecidos tumorais (van Vliet, SJ., 2007. Amsterdam: Vrije Universiteit. p1-232 e van Vliet, SJ. *et al.*, 2008. *J. Immunol.* 181(5):3148-55, Nollau, P. *et al.*, 2013. *J. Histochem. Cytochem.* 61(3):199-205, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências). DCs que chegam em tecidos devido às interações com MGL podem influenciar células-T auxiliares (*Th*, *T helper*) em uma de três maneiras. DCs podem induzir tolerância às células-T, atividade imune de células-T ou infrarregulação de células-T efectoras. Tem sido mostrado que MGL liga-se a ambos AcSTn e GcSTn e a afinidade tem sido analisada em profundidade (Mortezai, N. *et al.*, 2013. *Glycobiology.* 23(7): 844-52, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Curiosamente, tem sido mostrado que a expressão de MUC1 em tumores resulta em tolerância às células-T, proteção de células tumorais contra a erradicação imune.

[00374] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas (incluindo, mas não limitados a anticorpos anti-STn) da presente invenção podem ser usados para tratar sujeitos compreendendo uma ou mais células tumorais expressoras de um ou mais TACAs. Em alguns casos, os anticorpos interagentes com glicanas (incluindo, mas não limitados a anticorpos anti-STn) da invenção podem ser usados para aumentar a atividade imune antitumoral contra células tumorais expressoras de STn. Tais anticorpos podem aumentar a resposta imune adaptativa e/ou a resposta imune inata contra células tumorais imunorresistentes. Alguns anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados para aumentar a atividade de células NK anticélula tumoral. Tais anticorpos interagentes com glicanas podem, em alguns casos, bloquear a interação entre os receptores de glicana expressados sobre células NK e as glicanas STn sobre células cancerosas ou em tecidos circundantes.

[00375] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com

glicanas (incluindo, mas não limitados a anticorpos anti-STn) da invenção podem ser usados para aumentar a atividade de células-B anticélula tumoral. Tais anticorpos podem reduzir a interação entre receptores CD22 sobre células-B e glicanas STn sobre células cancerosas ou em tecidos circundantes. Um estudo de autoria de Sjoberg *et al.* demonstra que a 9-O-acetilação ácidos siálicos α 2,6-ligados em glicoproteínas também reduziu a interação entre receptores CD22 sobre células-B e tais glicoproteínas (Sjoberg, E.R. *et al.* 1994. *JCB*. 126(2): 549- 562). Outro estudo de autoria de Shi *et al.* revela que níveis mais altos de resíduos de ácido siálico 9-O-acetilado sobre células de eritroleucemia murina torna estas células mais suscetíveis à lise mediada por complemento (Shi, W-X. *et al.*, 1996. *J. of Biol. Chem.* 271(49): 31526-32, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Em algumas modalidades, os anticorpos anti-STn da invenção são capazes de seletivamente se ligarem ao STn não-9-O-acetilado, reduzindo a ligação total de STn, mas reduzindo a proliferação e/ou o crescimento de células tumorais, (*e.g.* mediante atividade antitumoral aumentada de células-B e destruição aumentada de células tumorais mediada por complemento). Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas (incluindo, mas não limitados a anticorpos anti-STn) da invenção podem ser usados para aumentar a atividade antitumoral de DC. Tais anticorpos podem ser usados para reduzir a tolerância de células tumorais à DC. A tolerância reduzida à DC pode compreender aumento da expressão de CD80, CD86, IL-12 e/ou TNF- α em DC. Em alguns casos, a atividade antitumoral de DC pode compreender a promoção de atividade de células-T anticélula tumoral. Tais anticorpos podem prevenir a ligação entre DC MGL e glicanas expressadas sobre ou ao redor de células cancerosas.

[00376] Um estudo de autoria de Ibrahim *et al.* sugere que níveis altos de anticorpos anti-STn juntamente com terapia endócrina pode aumentar a sobrevivência total e o tempo para progressão (TTP, *Time To Progression*)

em mulheres com câncer de mama metastático (Ibrahim, N.K. *et al.*, 2013. 4(7): 577-584, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Neste estudo, níveis de anticorpo anti-STn foram avaliados após vacinação com STn ligado à Hemocianina de lapa “buraco-de-fechadura” (KLH, *Keyhole-Limpet Hemocyanin*). Em algumas modalidades, os anticorpos anti-STn da invenção podem ser usados em combinação com terapia endócrina (*e.g.* tamoxifeno e/ou um inibidor de aromatase).

[00377] A expressão de STn tem estado implicada na contribuição para o potencial metastático de células tumorais ovarianas. De acordo com alguns métodos da revelação, os anticorpos anti-STn podem ser usados para reduzir a metástase de células tumorais ovarianas. Tais métodos podem incluir a redução de metástase de cerca de 1% a cerca de 15%, de cerca de 5% a cerca de 25%, de cerca de 10% a cerca de 50%, de cerca de 20% a cerca de 60%, de cerca de 30% a cerca de 70%, de cerca de 40% a cerca de 80%, de cerca de 50% a cerca de 90%, de cerca de 75% a cerca de 95%, ou de pelo menos 95%.

[00378] Alguns métodos da presente revelação incluem métodos de tratamento de câncer em um sujeito com um ou mais dos anticorpos aqui descritos, em que o sujeito tem pelo menos uma célula de câncer expressora de STn. Os anticorpos podem ligar-se ao STn. Tais anticorpos podem incluir um ou mais dos domínios variáveis apresentados na Tabela 2. Alguns anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem incluir diferentes combinações de sequências de anticorpo aqui descritas. Tais anticorpos podem incluir, ainda, um ou mais dos domínios constantes de IgG apresentados na Tabela 3. Os anticorpos podem ser anticorpos humanizados. Os anticorpos podem ser conjugados de anticorpo-fármaco que incluem um agente terapêutico, incluindo, mas não limitado a, qualquer uma daqueles aqui apresentados. O agente terapêutico pode ser um agente citotóxico, incluindo, mas não limitados a, qualquer um daqueles aqui apresentado. O agente

citotóxico pode ser MMAE. O agente citotóxico pode ser unido ao anticorpo por um conector.

[00379] Em algumas modalidades, a presente revelação provê métodos para tratamento de câncer em um sujeito, em que o sujeito tem pelo menos uma célula de câncer expressora de STn e em que o sujeito tem doença refratária à platina. A doença refratária à platina é uma resistência ao tratamento com base em platina experimentada por uma percentagem da população total de sujeitos tratados para o câncer. O sujeito pode ser tratado pela administração ao sujeito de um anticorpo anti-STn. A pelo menos uma célula de câncer pode ser uma célula de câncer ovariano. A pelo menos uma célula de câncer pode ser resistente à cisplatina. A pelo menos uma célula de câncer pode ser parte de um tumor.

[00380] Os anticorpos anti-STn usados para tratar câncer em sujeitos com doença refratária à platina podem ser CAFs. Os CAFs podem ser conjugados com um agente citotóxico, incluindo qualquer um dos formatos aqui apresentados. Os anticorpos anti-STn podem ser administrados em uma dose de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 25 mg/kg. A administração pode ser por injeção intravenosa. A administração pode incluir, mas não é limitada à, administração diária, administração semanal, ou administração mensal.

[00381] Em algumas modalidades, os tratamentos com anticorpo anti-STn podem reduzir os níveis detectáveis de STn em fluidos corporais e/ou tecidos do sujeito. O STn pode estar associado com proteínas ou outros carreadores. Em alguns casos, são reduzidos os níveis de STn em soro.

Células-tronco cancerosas como agentes terapêuticos

[00382] As células-tronco cancerosas ou CSCs (também chamadas de células iniciadoras de tumor) são um subconjunto de células dentro de uma população de células de tumor ou de tecido canceroso heterogêneo que induzem a iniciação, o crescimento, a disseminação, e a recorrência de tumores primários e metastáticos (Karsten e Goletz, SpringerPlus, 2013, 2,

301), que podem ocorrer em proporções variadas da população total dependendo do tipo de tumor. As CSCs são distinguidas das células terminalmente diferenciadas pela capacidade delas de se autorrenovarem e produzirem progênie diferenciada, não-CSC (Gupta *et al.*, *Nature Medicine*, 2009, 15, 1010-1012). Estas propriedades são semelhantes àsquelas das células-tronco normais. Tais diferenças entre células-tronco normais e CSCs têm importantes implicações para terapia.

[00383] Um número crescente de biomarcadores de superfície celular tem sido identificado com o objetivo de diferenciar CSCs de suas contrapartes não-CSC (Medema *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2013, 15, 338-344; Zoller, *Cancer*, 2011, 11, 254-267). Estes podem incluir, mas não são limitados a, CD44, CD133, CD117, e isoforma 1 de aldeído-desidrogenase (ALDH1, *Aldehyde Dehydrogenase Isoform 1*). Embora alguns destes derivem de estudos de tumores de camundongo e de linhagens celulares humanas, outros têm sido validados usando amostras de tumor humano primário. Um destes, a glicoproteína transmembranar CD44, ou receptor de hialuronana, que é um constituinte bem conhecido de uma variedade de tipos de tumor, tem também mais recentemente encontrado aceitação como um marcador de CSC confiável em cânceres humanos, e na verdade é um dos mais frequentemente observados (Lobo *et al.*, 2007, 23, 675- 699).

[00384] CD44 existe em várias isoformas variantes geradas pelos eventos de encadeamento alternativos ocorrendo dentre os 20 éxons e 19 íntrons do gene CD44 de comprimento completo (Williams *et al.*, *Experimental Biology and Medicine*, 2013, 238, 324-338). Evidência experimental crescente comprova a função de CD44 e de suas variantes na contribuição para o fenótipo de resistência a fármaco e metastático inato das CSCs (Negi *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 2012, 20, 561-573), em parte devido à modulação de vias de transdução de sinal intracelular (Williams *et al.*, *Experimental Biology and Medicine*, 2013, 238, 324-338).

Adicionalmente, é sabido que os pacientes com câncer de mama negativo triplo, juntamente com vários outros tipos de câncer, que apresentam altos níveis de células CD44 têm um prognóstico desfavorável e uma mortalidade mais alta (Negi *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 2012, 20, 561-573). Estas observações confirmam a noção de que o reconhecimento de CD44 oferece um meio de tratamento de câncer mediante inibição ou eliminação de CSCs, além das células cancerosas maduras. De fato, numerosas abordagens para reconhecimento de CD44 têm sido tentadas experimentalmente com variados graus de sucesso. Estas compreendem uma ampla variedade de tecnologias que incluem o uso de anticorpos conjugados e não conjugados, sistemas de nanocarreador-fármaco, e fármacos conjugados com hialuronana (Negi *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 2012, 20, 561-573). Em vários casos, entretanto, foram observados efeitos tóxicos em estudos *in vivo*; estes efeitos colaterais inconvenientes podem ser atribuíveis à ocorrência disseminada de CD44 e variantes sobre as membranas da maioria das células de vertebrados (Naor *et al.*, *Seminars in Cancer Biology*, 2008, 18, 260-267), além da sua presença sobre a superfície das CSCs e das células tumorais maduras reconhecidas. O reconhecimento de proteína CD44, que é um constituinte de células-tronco humanas normais (Williams *et al.*, *Experimental Biology and Medicine*, 2013, 238, 324-338), pode também prejudicar a função de célula-tronco normal (Leth-Larsen *et al.*, *Molecular Medicine*, 2012, 18, 1109-1121). Embora um grande corpo de pesquisa aponte para o desejo de reconhecimento da proteína CD44 sobre CSCs, e também sobre células tumorais maduras, o problema intrínseco com esta abordagem continua sendo a presente dificuldade no desenho de inibidores que pouparão o tecido normal e também as células-tronco normais.

[00385] Outro antígeno de tumor bem conhecido com implicações para a biologia de CSC é a mucina epitelial MUC1, uma glicoproteína ancorada à membrana que é diferencialmente expressada em níveis altos na maioria de

adenocarcinomas mas em níveis baixos ou de modo nenhum sobre células epiteliais normais. MUC1 tem sido recentemente identificada como um biomarcador de CSC em uma variedade de neoplasias incluindo câncer de mama (Engelmann *et al.*, *Cancer Research*, 2008, 68, 2419-2426), e câncer pancreático, onde sua expressão está correlacionada com metástase alta e prognóstico desfavorável. Como um constituinte de CSCs, tem sido mostrado que MUC1 funciona em adesão, proliferação, sobrevivência, e sinalização celulares (Engelmann *et al.*, *Cancer Research*, 2008, 68, 2419- 2426) e pode também ser coexpressada com CD44 (Leth-Larsen *et al.*, *Molecular Medicine*, 2012, 18, 1109-1121). Abordagens imunoterapêuticas para o reconhecimento de MUC1 em câncer estão sendo procuradas usando vacinas e também outras abordagens, mas principalmente no contexto de terapia de célula cancerosa madura (Julien *et al.*, *Biomolecules*, 2012, 2, 435-466; Acres *et al.*, *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4, 493-502).

[00386] Tem sido hipotetizado que as células-tronco cancerosas são geradas mediante a transição epitelial-para-mesenquimal (TEM) (Gupta *et al.*, *Nature Medicine*, 2009, 15, 1010-1012), e/ou inversamente mediante a transição mesenquimal-para-epitelial (TME) que ocorre no sítio de metástase (Leth-Larsen *et al.*, *Molecular Medicine*, 2012, 18, 1109-1121) (também chamada de plasticidade das CSCs onde não-CSCs podem produzir CSCs). Esta descoberta adicionalmente enfatiza a necessidade de eliminar ambas CSCs e não-CSCs em um tecido canceroso ou em uma populações de células tumorais.

[00387] Estudos recentes com populações de CSC enriquecidas têm revelado que estas células, diferentemente da massa do tumor, são relativamente quiescentes e são preferivelmente resistentes a muitos tipos de terapias atuais, incluindo quimioterapia e radiação (Leth-Larsen *et al.*, *Molecular Medicine*, 2012, 18, 1109-1121). Portanto as estratégias terapêuticas atuais reconhecem componentes de não-CSC do tumor, deixando

as CSCs predominantemente não afetadas apenas para reemergirem após sugestões apropriadas para reformar tumores primários recorrentes no sítio inicial ou para disseminar para sítios distantes, colonizar, e criar doença metastática, a principal causa de mortalidade por câncer.

[00388] O entendimento atual das propriedades das células-tronco cancerosas claramente enfatiza a necessidade de não apenas reconhecer a massa de células presente em tumores, como é prática atual, mas também o comportamento de CSC com o propósito de potencialmente realizar curas completas.

[00389] Como discutido acima, as estratégias que têm sido desenvolvidas com base em biomarcadores associados com tumor (incluindo CSCs) deparam-se com um desafio de que a maioria dos biomarcadores de câncer estão também presentes em células normais incluindo células-tronco normais. Uma terapia que reconhece um biomarcador de proteína para eliminar CSCs, pode também reconhecer células-tronco normais, causando a eliminação de células normais.

Glicanas tumor-específicas em CSCs

[00390] As formas aberrantes de glicosilação, incluindo o surgimento do antígeno Thomsen-nouveau (Tn) (GalNAc-O-Ser/Thr), têm sido descritas em numerosos cânceres humanos, identificando glicanas como uma classe inteiramente nova de antígenos de carboidrato associados com tumor adequados para reconhecimento de tumor específico (Rabu *et al.*, *Future Oncology*, 2012, 8, 943-960). A formação do derivado sialilado de Tn (STn) é mediada pela sialil-transferase ST6GalNAc I que adiciona ácido siálico em uma ligação $\alpha 2,6$ ao antígeno Tn. A sialilação de Tn previne outras adições de açúcar, truncando, assim, as extensões de glicana (Schultz *et al.*, *Cancer Metastasis Reviews*, 2012, 31, 501-518).

[00391] Embora a presença de STn em tecidos humanos adultos normais seja rara, STn ocorre em vários cânceres humanos, incluindo câncer

ovariano, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, e câncer de pulmão, dentre outros (Ferreira *et al.*, *Molecular Oncology*, 2013, 7, 719-731; Kinney *et al.*, *Cancer*, 1997, 80, 2240-2249). Além disso, a presença de STn em tumores está associada com doença metastática, prognóstico desfavorável, e sobrevivência total reduzida (Ferreira *et al.*, *Molecular Oncology*, 2013, 7, 719-731; Kinney *et al.*, *Cancer*, 1997, 80, 2240-2249); portanto, STn é considerado um alvo elevadamente atrativo para detecção e terapia de câncer. Há duas formas diferentes de ácido siálico - Neu5Ac e Neu5Gc - localizadas na posição terminal de STn. A forma Neu5Ac-sialilada é predominante em humanos porque humanos não podem sintetizar Neu5Gc devido ao gene CMP-Neu5Ac-hidroxilase (CMAH) inativo. Entretanto, o consumo de alimentos ricos em Neu5Gc resulta em incorporação de Neu5Gc estranho para dentro de células humanas, especialmente em carcinomas. Estudos prévios têm mostrado que tumores sólidos absorvem e expressam a forma Neu5Gc de ácido siálico (Inoue *et al.*, *Glycobiology*, 2010, 20, 752-762; Malykh *et al.*, *Biochimie*, 2001, 83, 623-634; Padler-Karavani *et al.*, *Cancer Research*, 2011, 71, 3352-3363). mAbs que se ligam às ambas glico-isoformas de STn [Neu5Ac-STn (AcSTn) e Neu5Gc-STn (GcSTn)] que são alvos de câncer potenciais são desenhados como anticorpos pan-STn.

[00392] A acumulação de STn está associada com mutações somáticas específicas observadas repetidamente em tumores sólidos e com a inativação do gene que codifica a chaperona molecular “*Core 1 Beta-3-Galactosyltransferase-Specific Molecular Chaperone*” (COSMC) [core-1-beta-3-galactosiltransferase coordenada com chaperona específica], que é requerida para a formação de T-sintase ativa (Ju *et al.*, *Nature*, 2005, 437, 125). A T-sintase compete com ST6GalNAc I pelo substrato GalNAc e, por conseguinte, quando inativada por mutação resulta em síntese elevada de STn. Adicionalmente, a acumulação de STn pode também resultar da expressão

aumentada de ST6GalNAc I, que é, com frequência, observada (Brockhausen *et al.*, *Biological Chemistry*, 2001, 382, 219-232; Ikehara *et al.*, *Glycobiology*, 1999, 9, 1213-1224). A expressão de novo de STn pode modular células de carcinoma, alterar o fenótipo maligno, e resultar em comportamentos celulares mais agressivos (Pinho *et al.*, *Cancer Letters*, 2007, 249, 157-170). Como tal, STn não é apenas um alvo terapêutico e biomarcador de câncer interessante, mas a interferência com a função de STn oferece o potencial intrigante para ter benefícios terapêuticos antimetastáticos, funcionais significativos.

[00393] Embora seja bem conhecido que a glicosilação de glicoproteínas celulares é alterada em câncer, parece que a glicosilação aberrante é seletiva com respeito tanto à glicoproteína quanto à glicana em questão. De fato, em CSCs de tumor humano apenas CD44 e MUC1 são carreadores principais do antígeno STn (Cazet *et al.*, *Breast Cancer Research: BCR*, 2010, 12,204; Julien *et al.*, *Glycobiology*, 2006, 16, 54-64), imediatamente sugerindo uma abordagem seletiva para reconhecimento de não apenas células tumorais maduras mas também de CSCs. Enquanto que MUC1 é um constituinte de superfície normal de algumas células epiteliais onde ela serve com uma função de barreira. MUC1 associada com tumor é caracterizada por hipoglicosilação e sialilação aumentada em CSCs na mesma maneira como observada em células cancerosas maduras, com STn surgindo como um marcador específico para ambas CSCs e células tumorais maduras (Curry *et al.*, *Journal of Surgical Oncology*, 2013, 107, 713-722). O perfil de oligossacarídeo aberrante de MUC1 produz a expressão de neomarcadores como sialil-Le^a (usado no teste CA19-9), sialil-Le^x, e sialil-Tn (TAG-72), e também os epítomos crípticos como Tn em células cancerosas (*e.g.*, CSCs). Além disso, por causa da subglicosilação, o centro peptídico (*peptide core*) da mucina torna-se exposto de modo que os epítomos dentro do centro (não acessíveis dentro de MUC1 derivada de tecido normal) podem servir como

antígenos potenciais.

[00394] Abordagens clínicas que reconhecem STn têm até agora consistido apenas em vacinas de STn. O candidato clínico mais avançado é *Theratope*, uma vacina terapêutica consistindo em STn acoplado com hemocianina de lapa “buraco-de-fechadura”. Em estudos em camundongo *in vivo* foi mostrado que a imunização com *Theratope* induziu uma potente resposta de anticorpo que medeia um atraso no crescimento de células de carcinoma mamário expressoras de STn injetadas (Julien *et al.*, *British Journal of Cancer*, 2009, 100, 1746-1751). Entretanto, *Theratope* falhou em atender seu desfecho primário em um teste clínico de fase III em câncer de mama metastático. Uma hipótese principal de porquê o teste com *Theratope* não atendeu ao seu desfecho primário é que a população de pacientes não foi avaliada para a expressão de STn antes da participação. Visto que a expressão de STn em câncer de mama é elevadamente heterogênea entre pacientes, variando de 25% a 80% dependendo do método de estudo e do método de detecção, a falta de capacidade para correlacionar a expressão de STn com a resposta pode ter ocultado algum benefício proveniente de *Theratope*. Com importância, um subconjunto de pacientes recebendo terapia hormonal mostrou um aumento significativo de 1,2 meses em sobrevivência total mediana quando tratados com *Theratope* comparada com apenas terapia hormonal (Ibrahim *et al.*, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2004, 22, 2547; e Miles *et al.*, *The Oncologist*, 2011, 16, 1092-1100), validando o potencial terapêutico de reconhecimento de STn em populações de pacientes específicas. Adicionalmente, visto que a resposta imune com frequência varia consideravelmente entre pacientes, as abordagens de vacina não têm a capacidade para controlar ou modular o título de anticorpo, resultando em faixas amplas de exposição ao anticorpo terapêutico dentre pacientes. Contudo, *Theratope* foi bem tolerado com toxicidade mínima, demonstrando

a segurança do reconhecimento de STn para terapia de câncer.

[00395] O entendimento crescente da base molecular da expressão de STn em células cancerosas sugere fortemente que as células que expressam STn em qualquer proteína de superfície de célula também expressarão STn em muitas outras (ou até mesmo todas) proteínas O-glicosiladas de superfície de célula, tornando-o um excelente alvo terapêutico associado com câncer amplamente distribuído. Portanto, populações de células cancerosas positivas para STn podem ser enriquecidas em CSCs. Além disso, dados recentes demonstram que a ab-rogação da expressão de STn torna os cânceres menos agressivos com reduções significativas em comportamento metastático (Gill *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, 110, E3152-3161).

Anticorpos anti-STn reconhecedores de CSCs como tratamento de câncer

[00396] Vários anticorpos anti-STn têm sido descritos no campo, mas alguns demonstram baixa especificidade para o antígeno STn ou as isoformas sialiladas. Por exemplo, tem sido mostrado que o anticorpo comercial B72.3 anti-STn liga-se não apenas ao STn mas também ao antígeno Tn (Bapat, S. A. (2010) “Human ovarian cancer stem cells”. *Reproduction* 140, 33-41). A capacidade de anticorpos monoclonais (mAbs) reconhecerem STn, modificados para induzirem citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), ou conjugados com uma carga útil citotóxica [*e.g.* conjugado de anticorpo-fármaco (CAF)], oferece o potencial de um benefício terapêutico significativo para pacientes cancerosos com tumores expressores de STn. Além disso, tais anticorpos também permitiriam o desenvolvimento de um diagnóstico complementar para pacientes pré-selecionados que mais provavelmente responderiam à terapia.

[00397] O STn está, com frequência, presente em um ou mais dos antígenos de superfície de CSC, e junto com eles serve para promover as

propriedades de totipotência e quimiorresistência associadas com CSCs. Portanto, os anticorpos anti-STn oferecem um agente reconhecedor de câncer associado com CSC com o potencial não apenas para diretamente matar CSCs por meio de engajamento direto e/ou ADCC, mas também oferecem uma oportunidade única para se ligarem a um amplo arranjo de proteínas de superfície de célula e interferem com as funções associadas delas essenciais para viabilidade, autorrenovação, e replicação de CSC.

[00398] Como aqui discutido, o fundamento lógico e as vantagens do reconhecimento de STn sobre CSCs podem incluir: (1) muitas glicoproteínas truncadas tumor-específicas contêm STn em câncer; (2) STn é um alvo de glicana singular expressado preferivelmente em CD44, MUC1, e potencialmente em outros importantes marcadores de superfície celular, em ambas CSCs e células tumorais maduras, independente do status de proliferação, permitindo o reconhecimento de ambos destes componentes de tumor por um único agente terapêutico; (3) STn é também um componente de CA-125, um biomarcador de câncer ovariano e outros; (4) STn é um componente de marcador CD44 de CSC ovariana. Portanto, mAbs pan-STn murinos em uso, que reconhecem um epítipo que abrange ambas as formas Neu5Ac e Neu5Gc de ácido siálico ligadas ao Tn, se ligarão às e matarão ou prejudicarão a função das CSCs e, por causa do epítipo comum, células tumorais não-CSC.

[00399] Em algumas modalidades, a presente invenção provê mAb(s) anti-pan-STn para eliminação específica de CSCs humanas e também de células tumorais maduras. Em um aspecto da presente invenção, o anticorpo anti-STn reconhecerá a própria glicana STn validada - não um glicopeptídeo específico ou uma proteína carreadora específica, que deve oferecer o potencial amplo de ligação a CD44, MUC1, ou outros marcadores STn-glicosilados em ambas as populações de tumor de CSC e de não-CSC.

[00400] Dada a especificidade excepcional no reconhecimento de STn

associado com tumor, a presente invenção pode poupar os tecidos normais, incluindo células-tronco adultas normais, permitindo, com isso, uma excelente janela terapêutica.

[00401] De acordo com a presente invenção, é aqui provida uma solução imunoterapêutica singular almejada para erradicar neoplasias humanas pela eliminação de ambas células-tronco cancerosas (CSCs) e células cancerosas maduras contidas dentro de tecidos cancerosos e/ou de populações de células tumorais. A eliminação é especificamente conferida mediante o reconhecimento de estruturas de antígeno Tn sialilado (STn) de superfície celular que estão singularmente presentes em tecidos cancerosos e/ou populações de células tumorais, incluindo tais estruturas associadas com células-tronco cancerosas.

Câncer colorretal

[00402] O câncer colorretal (CRC, *ColoRectal Cancer*) tem a 4ª maior incidência, e é atualmente a terceira causa principal de morte relacionada com câncer nos EUA. Atualmente, 20% dos pacientes são diagnosticados com doença metastática e aproximadamente 50% dos pacientes com CRC enfim desenvolverão metástase. Para aqueles diagnosticados com doença metastática, a taxa de sobrevivência de 5 anos é de 13,1%. Em pacientes com câncer de colorretal metastático (mCRC, *Metastatic ColoRectal Cancer*), há precedência do uso de anticorpos terapêuticos (*e.g.*, anticorpos monoclonais), como anticorpos monoclonais anti-receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) (*e.g.*, cetuximabe e panitumumabe) e anticorpos monoclonais anti-fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) (*e.g.* bevacizumabe e ramucirumabe).

[00403] É relatado que a expressão de STn está presente em 83,4% das amostras de pacientes com CRC e está correlacionada com malignidade aumentada e prognóstico desfavorável. O antígeno STn está presente em

colonócitos normais adultos mas é detectável apenas após remoção de grupos O-acetila por saponificação, um processo que não ocorre naturalmente *in vivo* (Julien *et al.*, *Biomolecules*, 2012, 2, 435-466). Portanto, STn pode ser usado como um alvo terapêutico para tratamento de CRC.

[00404] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas da presente revelação podem ser usados para tratamento de CRC e/ou mCRC. Em alguns casos, tais anticorpos interagentes com glicanas são anticorpos anti-STn, incluindo, mas não limitados a, qualquer um daqueles aqui descritos. Os anticorpos interagentes com glicanas usados para tratar CRC e/ou mCRC podem ser conjugados com um agente citotóxico (*e.g.*, MMAE e MMAF). Os anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados em combinação com outras terapias com um agente quimioterapêutico (*e.g.*, fluoropirimidina, oxaliplatina, e/ou irinotecano) e/ou com um anticorpo terapêutico (*e.g.*, cetuximabe, panitumumabe, bevacizumabe e/ou ramucirumabe). Em alguns casos, os anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados para tratar cânceres colorretais que são resistentes a um ou mais outros tratamentos terapêuticos.

[00405] De acordo com algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas usados para tratar câncer colorretal podem ser administrados em uma dose de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Por exemplo, os anticorpos podem ser administrados em dose de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 2 mg/kg, de cerca de 1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, de cerca de 2,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, ou de cerca de 5 mg/kg a cerca de 20 mg/kg.

Câncer ovariano

[00406] Em algumas modalidades, os métodos da presente revelação incluem métodos de tratamento de câncer ovariano. O câncer ovariano é o câncer ginecológico principal que afeta mulheres nos EUA. Durante 2013, é estimado que 22.240 mulheres serão diagnosticadas com esta doença e que

14.030 morrerão desta doença, tornando-a a quinta causa principal de mortes por câncer relacionadas com mulheres e a malignidade ginecológica mais letal nos EUA (Siegel *et al.*, *Cancer Statistics*, 2013. CA: *A Cancer Journal For Clinicians* 63, 11-30). Esta mortalidade alta pode ser atribuída ao início assintomático, ao diagnóstico inicial no estágio tardio, à agressividade deste tipo de câncer, e a uma falta geral de alterações genéticas terapeuticamente reconhecíveis. O atual padrão de cuidado é a citorredução tumoral seguida por quimioterapia com base em taxano e platina. Embora este tratamento inicial resulte em ~70% dos pacientes alcançando uma resposta clínica completa inicial, a maioria destes pacientes reincidirão com doença quimiorresistente (Foster *et al.*, *Cancer Letters*, 2013, 338, 147-157; e McCann *et al.*, *PLoS One*, 2011,6, e28077). Em parte, a doença recorrente tem sido atribuível, como com outros tipos de câncer, à presença de CSCs dentro da população de tumor total. De fato, CSCs ovarianas têm sido identificadas e mostrado que são resistentes à quimioterapia e à radioterapia (Burgos-Ojeda *et al.*, *Cancer Letters*, 2012, 322, 1-7). Portanto, de novo como o caso com outras formas de câncer, a eliminação de CSCs juntamente com células maduras nos tecidos cancerosos e/ou na população de células tumorais oferece a melhor esperança para manejar doença recorrente e curas idealmente eficazes.

[00407] Em algumas modalidades da presente invenção, são providos métodos para tratamento de câncer ovariano usando anticorpos anti-STn. Os métodos incluem a administração de anticorpos anti-STn aos sujeitos tendo câncer ovariano ou suspeitos de ter câncer ovariano. Em algumas modalidades, CSCs ovarianas podem ser reconhecidas para tratamento de câncer ovariano, incluindo, mas não limitadas àquelas presentes em tecidos cancerosos e/ou em populações de células tumorais. Embora CD133 seja o mais amplamente estudado dos marcadores de CSC ovariana putativa, é reconhecido que CD44, um carreador conhecido de STn como discutido acima, está associado com câncer ovariano e é incluído no conjunto de

marcadores que identificam CSCs ovarianas (Zhang *et al.*, *Cancer Research*, 2008, 68, 4311-4320; Foster *et al.*, *Cancer Letters*, 2013, 338, 147-157; e Zoller, *Cancer*, 2011, 11, 254-267). Além disso, STn é expressado no biomarcador de câncer ovariano bem conhecido CA-125 (MUC16), e também em MUC1, onde os níveis destas mucinas associadas com STn em soro têm sido usados recentemente como outros diferenciadores de doença ovariana cancerosa versus benigna. Níveis séricos elevados de STn ocorrem em ~50% das pacientes com câncer ovariano e correlacionam-se com uma taxa de sobrevivência mais baixa de 5 anos (Kobayashi *et al.*, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 1991, 9, 983-987; Kobayashi *et al.*, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 1992, 10, 95-101; e Chen *et al.*, *Journal of Proteome Research*, 2013, 12, 1408-1418). Finalmente, Vathipadiekal *et al.* em um estudo de expressão gênica diferencial entre populações de não-CSC e de CSCs de carcinoma primário humano descobriram que a expressão de sialil-transferase geradora de STn ST6GalNAc I não se diferenciou dentre as células dos dois compartimentos.

[00408] Em algumas modalidades, a administração de anticorpos anti-STn a um sujeito tendo câncer ovariano ou suspeito de ter câncer ovariano, de acordo com os métodos aqui descritos, resulta na redução de células positivas para STn em tais sujeitos e/ou na redução de células positivas para STn em um ou mais tecidos de câncer ovariano ou uma ou mais populações de células tumorais ovarianas em tais sujeitos. Em algumas modalidades, a redução pode incluir um decréscimo em células positivas para STn de cerca de 10% a cerca de maior que 90% (por exemplo, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, ou pelo menos 90%).

[00409] Em algumas modalidades, a presente invenção provê anticorpos para reconhecimento de CSCs para prevenir controle ou curar

câncer relacionado com CSCs. Tais anticorpos podem incluir anticorpos anti-STn, incluindo, mas não limitados a qualquer um daqueles aqui descritos. Outros anticorpos anti-STn podem incluir anticorpo 3F1 (SBH Sciences, Natick, MA) ou derivados do mesmo, incluindo anticorpos recombinantes com CDRs de 3F1 e/ou derivados humanizados.

[00410] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-STn da invenção podem ser usados para reconhecer células-tronco de câncer ovariano que são resistentes a outras formas de tratamento. Tais tratamentos podem incluir quimioterapia. Como aqui usado, o termo, “quimioterapia” refere-se a uma forma de tratamento usando substâncias químicas. Tais substâncias químicas são aqui referidas como “agentes quimioterapêuticos”. No tratamento de câncer, agentes quimioterapêuticos são agentes que tornam mais lenta ou proíbem a proliferação de células cancerosas. Como aqui usado, o termo “resistente à quimioterapia” ou “quimiorresistente” é usado para se referir as células que não são afetadas pelo ou que têm suscetibilidade limitada ao tratamento quimioterapêutico. Tais tratamentos quimioterapêuticos podem incluir tratamento com olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel. Métodos de reconhecimento de células-tronco de câncer ovariano resistentes à quimioterapia podem se beneficiar das alterações na expressão de STn expression em células-tronco de câncer ovariano que ocorrem após o tratamento quimioterapêutico. Em alguns casos, as células-tronco de câncer ovariano resistentes à quimioterapia expressam STn antes e/ou depois do tratamento quimioterapêutico. Em alguns casos, a expressão de STn na superfície celular em células-tronco de câncer ovariano resistentes à quimioterapia pode ser aumentada após o tratamento quimioterapêutico. Após os tratamentos quimioterapêuticos com olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel, algumas células-tronco de câncer ovariano podem proliferar-se resultando em uma população de células cancerosas expressoras de STn que são resistentes a olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel. Em algumas

modalidades, os anticorpos anti-STn podem ser usados para reconhecer células resistentes a olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel. Em alguns casos, estas células resistentes são células-tronco cancerosas. Em algumas modalidades, o tratamento com anticorpo anti-STn de um sujeito pode ser realizado após o tratamento do sujeito com olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel.

[00411] Consequentemente, os métodos da invenção podem incluir métodos de tratamento de câncer pela administração de um anticorpo anti-STn a um sujeito com câncer ovariano. Anticorpos anti-STn podem ser administrados antes do, durante o, ou após o tratamento com agentes quimioterapêuticos (*e.g.*, olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel). Os anticorpos anti-STn podem reconhecer células-tronco de câncer ovariano expressoras de STn presentes antes da, durante a, e/ou após a administração de agentes quimioterapêuticos (*e.g.*, olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel). Os anticorpos anti-STn podem incluir um domínio variável com uma sequência de aminoácidos selecionada uma ou mais de SEQ ID NOs: 1-12. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-STn são conjugados de anticorpo-fármaco. Tais conjugados de anticorpo-fármaco podem incluir um agente citotóxico (*e.g.*, monometil-auristatina E). Tecidos cancerosos em sujeitos tratados com anticorpos anti-STn podem experimentar uma redução em células positivas para STn. Em algumas modalidades, a redução pode incluir um decréscimo em células positivas para STn de cerca de 10% a cerca de maior que 90% (por exemplo, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, ou pelo menos 90%). Os anticorpos podem reconhecer CSCs.

[00412] Em algumas modalidades, sujeitos tendo uma ou mais células-tronco de câncer ovariano resistentes à quimioterapia podem ser tratados com anticorpos anti-STn da invenção após o tratamento com um ou mais agentes

quimioterapêuticos (*e.g.*, olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel). O tratamento com anticorpo anti-STn após o tratamento com agente quimioterapêutico pode prevenir o ressurgimento de tumor. O ressurgimento de tumor é o desenvolvimento de uma ou mais células tumorais ou de um ou mais tumores após terem sido reduzidos os níveis de uma ou mais células tumorais ou de um ou mais tumores (*e.g.*, devido às terapias anteriores ou atuais).

[00413] Em alguns métodos de tratamento de câncer ovariano, os anticorpos anti-STn da presente revelação são administrados em combinação com moduladores de sinalização celular que são atribuídos à totipotência e/ou diferenciação. Tais moduladores podem incluir moduladores de sinalização Notch e/ou Hedgehog.

[00414] Os métodos da presente revelação incluem métodos de tratamento de câncer ovariano pela obtenção de uma amostra de um sujeito a tendo ou suspeito de ter câncer ovariano e detecção de STn na amostra, em que se STn é detectado, um anticorpo anti-STn é administrado ao sujeito. Em algumas modalidades, a amostra coletada é uma amostra celular (*e.g.*, uma amostra de tecido canceroso ou uma amostra de tumor). Amostras celulares podem incluir células BRCA1 mutantes ou células BRCA1 não mutantes.

[00415] A detecção de STn em amostras de sujeito pode ser realizada por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica para detecção de compostos moleculares. Tais métodos podem incluir o uso de um ou mais anticorpos de detecção de STn. Os anticorpos de detecção de STn podem incluir qualquer anticorpo capaz de se ligar ao STn. Alguns métodos de detecção de STn podem incluir, mas não são limitados a, espectrometria de massas, transferência de Western, citometria de fluxo, imunoprecipitação, e ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Em algumas modalidades, é detectado STn associado com proteína.

[00416] Em algumas modalidades, o STn detectado pode estar associado com proteínas relacionadas com células-tronco de câncer ovariano. Como aqui usado, o termo “proteína relacionada com células-tronco de câncer ovariano” refere-se a qualquer proteína que está associada com uma ou mais células-tronco de câncer ovariano. Tais proteínas podem incluir, mas não são limitados a, proteínas de superfície celular, marcadores, proteínas intracelulares, fatores de transcrição, e proteínas envolvidas em sinalização celular que afetam a sobrevivência, o crescimento, a replicação, e/ou a manutenção de células-tronco de câncer ovariano. As proteínas relacionadas com células-tronco de câncer ovariano podem incluir, mas não são limitadas a, Notch, Hedgehog, MUC1, CD44, CD117, CD133, e integrina.

[00417] Em algumas modalidades, a presente revelação provê métodos de tratamento de câncer ovariano compreendendo prover um tratamento combinado com olaparibe e um anticorpo anti-STn. Tais métodos podem incluir o tratamento de um sujeito com olaparibe e tratamento posterior do sujeito com um anticorpo anti-STn. Em alguns casos, os métodos de tratamento de câncer ovariano incluem identificar um sujeito que não é completamente responsivo ao tratamento com olaparibe e administrar ao sujeito um anticorpo anti-STn.

[00418] Os métodos da presente revelação podem incluir métodos de tratamento de consolidação de câncer. Tratamento de consolidação é o tratamento que é realizado após a quimioterapia para alcançar remissão prolongada. Tipicamente, o tratamento de consolidação envolve doses mais baixas de quimioterapia para prevenir ressurgimento de tumor enquanto que se mantém baixos os níveis de toxicidade. Métodos da presente revelação para tratamento de consolidação de câncer podem incluir a redução do número de células cancerosas em um sujeito pela administração de pelo menos um agente quimioterapêutico e a manutenção do número reduzido (ou redução adicional do número) de células cancerosas no sujeito ou em um ou mais

tecidos cancerosos no sujeito pela administração de um anticorpo anti-STn. Em algumas modalidades, o câncer é câncer ovariano. O agente quimioterapêutico pode ser olaparibe, carboplatina, e/ou paclitaxel. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-STn é um conjugado de anticorpo-fármaco (CAF). O CAF pode incluir monometil-auristatina E (MMAE).

[00419] Em algumas modalidades, os métodos da revelação incluem a erradicação completa de células tumorais ovarianas para induzir remissão inicial durável mediante a administração de um ou mais anticorpos anti-STn. Outros métodos incluem a inibição de ressurgimento de tumor ovariano durante um período de tempo mediante a administração de um ou mais anticorpos anti-STn, em alguns casos sem toxicidade excessiva. Tais períodos de tempo podem ser de cerca de 1 mês a cerca de 18 meses, de cerca de 1 ano a cerca de 5 anos, de cerca de 2 anos a cerca de 10 anos, ou maior que 10 anos.

[00420] Em algumas modalidades, a presente revelação provê métodos de tratamento de câncer que incluem o isolamento de uma ou mais células tumorais ovarianas de um sujeito, geração de um tumor de xenoinxerto em um hospedeiro (*e.g.*, um camundongo, rato, coelho, porco, ou primata) com as uma ou mais células tumorais ovarianas, administração de um ou mais anticorpos anti-STn ao hospedeiro, e seleção de pelo menos um dos um ou mais anticorpos anti-STn testados para uso como um anticorpo terapêutico para tratar o sujeito. O anticorpo anti-STn pode ser selecionado com base na capacidade daquele anticorpo para reduzir volumes de tumor no hospedeiro.

Alvos imunorrelacionados

[00421] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem ser anticorpos imunomodulatórios. Como aqui usado, um anticorpo imunomodulatório é um anticorpo que intensifica ou suprime uma ou mais vias ou funções imunes.

[00422] É sabido que muitas glicanas bacterianas compreendem ácido

siálico. Em alguns casos, tais glicanas permitem que as bactérias se evadam do sistema imune inato de hospedeiros, incluindo, mas não limitados a, humanos. Em um exemplo, as glicanas bacterianas inibem a ativação da por meio de de complemento alternativa mediante o reconhecimento de fator H. Em outro exemplo, as glicanas bacterianas ocultam os resíduos subjacentes que podem ser antigênicos. Algumas glicanas bacterianas participam nos eventos de sinalização celular mediante a ativação de lectinas do tipo Ig ligantes de ácido siálico (Siglecs) inibitórias que amortecem a resposta imune às entidades compreendendo determinadas porções sialiladas (Chen, X. *et al.*, “Advances in the biology and chemistry of sialic acids”. *ACS Chem Biol.* 2010 Feb 19;5(2): 163-76). Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser usados para tratar complicações imunes relacionadas com glicanas bacterianas.

[00423] Devido à natureza estranha de Neu5Gc como aqui descrito, algumas glicanas Neu5Gc são imunogênicas resultando em destruição imunorrelacionada de células e de outras entidades onde estas glicanas podem ser expressadas. Tal destruição autoimune pode ser patogênica. Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados para tratar pacientes sofrendo de distúrbios autoimunes relacionados com glicanas Neu5Gc.

[00424] Em algumas modalidades, anticorpos imunomodulatórios da invenção podem ser usados para promover ou suprimir imunidade mediada por células-T. Tais anticorpos podem interagir com uma ou mais glicanas presentes sobre células-T, proteínas relacionadas com células-T e/ou um ou mais outros tipos de células que interagem com células-T. Anticorpos imunomodulatórios que intensificam a imunidade mediada por células-T podem ser usados para estimular o reconhecimento de células cancerosas mediado por células-T.

[00425] Em alguns tumores, infiltração por macrófagos associados a

tumor (TAMs, *Tumor-Associated Macrophages*) pode resultar em imunossupressão da promoção de viabilidade e crescimento de células tumorais. Isto é considerado devido à sinalização de células imunossupressoras que ocorre mediante interações entre receptores mieloides de lecitina de tipo C (CLRs, *myeloid C-Type Lectin Receptors*) presentes sobre TAMs e mucinas associadas a tumores (Allavena, P. *et al.*, *Clin. Dev. Immunol.* 2010;2010:547179). Em algumas modalidades, a ligação de anticorpos imunomodulatórios da invenção a uma ou mais mucinas associadas a tumores ou TACA previne a sinalização celular imunossupressora em TAMs.

Aplicações veterinárias

[00426] É considerado que os anticorpos interagentes com glicanas da invenção serão úteis na área de cuidado veterinário incluindo o cuidado e o tratamento de vertebrados não humanos. Como aqui descrito, o termo “n vertebrado não humano” inclui todos vertebrados com a exceção de *Homo sapiens*, incluindo espécies selvagens e domesticadas como animais de companhia e animais de fazenda. Os vertebrados não humanos incluem mamíferos, como alpaca, bantengue, bisão, camelo, gato, gado bovino, cervídeos, cão, macaco, gaial, cabra, porquinho-da-índia, cavalo, lhama, mula, porco, coelho, rena, ovelha, búfalo da Índia, e iaque. Os animais de fazenda incluem animais domesticados procriados em um ambiente agrícola para produzir materiais como alimento, trabalho, e produtos derivados como fibras e produtos químicos. Em geral, os animais de fazenda incluem todos os mamíferos, aves e peixes tendo significância agrícola potencial. Em particular, animais quadrúpedes de abate incluem bois, novilhas, vacas, bezerros, touros, gado, suíno e carneiros/ovelhas.

Bioprocessamento

[00427] Algumas modalidades da invenção são métodos para produção de produtos biológicos em células hospedeiras pelo contato das células com

um ou mais anticorpos interagentes com glicanas (como um anticorpo ou uma proteína de fusão) capaz de modular a expressão gênica, ou alterar os níveis e/ou os tipos de glicanas produzidas em que tal modulação ou alteração intensifica a produção de produtos biológicos. De acordo com a presente invenção, métodos de bioprocessamento podem ser melhorados pelo uso de um ou mais dos anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção. Também podem ser melhorados por suplementação, substituição ou adição de um ou mais anticorpos interagentes com glicanas.

Diagnósticos

[00428] Em algumas modalidades, compostos e composições da invenção podem ser usados como diagnósticos. Em alguns casos, os anticorpos da invenção podem ser usados para identificar, marcar ou corar células, tecidos, órgãos, etc. que expressam antígenos-alvo. Em outras modalidades, os anticorpos da invenção podem ser usados para identificar STn presente em seções de tecido (*i.e.*, seções histológicas de tecido), incluindo tecido conhecido ou suspeito de ter células cancerosas. Tais métodos de uso de anticorpos da invenção podem, em alguns casos, ser usados para identificar células cancerosas ou tumores em seções de tecido. As seções de tecido podem ser de qualquer tecido ou órgão incluindo, mas não limitados a, mama, cólon, pancreático, ovariano, cérebro, fígado, rim, baço, pulmão, pele, estômago, intestino, esôfago, ou osso.

[00429] Em algumas modalidades, métodos diagnósticos da invenção podem incluir a análise de uma ou mais células ou de um ou mais tecidos usando técnicas imuno-histoquímicas. Tais métodos podem incluir o uso de um ou mais de qualquer um dos anticorpos interagentes com glicanas aqui descritos. Métodos imuno-histoquímicos podem incluir coloração de seções de tecido para determinar a presença e/ou o nível de uma ou mais proteínas glicosiladas ou de outros marcadores. As seções de tecido podem ser derivadas de tumores de sujeitos (*e.g.*, tumores de pacientes e tumores de

animais como tumores modelo de animais). As seções de tecido podem provir de tecidos congelados frescos não fixados ou fixados em formalina. Em alguns casos, a seção de tecido provém de tecidos fixados em formalina emblocados em parafina (FFPE, *Formalin Fixed Paraffin-Embedded*). Os anticorpos interagentes com glicanas aqui descritos podem ser usados como anticorpos primários. Os anticorpos primários são usados para contatar diretamente seções de tecido e se ligarem aos epítomos-alvo. Os anticorpos primários podem ser conjugados diretamente com um marcador detectável ou podem ser detectados mediante o uso de um agente de detecção como um anticorpo secundário. Em algumas modalidades, os anticorpos primários ou agentes de detecção incluem uma enzima que pode ser usada para reagir com um substrato para gerar um produto visível (*e.g.*, precipitado). Tais enzimas podem incluir, mas não são limitadas a, peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, betagalactosidase, e catalase.

[00430] O anticorpos anti-STn aqui descritos podem ser usados de acordo com métodos imuno-histoquímicos da presente revelação para detectar proteínas STn-glicosiladas em tecidos ou células. Em alguns casos, estes anticorpos são usados para detectar e/ou determinar o nível de STn em tecidos tumorais. Tais tecidos tumorais podem incluir tecidos tumorais incluídos em microarranjos tumorais. Tais tipos de tumor incluem, mas não são limitados a, tumores de mama, de cólon, ovariano, pancreático, de pele, intestinal, de pulmão, e de cérebro Os níveis de anticorpos anti-STn usados em técnicas de coloração imuno-histoquímica podem ser variados para aumentar a coloração visível ou para decrescer os níveis de fundo de coloração. Em algumas modalidades, são usadas concentrações de anticorpo de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 50 µg/mL. Por exemplo, podem ser usadas concentrações de anticorpo de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 1 µg/mL, de cerca de 0,05 µg/mL a cerca de 5 µg/mL, de cerca de 0,1 µg/mL a cerca de 3 µg/mL, de cerca de 1 µg/mL a cerca de 10 µg/mL, de cerca de 2 µg/mL a cerca de 20

µg/mL, de cerca de 3 µg/mL a cerca de 25 µg/mL, de cerca de 4 µg/mL a cerca de 30 µg/mL, ou de cerca de 5 µg/mL a cerca de 50 µg/mL.

[00431] Em algumas modalidades, os métodos diagnósticos da invenção incluem métodos de geração de um perfil de glicoproteínas ligadas ao STn. Como aqui usado, o termo “perfil de glicoproteínas ligadas ao STn” refere-se a um conjunto de informações indicando o nível e/ou a intensidade de glicoproteínas ligadas ao STn em uma amostra ou em um sujeito. Os métodos de geração de um perfil de glicoproteínas ligadas ao STn podem ser realizados em uma amostra obtida de um sujeito. Tais amostras podem ser amostras biológicas incluindo, mas não limitados a, qualquer uma daquelas aqui descritas. As amostras biológicas podem ser amostras celulares. Em alguns casos, as amostras celulares podem incluir pelo menos uma células tumoral. Em algumas modalidades, as amostras de células tumorais podem incluir células tumorais BRCA1 mutantes ou BRCA1 não mutantes.

[00432] As glicoproteínas incluídas nos perfis de glicoproteínas ligadas ao STn podem incluir, mas não são limitadas a, marcadores de células cancerosas, marcadores de células-tronco, e proteínas relacionadas às células-tronco. Em algumas modalidades, as glicoproteínas identificadas e/ou quantificadas como parte de um perfil de glicoproteínas ligadas ao STn podem incluir, mas não são limitadas a, CD44, CD133, CD117, integrina, Notch, e Hedgehog.

[00433] Os níveis e/ou as identidades de glicoproteínas ligadas ao STn nos perfis de glicoproteínas ligadas ao STn podem ser determinados(as) de acordo com qualquer um dos métodos conhecidos na técnica para identificação de proteínas e/ou quantificação de níveis de proteínas. Em algumas modalidades, tais métodos podem incluir, mas não são limitados a, espectrometria de massas, análise de arranjos (*e.g.*, arranjo de anticorpos ou arranjo de proteínas), transferência de Western, citometria de fluxo, imunoprecipitação, e ELISA. As glicoproteínas ligadas ao STn podem, em

alguns casos, ser imunoprecipitadas de uma amostra antes da análise. Tal imunoprecipitação pode ser realizada usando um anticorpo anti-STn. Os anticorpos anti-STn usados para imunoprecipitação de glicoproteínas ligadas ao STn podem incluir quaisquer daqueles conhecidos na técnica ou aqui descritos. Em algumas modalidades, STn-glicoproteínas são imunoprecipitadas de amostras biológicas usando um anticorpo anti-STn e então identificadas e/ou quantificadas usando espectrometria de massas.

[00434] Em algumas modalidades, os tratamentos de cânceres são informados pela informação de perfil de glicoproteínas ligadas ao STn. Consequentemente, a presente revelação provê métodos de tratamento de câncer que incluem obter uma amostra de um sujeito que necessita de tratamento de câncer, gerar um perfil de glicoproteínas ligadas ao STn da amostra, selecionar um anticorpo interagente com glicana que se liga a uma proteína STn-glicosilado do perfil de glicoproteínas ligadas ao STn, e administrar ao sujeito os anticorpos interagentes com glicanas. Os anticorpos interagentes com glicanas administrados de acordo com tais métodos podem incluir uma ou mais CDRs ou um ou mais domínios variáveis aqui ensinados(as).

[00435] Em algumas modalidades, os métodos da presente revelação podem ser usados como diagnósticos complementares. Como aqui usado, o termo “diagnóstico complementar” refere-se a um ensaio, cujos resultados ajudam no diagnóstico ou no tratamento de sujeitos. Os diagnósticos complementares podem ser úteis para estratificação dos níveis de severidade de doença, distúrbio ou condição do paciente, permitindo a modulação do regime de tratamento e da dose para reduzir custos, encurtar a duração de teste clínico, aumentar a segurança e/ou aumentar a eficácia. Os diagnósticos complementares podem ser usados para prever o desenvolvimento de uma doença, um distúrbio ou uma condição e para ajudar na prescrição de terapias preventivas. Alguns diagnósticos complementares podem ser usados para

selecionar sujeitos para um ou mais testes clínicos. Em alguns casos, ensaios diagnósticos complementares podem ocorrer juntamente com um tratamento específico para facilitar a otimização do tratamento.

[00436] Em algumas modalidades, os métodos da presente revelação podem ser úteis como diagnósticos complementares para doenças, distúrbios e/ou condições relacionados(as) com câncer. Alguns diagnósticos complementares da presente invenção podem ser úteis para prever e/ou determinar a severidade de uma ou mais formas de câncer. Alguns diagnósticos complementares da presente invenção podem ser usados para estratificar sujeitos sob risco para desenvolvimento de uma ou mais formas de câncer. Alguns diagnósticos complementares da presente invenção podem ser usados para facilitar ou agilizar o desenvolvimento de fármacos para agentes terapêuticos de câncer.

[00437] Em algumas modalidades, a presente revelação provê métodos de detecção e/ou de quantificação de STn em uma amostra mediante o uso de um anticorpo de captura e um anticorpo de detecção. Como aqui usado, um “anticorpo de captura” é um anticorpo que se liga a um analito em uma maneira que ele pode ser detectado. Anticorpos de captura podem estar associados com superfícies ou outros carreadores. Anticorpos de detecção são anticorpos que facilitam a observação da presença ou ausência de um analito. Em algumas modalidades, ambos anticorpo de captura e anticorpo de detecção ligam-se ao STn. De acordo com tais modalidades, o anticorpo de captura e o anticorpo de detecção podem ser derivados de espécies diferentes. Isto pode permitir o uso de anticorpos secundários que reconhecem apenas o anticorpo de detecção e não são influenciados pela presença do anticorpo de captura. Em algumas modalidades, o anticorpo de captura pode ligar-se ao STn e o anticorpo de detecção pode ligar-se a uma proteína ou a um carreador do STn ligado. Os anticorpos de captura e os anticorpos de detecção usados para detecção de STn em amostras podem ser selecionados dentre anticorpos

anti-STn comercialmente disponíveis e também de quaisquer dos anticorpos anti-STn aqui apresentados.

Células modificadas para a expressão de STn

[00438] Em algumas modalidades, a presente revelação provê células modificadas tendo níveis de STn alterados. Tais células podem ser usadas para vários propósitos (*e.g.*, experimental, terapêutico, teste de anticorpo etc.). Em alguns casos, os métodos da presente revelação incluem métodos de intensificação da expressão de ST6GalNAc I em uma ou mais células ou em um ou mais tecidos. Isto pode resultar na geração de uma ou mais células tendo expressão aumentada de STn celular (*e.g.*, STn expressado na superfície). A expressão de ST6GalNAc I pode ser intensificada, por exemplo, pela introdução de um ou mais vetores contendo um constructo de expressão de ST6GalNAc I. Tais constructos de expressão podem ser desenhados com promotor natural ST6GalNAc I ou com um promotor para intensificar a expressão gênica. Promotores configurados para intensificação de expressão gênica podem ser elementos promotores constitutiva ou excessivamente ativos. Em alguns casos, os promotores podem ser configurados para expressão gênica induzível. Tais promotores podem tornar-se ativos e ter atividade elevada quando contatados com fatores que ativam elementos induzíveis do promotor. Os constructos de expressão de STn podem incluir hST6GalNAc I pRc-CMV como descrito em Julien, S. *et al.*, 2001. *Glycoconj. J.*, 18: 883-93, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências. Em algumas modalidades, os constructos de expressão podem codificar outros fatores envolvidos na síntese de STn e/ou na expressão de STn. Tais fatores podem incluir, mas não são limitados a, T-sintase, e *Core1 Beta3-Galactosyltransferase-Specific Molecular Chaperone* (COSMC) [core-1-beta-3-galactosiltransferase coordenada com chaperona específica]. Em algumas modalidades, células com mínima expressão de STn são convertidas em células expressoras de STn. Tais células

podem incluir, mas não são limitadas a, células SKOV3, células BRCA1 mutantes, e células BRCA1 não mutantes.

[00439] Também são providas células modificadas tendo expressão de STn decrescida relativas às células não modificadas. Consequentemente, os métodos da presente revelação incluem métodos de repressão da expressão de STn. Tais métodos podem incluir a redução da expressão de ST6GalNAc I. Em algumas modalidades, tais métodos podem incluir a administração de uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos que reprimem a expressão de ST6GalNAc I. Tais moléculas de ácidos nucleicos podem incluir, mas não são limitadas a, RNA inibitório (*e.g.*, iRNA ou siRNA silenciador). Em algumas modalidades, outros fatores envolvidos na síntese de STn e/ou na expressão de STn podem ser reduzidos. Tais fatores podem incluir, mas não são limitados a, T-sintase e COSMC. Em algumas modalidades, células naturalmente expressoras de STn são convertidas em células deficientes em STn. Tais células podem incluir, mas não são limitadas a, células OVCAR3 e células OVCAR4.

III. Composições farmacêuticas

[00440] Em algumas modalidades, a presente revelação inclui composições farmacêuticas. Tais composições farmacêuticas podem incluir anticorpos da presente revelação e/ou fragmentos, peptídeos, ou proteínas derivados(as) de tais anticorpos. As composições farmacêuticas podem ser caracterizadas por um(a) ou mais de biodisponibilidade, janela terapêutica e/ou volume de distribuição.

Biodisponibilidade

[00441] Os anticorpos interagentes com glicanas, quando formulados em uma composição com um veículo ou agente de distribuição/formulação como aqui descrito, podem apresentar um aumento de biodisponibilidade em comparação com uma composição que não tem um agente de distribuição como aqui descrito. Como aqui usado, o termo “biodisponibilidade” refere-se à

disponibilidade sistêmica de uma dada quantidade de anticorpos interagentes com glicanas administrada a um mamífero. A biodisponibilidade pode ser avaliada pela medição da área sob a curva (ASC) ou a concentração sérica ou plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) da forma não alterada de um composto após administração do composto a um mamífero. A ASC é uma determinação da representação gráfica de área sob a curva da concentração sérica ou plasmática de um composto ao longo da ordenada (eixo-Y) em função do tempo ao longo da abscissa (eixo-X). Em geral, a ASC para um composto específico pode ser calculada usando métodos conhecidos por aquelas pessoas comumente versadas na técnica e como descritos em G. S. Banker, *Modern Pharmaceutics*, “Drugs and the Pharmaceutical Sciences”, v. 72, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996, aqui incorporado como referência. Em algumas modalidades, a ASC é calculada usando o método trapezoidal linear com interpolação linear/linear. A ASC pode ser expressada em unidades de tempo multiplicadas pela concentração (*i.e.*, unidade de tempo*unidade de massa/unidade de volume). Por exemplo, a ASC pode ser expressada em unidades de dias* $\mu\text{g/mL}$. A fase de eliminação terminal de cada curva de concentração em função do tempo pode ser identificada usando um ou mais valores de concentração final observados. O coeficiente angular da fase de eliminação terminal pode ser determinado usando regressão linear logarítmica sobre dados não ponderados de concentração.

[00442] O valor de $C_{\text{máx}}$ é a concentração máxima do composto alcançada no soro ou no plasma de um sujeito após a administração. O valor de $C_{\text{máx}}$ de um composto específico pode ser medido usando métodos conhecidos por aquelas pessoas comumente versadas na técnica. As frases “aumento de biodisponibilidade” ou “melhoria da farmacocinética”, como aqui usadas, significam que a disponibilidade sistêmica de um anticorpo interagente com glicana, medida como ASC, $C_{\text{máx}}$ ou C_{min} em um mamífero é maior, quando administrado com um agente de distribuição como aqui

descrito, do que quando tal coadministração não ocorre. Em algumas modalidades, a biodisponibilidade dos anticorpos interagentes com glicanas pode aumentar em pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou cerca de 100%.

[00443] Em algumas modalidades, a biodisponibilidade de anticorpos anti-STn pode ser determinada após a administração da composição farmacêutica. Os anticorpos anti-STn podem ser conjugados de anticorpo-fármaco que incluem um agente terapêutico, incluindo, mas não limitado a, qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente terapêutico pode ser um agente citotóxico, incluindo, mas não limitado a, qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente citotóxico pode ser MMAE. O agente citotóxico pode estar unido ao anticorpo por um conector. Composições farmacêuticas da presente revelação podem ser usadas para prover os anticorpos anti-STn a um sujeito, em que os anticorpos anti-STn apresentam uma $C_{\text{máx}}$ de cerca de 1 µg/mL a cerca de 5 µg/mL, de cerca de 2 µg/mL a cerca de 10 µg/mL, de cerca de 3 µg/mL a cerca de 15 µg/mL, de cerca de 4 µg/mL a cerca de 20 µg/mL, de cerca de 5 µg/mL a cerca de 50 µg/mL, de cerca de 20 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, de cerca de 50 µg/mL a cerca de 200 µg/mL, de cerca de 75 µg/mL a cerca de 150 µg/mL, ou de cerca de 100 µg/mL a cerca de 500 µg/mL. As composições farmacêuticas da presente revelação podem ser usadas para prover os anticorpos anti-STn a um sujeito, em que os anticorpos anti-STn apresentam uma ASC (desde o início da administração até a última concentração quantificável observável) de cerca de 1 dia*µg/mL a cerca de 5

dias* $\mu\text{g/mL}$, de cerca de 2 dias* $\mu\text{g/mL}$ a cerca de 10 dias* $\mu\text{g/mL}$, de cerca de 5 dias* $\mu\text{g/mL}$ a cerca de 50 dias* $\mu\text{g/mL}$, de cerca de 20 dias* $\mu\text{g/mL}$ a cerca de 200 dias* $\mu\text{g/mL}$, de cerca de 100 dias* $\mu\text{g/mL}$ a cerca de 500 dias* $\mu\text{g/mL}$, ou de cerca de 250 dias* $\mu\text{g/mL}$ a cerca de 1.000 dias* $\mu\text{g/mL}$.

Janela terapêutica

[00444] O anticorpos interagentes com glicanas, quando formulados em uma composição com um agente de distribuição como aqui descrito, podem apresentar um aumento na janela terapêutica da composição de anticorpo interagente com glicana administrada em comparação com a janela terapêutica da composição de anticorpo interagente com glicana administrada que não tem um agente de distribuição como aqui descrito. Como aqui usada “janela terapêutica” refere-se à faixa de concentrações plasmáticas, ou à faixa de níveis de substância terapeuticamente ativa no sítio de ação, com uma alta probabilidade de induzir um efeito terapêutico. Em algumas modalidades, a janela terapêutica dos anticorpos interagentes com glicanas quando coadministrados com um agente de distribuição, como aqui descrito, pode aumentar em pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou cerca de 100%.

[00445] Em algumas modalidades, a taxa de depuração e/ou a meia-vida do composto pode ser monitorada como um indicador de janela terapêutica. Como aqui usado, o termo “meia-vida” ou “ $t_{1/2}$ ” refere-se ao tempo que demora para um dado processo ou uma dada concentração de composto alcançar a metade de um valor final. A “meia-vida de eliminação terminal” ou

“meia-vida terminal” refere-se ao tempo necessário para a concentração plasmática de um fator ser reduzida pela metade após a concentração do fator ter alcançado um pseudoequilíbrio. Se o declínio em concentração pode ser influenciado por um ou mais fatores independente da eliminação (*e.g.*, taxa de absorção ou taxa de distribuição), a meia-vida observada é chamada de meia-vida “aparente”. Como aqui usado, o termo “taxa de depuração” refere-se à velocidade na qual um composto específico é removido de um fluido ou sistema biológico. Se a taxa pode ser influenciada por um ou mais fatores independente da depuração, a taxa de depuração é chamada de a taxa de depuração “aparente”.

[00446] Em algumas modalidades, a janela terapêutica de anticorpos anti-STn pode ser determinada após a administração da composição farmacêutica. Os anticorpos anti-STn podem ser conjugados de anticorpo-fármaco que incluem um agente terapêutico, incluindo, mas não limitado a, qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente terapêutico pode ser um agente citotóxico, incluindo, mas não limitados a qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente citotóxico pode ser MMAE. O agente citotóxico pode estar unido ao anticorpo por um conector. Composições farmacêuticas da presente revelação podem ser usadas para prover anticorpos anti-STn a um sujeito, em que os anticorpos anti-STn apresentam uma meia-vida aparente de eliminação terminal de cerca de 1 hora a cerca de 10 horas, de cerca de 2 horas a cerca de 12 horas, de cerca de 4 horas a cerca de 24 horas, de cerca de 20 horas a cerca de 30 horas, de cerca de 1 dia a cerca de 5 dias, de cerca de 2 dias a cerca de 14 dias, de cerca de 4 dias a cerca de 21 dias, de cerca de 8 dias a cerca de 28 dias, ou maior que 28 dias. Em algumas modalidades, composições farmacêuticas da presente revelação podem ser usadas para prover anticorpos anti-STn a um sujeito, em que os anticorpos anti-STn apresentam uma taxa de depuração aparente de cerca de 1 mL/kg/dia a cerca de 10 mL/kg/dia, de cerca de 5 mL/kg/dia a cerca de 20 mL/kg/dia, de cerca

de 15 mL/kg/dia a cerca de 50 mL/kg/dia, ou maior que 50 mL/kg/dia.

Volume de distribuição

[00447] Os anticorpos interagentes com glicanas, quando formulados em uma composição com um agente de distribuição como aqui descrito, podem apresentar um volume de distribuição (V_{dist}) melhorado, *e.g.*, reduzido ou que se pretende alcançar, relativo a uma composição que não tem um agente de distribuição como aqui descrito. O volume de distribuição (V_{dist}) refere-se à quantidade do fármaco no corpo em relação à concentração do fármaco no sangue ou plasma. Como aqui usado, o termo “volume de distribuição” refere-se ao volume de fluido que seria requerido para conter a quantidade total do fármaco no corpo na mesma concentração como no sangue ou plasma: V_{dist} é igual à quantidade de fármaco no corpo/concentração de fármaco no sangue ou plasma. Por exemplo, para uma dose de 10 mg e uma concentração plasmática de 10 mg/L, o volume de distribuição seria de 1 litro. O volume de distribuição reflete a extensão na qual o fármaco está presente no tecido extravascular. Um grande volume de distribuição reflete a tendência de um composto para se ligar aos componentes do tecido em comparação com a ligação de proteína plasmática. Em um ambiente clínico, V_{dist} pode ser usado para determinar uma dose de carregamento para alcançar uma concentração no estado de equilíbrio. V_{ss} refere-se ao volume de distribuição aparente no estado de equilíbrio. Em algumas modalidades, o volume de distribuição dos anticorpos interagentes com glicanas quando administrados com um agente de distribuição como aqui descrito pode decrescer pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%.

[00448] Em algumas modalidades, o volume de distribuição de anticorpos anti-STn em um sujeito pode ser determinado após a administração da composição farmacêutica. Os anticorpos anti-STn podem ser conjugados de anticorpo-fármaco que incluem um agente terapêutico, incluindo, mas não limitados a qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente terapêutico pode ser um agente citotóxico, incluindo, mas não limitados a qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente citotóxico pode ser MMAE. O agente citotóxico pode estar unido ao anticorpo por um conector. Composições farmacêuticas da presente revelação podem ser usadas para prover os anticorpos anti-STn a um sujeito, em que os anticorpos anti-STn apresentam um V_{ss} aparente de cerca de 1 mL/kg a cerca de 10 mL/kg, de cerca de 5 mL/kg a cerca de 50 mL/kg, de cerca de 20 mL/kg a cerca de 100 mL/kg, de cerca de 75 mL/kg a cerca de 150 mL/kg, ou maior que 150 mL/kg.

[00449] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas compreendem composições e/ou complexos em combinação com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis. As composições farmacêuticas podem opcionalmente compreender uma ou mais substâncias ativas adicionais, *e.g.* substâncias terapêutica e/ou profilaticamente ativas. Considerações gerais sobre a formulação e/ou a fabricação de agentes farmacêuticos podem ser encontradas, por exemplo, em “Remington: The Science and Practice of Pharmacy” 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (aqui incorporado como referência).

[00450] Em algumas modalidades, as composições são administradas a humanos, pacientes humanos ou sujeitos humanos. Para os propósitos da presente revelação, a frase “ingrediente ativo” refere-se, em geral, aos anticorpos interagentes com glicanas a serem distribuídos como aqui descrito.

[00451] Embora as descrições de composições farmacêuticas aqui providas sejam principalmente direcionadas para composições farmacêuticas que são adequadas para administração a humanos, será entendido pelo técnico

versado que tais composições são, em geral, adequadas para administração a qualquer outro animal, *e.g.*, a animais não humanos, *e.g.* mamíferos não humanos. Modificação de composições farmacêuticas adequadas para administração a humanos com o propósito de tornar as composições adequadas para administração a vários animais é bem entendida, e o farmacologista veterinário comumente versado pode desenhar e/ou realizar tal modificação com experimentação meramente comum, se houver. Os sujeitos para os quais é considerada a administração das composições farmacêuticas incluem, mas não são limitados a, humanos e/ou outros primatas; mamíferos, incluindo mamíferos comercialmente relevantes como gado, porcos, cavalos, ovelhas, gatos, cães, camundongos, e/ou ratos; e/ou aves comercialmente relevantes como aves domésticas, frangos, patos, gansos, e/ou perus.

[00452] As formulações das composições farmacêuticas aqui descritas podem ser preparadas por qualquer método conhecido ou futuramente desenvolvidas na técnica de farmacologia. Em geral, tais métodos preparatórios incluem a etapa de colocar o ingrediente ativo em associação com um excipiente e/ou um ou mais outros ingredientes acessórios, e então, se necessário e/ou desejável, dividir, moldar e/ou embalar o produto em uma unidade de dose única ou de doses múltiplas.

[00453] Uma composição farmacêutica de acordo com a invenção pode ser preparada, embalada, e/ou vendida a granel, como uma dose unitária única, e/ou como uma pluralidade de doses unitárias únicas. Como aqui usada, uma “dose unitária” é quantidade discreta da composição farmacêutica compreendendo uma quantidade predeterminada do ingrediente ativo. A quantidade do ingrediente ativo é, em geral, igual à dosagem do ingrediente ativo que seria administrada a um sujeito e/ou uma fração conveniente de uma tal dosagem como, por exemplo, metade ou um terço de uma tal dosagem.

[00454] Quantidades relativas do ingrediente ativo, do excipiente farmacêuticamente aceitável, e/ou de quaisquer ingredientes adicionais em

uma composição farmacêutica de acordo com a invenção variarão, dependendo da identidade, do tamanho, e/ou da condição do sujeito tratado e ainda dependendo da rota pela qual a composição é para ser administrada. À guisa de exemplo, a composição pode compreender entre 0,1% e 100%, *e.g.*, entre 0,5% e 50%, entre 1% e 30%, entre 5% e 80%, ou pelo menos 80% (p/p) de ingrediente ativo. Em uma modalidade, os ingrediente ativos são anticorpos direcionados para células cancerosas.

Formulação

[00455] Os anticorpos interagentes com glicanas da [sic] podem ser formulados usando um ou mais excipientes para: (1) aumentar a estabilidade; (2) aumentar a permeabilidade celular; (3) permitir a liberação prolongada ou retardada (*e.g.*, de uma formulação dos anticorpos interagentes com glicanas); e/ou (4) alterar a biodistribuição (*e.g.*, direcionar os anticorpos interagentes com glicanas para tecidos ou tipos de células específicos). Além dos excipientes tradicionais como todos e cada um de solventes, meios de dispersão, diluentes, ou outros veículos líquidos, auxiliares de dispersão ou suspensão, agentes ativos de superfície, agentes isotônicos, agentes espessantes ou emulsificadores, conservantes, as formulações da presente invenção podem incluir, sem limitação, lipossomas, nanopartículas lipídicas, polímeros, lipoplexos, nanopartículas de núcleo/película, peptídeos, proteínas, células transfectadas com anticorpos interagentes com glicanas (*e.g.*, para transplantação em um sujeito) e combinações dos mesmos.

Excipientes

[00456] Como aqui usado, o termo “excipiente” refere-se a qualquer substância combinada com um composto e/ou uma composição da invenção antes do uso. Em algumas modalidades, os excipientes são inativos e usados principalmente como um carreador, diluente ou veículo para um composto e/ou uma composição da presente invenção. Vários excipientes para formular composições farmacêuticas e técnicas para preparar a composição são

conhecidos na técnica (consulte “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; aqui incorporado como referência).

[00457] O uso de um meio excipiente convencional é considerado dentro do escopo da presente revelação, exceto na medida em que qualquer meio excipiente convencional possa ser incompatível com uma substância ou seus derivados, como pela produção de algum efeito biológico indesejável ou pela interação, de outro modo, em uma maneira prejudicial com qualquer outro (quaisquer outros) componente(s) da composição farmacêutica.

[00458] As formulações das composições farmacêuticas aqui descritas podem ser preparadas por qualquer método conhecido ou futuramente desenvolvido na técnica de farmacologia. Em geral, tais métodos preparatórios incluem a etapa de associar o ingrediente ativo com um excipiente e/ou um ou mais outros ingredientes acessórios.

[00459] Uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção pode ser preparada, embalada, e/ou vendida a granel, como uma dose unitária única e/ou como uma pluralidade de doses unitárias únicas.

[00460] As quantidades relativas do ingrediente ativo, do excipiente farmacêuticamente aceitável, e/ou quaisquer ingredientes adicionais em uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção podem variar, dependendo da identidade, do tamanho, e/ou da condição do sujeito sendo tratada e dependendo, ainda, da rota de administração pela qual uma composição é para ser administrada.

[00461] Em algumas modalidades, um excipiente farmacêuticamente aceitável é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% puro. Em algumas modalidades, um excipiente é aprovado para uso em humanos e para uso veterinário. Em algumas modalidades, um excipiente é aprovado pela Administração de Alimentos e Fármacos dos Estados Unidos (*U.S. Food and Drug*

Administration). Em algumas modalidades, um excipiente é de grau farmacêutico. Em algumas modalidades, um excipiente atende às normas da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, *United States Pharmacopoeia*), da Farmacopeia Europeia (EP, *European Pharmacopoeia*), da Farmacopeia Britânica (*British Pharmacopoeia*), e/ou da Farmacopeia Internacional (*International Pharmacopoeia*).

[00462] Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis usados na fabricação de composições farmacêuticas incluem, mas não são limitados a, diluentes inertes, agentes dispersantes e/ou granulantes, agentes ativos de superfície e/ou emulsificadores, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes tamponantes, agentes lubrificantes, e/ou óleos. Tais excipientes podem estar opcionalmente incluídos em composições farmacêuticas.

[00463] Diluentes exemplificadores incluem, mas não são limitados a, carbonato de cálcio, carbonato de sódio, fosfato de cálcio, fosfato de dicálcio, sulfato de cálcio, hidrogenofosfato de cálcio, fosfato de sódio, lactose, sacarose, celulose, celulose microcristalina, caulim, manitol, sorbitol, inositol, cloreto de sódio, amido seco, amido de milho, açúcar em pó, etc., e/ou combinações dos mesmos.

[00464] Agentes granulantes e/ou dispersantes exemplificadores incluem, mas não são limitados a, amido de batata, amido de milho, amido de tapioca, amidoglicolato de sódio, argilas, ácido algínico, goma guar, polpa cítrica, ágar, bentonita, celulose e produtos de madeira, esponja natural, resinas de troca catiônica, carbonato de cálcio, silicatos, carbonato de sódio, polivinilpirrolidona reticulada) (crospovidona), carboximetilamido de sódio (amidoglicolato de sódio), carboximetilcelulose, carboximetilcelulose sódica reticulada (croscarmellose), metilcelulose, amido pré-gelatinizado (amido 1500), amido microcristalino, amido insolúvel em água, carboximetilcelulose cálcica, silicato de alumínio e magnésio (VEEGUM®), laurilsulfato de sódio,

compostos de amônio quaternário, etc., e/ou combinações dos mesmos.

[00465] Agentes ativos de superfície e/ou emulsificadores exemplificadores incluem, mas não são limitados a, emulsificadores naturais (*e.g.* acácia, ágar, ácido algínico, alginato de sódio, tragacanto, *chondrux*, colesterol, xantana, pectina, gelatina, gema de ovo, caseína, lanolina, colesterol, cera, e lecitina), argilas coloidais (*e.g.* bentonita [silicato de alumínio] e VEEGUM® [silicato de alumínio e magnésio]), derivados de aminoácido de cadeia longa, álcoois de peso molecular alto (*e.g.* álcool estearílico, álcool cetílico, álcool oleílico, monoestearato de tricetina, diestearato de glicol etilênico, monoestearato de glicerila, e monoestearato de glicol propilênico, poli(álcool vinílico)), carbômeros (*e.g.* carboxipolimetileno, poli(ácido acrílico), polímero de ácido acrílico, e polímero carboxivinílico), carragenana, derivados celulósicos (*e.g.* carboximetilcelulose sódica, celulose em pó, hidroximetilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose), ésteres de sorbitano - ácido graxo (*e.g.* monolaurato de polioxietilenossorbitano [TWEEN®20], polioxietilenossorbitano [TWEENn®60], monooleato de polioxietilenossorbitano [TWEEN®80], monopalmitato de sorbitano [SPAN®40], monoestearato de sorbitano [Span®60], triestearato de sorbitano [Span®65], monooleato de glicerila, monooleato de sorbitano [SPAN®80]), ésteres de polioxietileno (*e.g.* monoestearato de polioxietileno [MYRJ®45], óleo de rícino hidrogenado, óleo de rícino polietoxilado, estearato de polioximetileno, e SOLUTOL®), ésteres de sacarose - ácido graxo, ésteres de poli(glicol etilênico) - ácido graxo (*e.g.* CREMOPHOR®), éteres de polioxietilenos, (*e.g.* éter polioxietilenolaurílico [BRIJ®30]), poli(vinilpirrolidona), monolaurato de glicol dietilênico, oleato de trietanolamina, oleato de sódio, oleato de potássio, oleato de etila, ácido oleico, laurato de etila, laurilsulfato de sódio, PLUORINC®F 68, POLOXAMER®188, brometo de cetrimônio, cloreto de cetilpiridínio, cloreto

de benzalcônio, docusato de sódio, etc. e/ou combinações dos mesmos.

[00466] Agentes aglutinantes exemplificadores incluem, mas não são limitados a, amido (*e.g.* amido de milho e pasta de amido); gelatina; açúcares (*e.g.* sacarose, glicose, dextrose, dextrina, melão, lactose, lactitol, manitol); gomas naturais e sintéticas (*e.g.* acácia, alginato de sódio, extrato de musgo-da-irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucilagem de cascas de isapol, carboximetilcelulose, metilcelulose, etilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina, acetato de celulose, polivinilpirrolidona), silicato de alumínio e magnésio (Veegum®), e arabogalactana de lariço); alginatos; poli(óxido de etileno); poli(glicol etilênico); sais inorgânicos de cálcio; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; água; álcool; etc.; e combinações dos mesmos.

[00467] Conservantes exemplificadores podem incluir, mas não são limitados a, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes alcoólicos, conservantes ácidos, e/ou outros conservantes. Antioxidantes exemplificadores incluem, mas não são limitados a, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabissulfito de potássio, ácido propiônico, galato de propila, ascorbato de sódio, bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio, e/ou sulfito de sódio. Agentes quelantes exemplificadores incluem ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA, *Etilenediaminatetraacetic Acid*), ácido cítrico mono-hidrato, edetato dissódico, edetato dipotássico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato sódico, ácido tartárico, e/ou edetato trissódico. Conservantes antimicrobianos exemplificadores incluem, mas não são limitados a, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, álcool benzílico, bronopol, cetrimida, cloreto de cetilpiridínio, clorexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, álcool etílico, glicerina, hexetidina, imidureia, fenol, fenoxietanol, álcool feniletílico, nitrato fenilmercúrico,

glicol propilênico, e/ou timerosal. Conservantes antifúngicos exemplificadores incluem, mas não são limitados a, butilparabeno, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potássio, sorbato de potássio, benzoato de sódio, propionato de sódio, e/ou ácido sórbico. Conservantes alcoólicos exemplificadores incluem, mas não são limitados a, etanol, poli(glicol etilênico), fenol, compostos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato, e/ou álcool feniletílico. Conservantes ácidos exemplificadores incluem, mas não são limitados a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido desidroacético, ácido ascórbico, ácido sórbico, e/ou ácido fítico. Outros conservantes incluem, mas não são limitados a, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA, *Butylated HydroxyAnisol*), hidroxitolueno butilado (BHT, *Butylated HydroxyToluene*), etilenodiamina, laurilsulfato de sódio (SLS, *Sodium Lauryl Sulfate*), laurilétersulfato de sódio (SLES, *Sodium Lauryl Ether Sulfate*), bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de potássio, metabissulfito de potássio, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, metilparabeno, GERMALL®115, GERMABEN®II, NEOLONE™, KATHON™, e/ou EUXYL®.

[00468] Agentes tamponantes exemplificadores incluem, mas não são limitados a, soluções tamponantes de citrato, soluções tamponantes de acetato, soluções tamponantes de fosfato, cloreto de amônio, carbonato de cálcio, cloreto de cálcio, citrato de cálcio, glubionato de cálcio, gluceptato de cálcio, gliconato de cálcio, ácido D-glicônico, glicerofosfato de cálcio, lactato de cálcio, ácido propanoico, levulinato de cálcio, ácido pentanoico, fosfato de cálcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de cálcio tribásico, hidróxido fosfato de cálcio, acetato de potássio, cloreto de potássio, gliconato de potássio, misturas de potássio [sic], fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, misturas de fosfato de potássio, acetato de sódio, bicarbonato de

sódio, cloreto de sódio, citrato de sódio, lactato de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, misturas de fosfato de sódio, trometamina, hidróxido de magnésio, hidróxido de alumínio, ácido algínico, água isenta de pirogênio, solução salina isotônica, solução de Ringer, álcool etílico, etc., e/ou combinações dos mesmos.

[00469] Agentes lubrificantes exemplificadores incluem, mas não são limitados a, estearato de magnésio, estearato de cálcio, ácido esteárico, sílica, talco, malte, beenato de glicerila, óleos vegetais hidrogenados, poli(glicol etilênico), benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio, leucina, laurilsulfato de magnésio, laurilsulfato de sódio, etc., e combinações dos mesmos.

[00470] Óleos exemplificadores incluem, mas não são limitados a, óleos de amêndoa, semente de damasco, abacate, babaçu, bergamota, semente de groselheira preta, borragem, cade, camomila, canola, alcaravia, carnaúba, rícino, canela, manteiga de cacau, coco, fígado de bacalhau, café, milho, semente de algodoeiro, emu, eucalipto, prímula da noite, peixe, semente de linheiro, geraniol, cabaceira, semente de videira, avelã, hissopo, miristato de isopropila, jojoba, noqueira-de-iguape, lavandina, lavândula, limão, *Litsea cubeba*, noz de macadâmia, malva, caroço de mangueira, semente de *meadowfoam* (*Limnanthes*), visom, noz-moscada, oliva, laranja, peixe-relógio [*orange roughy* (*Hoplostethus atlanticus*)], palma, caroço de palma, semente de pessegueiro, amendoim, semente de papoula, semente de aboboreira, semente de colza, farelo de arroz, alecrim, cártamo, sândalo, sasquana, segurelha, *sea buckthorn* [espinheiro marítimo (*Hippophae rhamnoides*)], gergelim, manteiga de *Butyrospermum parkii* (*Shea*), silicone, feijão-soja, girassol, melaleuca, cardo, *tsubaki*, vetiver, noz de noqueira, e germe de trigo. Óleos exemplificadores incluem, mas não são limitados a, estearato de butila, triglicerídeo caprílico, triglicerídeo cáprico, ciclometicona, sebacato de dietila, dimeticona 360, miristato de isopropila, óleo mineral, octildodecanol,

álcool olefílico, óleo de silicone, e/ou combinações dos mesmos.

[00471] Excipientes como manteiga de cacau e ceras para supositório, agentes colorantes, agentes adoçantes, flavorizantes, e/ou perfumantes podem estar presentes na composição, de acordo com o julgamento do formulador.

[00472] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente revelação são formulados com pelo menos um excipiente. Os anticorpos podem ser anticorpos anti-STn. Os anticorpos podem ser conjugados de anticorpo-fármaco que incluem um agente terapêutico, incluindo, mas não limitados a qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente terapêutico pode ser um agente citotóxico, incluindo, mas não limitados a qualquer um daqueles aqui apresentados. O agente citotóxico pode ser MMAE. O agente citotóxico pode estar unido ao anticorpo por um conector.

Veículos

Lipossomas, lipoplexos e nanopartículas lipídicas

[00473] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser formulados usando um(a) ou mais lipossomas, lipoplexos, ou nanopartículas lipídicas. Em uma modalidade, as composições farmacêuticas compreendendo anticorpos interagentes com glicanas compreendem, ainda, lipossomas. Os lipossomas são vesículas artificialmente preparadas que podem compreender principalmente uma ou mais bicamadas lipídicas e podem ser usados como um veículo de distribuição para a administração de nutrientes e formulações farmacêuticas. Os lipossomas podem ser de tamanhos diferentes como, mas não limitados a, uma vesícula multilamelar (MLV, *Multilamellar Vesicle*) que pode ser centenas de nanômetros em diâmetro e pode conter uma série de bicamadas concêntricas separadas por compartimentos aquosos estreitos, e uma vesícula unicelular pequena (SUV, *Small Unicellular Vesicle*) que pode ser menor que 50 nm em diâmetro, e uma vesícula unilamelar grande (LUV, *Large Unilamellar Vesicle*) que pode estar entre 50 nm e 500 nm em diâmetro. O desenho de lipossoma pode incluir,

mas não é limitado a, opsoninas ou ligantes com o propósito de melhorar a fixação de lipossoma em tecido não saudável ou para ativar eventos como, mas não limitados a, endocitose. Os lipossomas podem conter um pH baixo ou alto com a finalidade de melhorar a distribuição das formulações farmacêuticas.

[00474] A formação de lipossomas pode depender das características físico-químicas como, mas não limitadas a, a formulação farmacêutica capturada e os ingredientes lipossomais, a natureza do meio no qual as vesículas lipídicas são dispersadas, a concentração eficaz da substância capturada e sua toxicidade potencial, quaisquer processos adicionais durante a aplicação e/ou a distribuição das vesículas, o tamanho de otimização, a polidispersidade e o prazo de validade das vesículas para a aplicação pretendida, e a reprodutibilidade de batelada para batelada e a possibilidade de produção em grande escala de produtos lipossomais seguros e eficazes.

[00475] Em uma modalidade tais formulações podem também ser construídas ou composições alteradas de modo que elas passiva ou ativamente sejam direcionadas para diferentes tipos de células *in vivo*.

[00476] As formulações podem também ser seletivamente direcionadas mediante a expressão de ligantes diferentes sobre a superfície delas como exemplificados por, mas não limitados por, folato, transferrina, N-acetilgalactosamina (GalNAc), e abordagens direcionadas para anticorpos.

[00477] Os lipossomas, os lipoplexos, ou as nanopartículas lipídicas podem ser usados(as) para melhorar a eficácia da função de anticorpos interagentes com glicanas porque estas formulações podem ser capazes de aumentar a transfecção celular com anticorpos interagentes com glicanas. Os lipossomas, os lipoplexos, ou as nanopartículas lipídicas podem também ser usados(as) para aumentar a estabilidade de anticorpos interagentes com glicanas.

[00478] Os lipossomas que são especificamente formulados para a

carga de anticorpo são preparados de acordo com técnicas conhecidas na técnica, como descritas por Eppstein *et al.* (Eppstein, D.A. *et al.*, “Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985 Jun; 82(11):3688-92); Hwang *et al.* (Hwang, K.J. *et al.*, “Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980 Jul; 77(7):4030-4); US 4.485.045 e US 4.544.545. A produção de lipossomas com tempo de circulação prolongado é também descrita em US 5.013.556.

[00479] Os lipossomas compreendendo anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser gerados usando evaporação em fase reversa utilizando lipídios como fosfatidilcolina, colesterol e também fosfatidiletanolamina que têm sido derivados com poli(glicol etilênico). Filtros com tamanho de poro definido são usados para extrusar lipossomas do diâmetro desejado. Em outra modalidade, os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser conjugados com a superfície externa de lipossomas por reação de intertroca de dissulfeto como descrita por Martin *et al.* (Martin, F.J. *et al.*, “Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting”. *J. Biol. Chem.* 1982 Jan 10; 257(1):286-8).

Polímeros e nanopartículas

[00480] Os anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem ser formulados usando polímeros naturais e/ou sintéticos. Exemplos não limitadores de polímeros que podem ser usados para distribuição incluem, mas não são limitados a, polímeros de DMRI/DOPE, poloxâmero, quitosana, ciclodextrina, e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA, *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)*). Estes podem ser biodegradáveis.

[00481] A formulações de polímero pode permitir a liberação prolongada ou retardada de anticorpos interagentes com glicanas (*e.g.*, após

injeção intramuscular ou subcutânea). O perfil de liberação alterado para anticorpos interagentes com glicanas pode resultar, por exemplo, na liberação dos anticorpos interagentes com glicanas durante um período de tempo prolongado. A formulação de polímero pode também ser usada para aumentar a estabilidade de anticorpos interagentes com glicanas.

[00482] As formulações de polímero podem também ser seletivamente direcionadas mediante a expressão de ligantes diferentes como exemplificados por, mas não limitados por, folato, transferrina, e N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Benoit *et al.*, *Biomacromolecules*. 2011 12:2708-2714; Rozema *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007 104:12982-12887; Davis, *Mol. Pharm.* 2009 6:659-668; Davis, *Nature* 2010 464:1067-1070; aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00483] O anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem também ser formulados como nanopartículas usando uma combinação de polímeros, lipídios, e/ou outros agentes biodegradáveis, como, mas não limitados a, fosfato de cálcio. Os componentes podem ser combinados em uma arquitetura de núcleo-película, híbrida, e/ou de camada-por-camada, para permitir a ajuste fino da nanopartícula de modo que a distribuição de anticorpos interagentes com glicanas possa ser intensificada. Para anticorpos interagentes com glicanas, podem ser usados sistemas com base em poli(2-(metacriloiloxi)etilfosforilcolina)-bloco-(metacrilato de 2-(diisopropilamino)etila), (PMPC-PDPA, *Poly(2-(Methacryloyloxy)Ethyl Phosphorylcholine)-Block-(2-(Diisopropylamino)Ethyl Methacrylate)*), um copolímero em dibloco sensível ao pH que se autoassocia para formar vesículas nanodimensionadas, também conhecidas como polymersomas, em pH fisiológico. Tem sido mostrado que estes polymersomas distribuem com sucesso cargas úteis de anticorpo relativamente altas dentro de células vivas. (Massignani, *et al.*, “Cellular delivery of antibodies: effective targeted subcellular imaging and new therapeutic tool. *Nature Proceedings*, May,

2010).

[00484] Em uma modalidade, um PEG-polímero-trocador-de-carga (*PEG-charge-conversional polymer*) (Pitella *et al.*, *Biomaterials*. 2011 32:3106-3114) pode ser usado para formar uma nanopartícula para distribuir anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção. O PEG-polímero-trocador-de-carga pode melhorar os copolímeros em bloco de PEG-poliânion ao ser clivado em um polycation em pH ácido, intensificando, assim, o escape endossomal.

[00485] O uso de nanopartículas de núcleo-película tem adicionalmente focado uma abordagem de alto desempenho para sintetizar núcleos de nanogel reticulado catiônico e várias películas (Siegwart *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011 108:12996-13001). As complexação, distribuição, e internalização das nanopartículas poliméricas podem ser precisamente controladas pela alteração da composição química em ambos os componentes núcleo e película da nanopartícula.

[00486] Em uma modalidade, matrizes de poli(etileno-co-acetato de vinila), são usadas para distribuir anticorpos interagentes com glicanas da invenção. Tais matrizes são descritas em *Nature Biotechnology* 10, 1446 - 1449 (1992).

Formulações de anticorpo

[00487] Os anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem ser formulados para administração intravenosa ou administração extravascular (Daugherty, *et al.*, "Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006 Aug 7; 58(5-6):686-706, Publicação de Patente U.S. nº 2011/0135570, todas as quais são aqui incorporadas em suas totalidades como referências). Rotas de administração extravascular podem incluir, mas não são limitadas a, administração subcutânea, administração intraperitoneal, administração intracerebral, administração intraocular, administração intralesional, administração tópica e

administração intramuscular.

[00488] As estruturas de anticorpo podem ser modificadas para melhorar a eficácia delas como agentes terapêuticos. As melhorias podem incluir, mas não são limitadas a, estabilidade termodinâmica melhorada, propriedades de ligação ao receptor Fc reduzida e eficiência de enovelamento melhorada. As modificações podem incluir, mas não são limitadas a, substituições de aminoácidos, glicosilação, palmitoilação e conjugação com proteína.

[00489] Os anticorpos interagentes com glicanas podem ser formulados com antioxidantes para reduzir a oxidação de anticorpo, os anticorpos interagentes com glicanas podem também ser formulados com aditivos para reduzir a agregação de proteína. Tais aditivos podem incluir, mas não são limitados a, albumina, aminoácidos, açúcares, ureia, cloreto de guanidínio, poliálcoois, polímeros (como poli(glicol etilênico) e dextranas), tensoativos (incluindo, mas não limitados a, polissorbato 20 e polissorbato 80) ou mesmo outros anticorpos.

[00490] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser formulados para reduzir a influência da água sobre a estrutura e função do anticorpo. As preparações de anticorpo em tais formulação podem ser liofilizadas. As formulações submetidas à liofilização podem incluir carboidratos ou compostos de poliol para proteger e estabilizar a estrutura do anticorpo. Tais compostos incluem, mas não são limitados a, sacarose, trealose e manitol.

[00491] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser formulados com polímeros. Em uma modalidade, as formulações de polímero podem conter polímeros hidrofóbicos. Tais polímeros podem ser microesferas formuladas com poli(lactídeo-co-glicolídeo) mediante um método de encapsulação de sólido-em-óleo-em-água. Microesferas compreendendo copolímero de etileno-acetato de vinila são também

consideradas para a distribuição de anticorpo e podem ser usadas para prolongar o curso de tempo de liberação de anticorpo no sítio de distribuição. Em outra modalidade, os polímeros podem ser géis aquosos. Tais géis podem, por exemplo, compreender carboximetilcelulose. Os géis aquosos podem também compreender hidrogel de ácido hialurônico. Os anticorpos podem ser covalentemente ligados a tais géis mediante uma ligação de hidrazona que permite a distribuição prolongada em tecidos, incluindo mas não limitados aos, tecidos do sistema nervoso central.

Formulações com peptídeos e proteínas

[00492] Os anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem ser formulados com peptídeos e/ou proteínas. Em uma modalidade, os peptídeo como, mas não limitados a, peptídeos e proteínas penetrantes em célula e peptídeos que permitem distribuição intracelular podem ser usados para distribuir formulações farmacêuticas. Um exemplo não limitador de um peptídeo penetrante em célula que pode ser usado com as formulações farmacêuticas da presente invenção inclui uma sequência de peptídeo penetrante em célula ligada a polycations que facilita a distribuição para o espaço intracelular, *e.g.*, peptídeo TAT derivado de HIV, penetratins, transportans, ou peptídeos penetrantes em célula derivados de hCT (consulte, *e.g.*, Caron *et al.*, *Mol. Ther.* 3(3):310-8 (2001); Langel, “Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications” (CRC Press, Boca Raton FL, 2002); El-Andaloussi *et al.*, *Curr. Pharm. Des.* 11(28):3597-611 (2003); e Deshayes *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 62(16): 1839-49 (2005), todos os quais são aqui incorporados como referências). As composições podem ser também formuladas para incluir um agente penetrante em célula, *e.g.*, lipossomas, que intensifica a distribuição das composições para o espaço intracelular. Os anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem ser complexado com peptídeos e/ou proteínas como, mas não limitados a, peptídeos e/ou proteínas da Aileron Therapeutics (Cambridge, MA) e da Permeon Biologies

(Cambridge, MA) com o propósito de permitir distribuição intracelular (Cronican *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 2010 5:747-752; McNaughton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009 106:6111-6116; Sawyer, *Chem. Biol. Drug Des.* 2009 73:3-6; Verdine e Hilinski, *Methods Enzymol.* 2012; 503:3-33; todos os quais são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00493] Em uma modalidade, o polipeptídeo penetrante em célula pode compreender um primeiro domínio e um segundo domínio. O primeiro domínio pode compreender um polipeptídeo supercarregado. O segundo domínio pode compreender um parceiro de ligação de proteína. Como aqui usado, “parceiro de ligação de proteína” inclui, mas não é limitado aos, anticorpos e fragmentos funcionais dos mesmos, proteínas de arcabouço, ou peptídeos. O polipeptídeo penetrante em célula pode compreender, ainda, um parceiro de ligação intracelular para o parceiro de ligação de proteína. O polipeptídeo penetrante em célula pode ser capaz de ser secretado de uma célula onde podem ser introduzidos os anticorpos interagentes com glicanas.

[00494] Em formulações da presente invenção, peptídeos ou proteínas podem ser incorporados(as) para aumentar a transfecção celular por anticorpos interagentes com glicanas ou alterar a biodistribuição de anticorpos interagentes com glicanas (*e.g.*, pelo reconhecimento de tipos de células ou tecidos específicos).

Formulações com base em células

[00495] Formulações com base em células de composições de anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem ser usadas para garantir transfecção celular (*e.g.*, na barreira celular) ou alterar a biodistribuição das composições (*e.g.*, pelo reconhecimento de carreador celular para tipos de células ou tecidos específicos).

Métodos de transferência para célula

[00496] Uma variedade de métodos são conhecidas na técnica e são adequados para introdução de ácidos nucleicos ou proteínas, como anticorpos

interagentes com glicanas, para dentro de uma célula, incluindo técnicas mediadas por virais e não mediadas por vírus. Exemplos de típicas técnicas não mediadas por vírus incluem, mas não são limitados a, eletroporação, transferência mediada por fosfato de cálcio, nucleofecção, sonoporação, choque térmico, magnetofecção, transferência mediada por lipossoma, microinjeção, transferência mediada por microprojétil (nanopartículas), transferência mediada por polímero catiônico (DEAE-dextrana, polietilenimina, poli(glicol etilênico) (PEG) e semelhantes) ou fusão celular.

[00497] A técnica de sonoporação, ou de sonicação celular, é o uso de som (*e.g.*, frequências ultrassônicas) para modificar a permeabilidade da membrana plasmática celular. Métodos de sonoporação são conhecidos por aquelas pessoas versadas na técnica e são usados para distribuir ácidos nucleicos *in vivo* (Yoon e Park, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2010 7:321-330; Postema e Gilja, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2007 8:355-361; Newman e Bettinger, *Gene Ther.* 2007 14:465-475; todos os quais são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Os métodos de sonoporação são conhecidos na técnica e são também ensinados, por exemplo, no que se refere às bactérias em Publicação de Patente U.S. nº 20100196983 e no que se refere a outros tipos de células em, por exemplo, Publicação de Patente U.S. nº 20100009424, cada uma das quais é aqui incorporada em sua totalidade como referência.

[00498] Técnicas de eletroporação são também bem conhecidas na técnica e são usadas para distribuir ácidos nucleicos *in vivo* e clinicamente (Andre *et al.*, *Curr. Gene Ther.* 2010 10:267-280; Chiarella *et al.*, *Curr. Gene Ther.* 2010 10:281-286; Hojman, *Curr. Gene Ther.* 2010 10:128-138; todos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Em uma modalidade, os anticorpos interagentes com glicanas podem ser distribuídos por eletroporação.

Administração e distribuição

[00499] As composições da presente revelação podem ser administradas por qualquer um(a) dos(as) métodos ou rotas padrão conhecidos(as) na técnica.

[00500] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente revelação podem ser administrados por qualquer rota que resulta em uma evolução terapeuticamente eficaz. Estas incluem, mas não são limitadas a, administração enteral, gastroenteral, epidural, oral, transdérmica, epidural (peridural), intracerebral (para dentro do cérebro), intracerebroventricular (para dentro dos ventrículos cerebrais), epicutânea (aplicação sobre a pele), intradérmica (para dentro da própria pele), subcutânea (sob a pele), nasal (através do nariz), intravenosa (para dentro de uma veia), intra-arterial (para dentro de uma artéria), intramuscular (para dentro de um músculo), intracardíaca (para dentro do coração), infusão intraóssea (para dentro da medula óssea), intratecal (para dentro do canal espinhal), intraperitoneal, (infusão ou injeção para dentro do peritônio), infusão intravesical, intravítrea, (através do olho), injeção intracavernosa (para dentro da base do pênis), administração intravaginal, intrauterina, administração extra-amniótica, transdérmica (difusão através da pele intacta para distribuição sistêmica), transmucosal (difusão através de uma membrana mucosa), insuflação (inalação), sublingual, sublabial, enema, colírio (sobre a conjuntiva), ou em gotas para ouvido. Em modalidades específicas, as composições podem ser administradas em uma maneira que permite que elas atravessem a barreira hematoencefálica, barreira vascular, ou outra barreira epitelial. Rotas de administração não limitadoras para os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção são descritas abaixo.

Administrações parenteral e injetável

[00501] As formas de dosagem líquidas para administrações oral e parenteral incluem, mas não são limitadas a, emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes, e/ou elixires farmaceuticamente aceitáveis.

Além dos ingrediente ativos, as formas de dosagem líquidas podem compreender diluentes inertes comumente usados na técnica como, por exemplo, água ou outros solventes, agentes solubilizantes e emulsificadores como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, glicol propilênico, glicol 1,3-butilênico, dimetilformamida, óleos (em particular, óleos de semente de algodoeiro, amendoim, milho, germe, oliva, rícino, e gergelim), glicerol, álcool tetra-hidrofurfurílico, poli(glicóis etilênicos) e ésteres de ácido graxo de sorbitano, e misturas dos mesmos. Além de diluentes inertes, composições orais podem incluir adjuvantes como agentes umectantes, agentes emulsificadores e suspensores, adoçantes, flavorizantes, e/ou perfumantes. Em determinadas modalidades para administração parenteral, composições são misturadas com agentes solubilizantes como CREMOPHOR®, álcoois, óleos, óleos modificados, glicóis, polissorbatos, ciclodextrinas, polímeros, e/ou combinações dos mesmos. Em outras modalidades, tensoativos são incluídos como hidroxipropilcelulose.

[00502] Preparações injetáveis, por exemplo, suspensões oleosas ou aquosas injetáveis estéreis podem ser formuladas de acordo com a técnica conhecida usando agentes dispersantes, agentes umectantes, e/ou agentes suspensores adequados. Preparações injetáveis estéreis podem ser soluções, suspensões e/ou emulsões injetáveis estéreis em diluentes e/ou solventes parenteralmente aceitáveis, por exemplo, como uma solução em 1,3-butanodiol. Dentre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser utilizados estão água, solução de Ringer, U.S.P. (Farmacopeia dos Estados Unidos), e solução isotônica de cloreto de sódio. Óleos fixos, estéreis são convencionalmente utilizados como um solvente ou meio suspensor. Para este propósito, qualquer óleo fixo insípido pode ser utilizado incluindo monoglicerídeos ou diglicerídeos sintéticos. Ácidos graxos como ácido oleico podem ser usados na preparação de injetáveis.

[00503] Formulações injetáveis podem ser esterilizadas, por exemplo, por filtração através de um filtro retentor de bactérias, e/ou por incorporação de agentes esterilizantes na forma de composições sólidas estéreis que podem ser dissolvidas ou dispersadas em água estéril ou outro meio injetável estéril antes do uso.

[00504] Com o propósito de prolongar o efeito de um ingrediente ativo, é, com frequência, desejável tornar mais lenta a absorção do ingrediente ativo a partir da injeção subcutânea ou intramuscular. Isto pode ser realizado pelo uso de uma suspensão líquida de material cristalino ou amorfo com muito baixa solubilidade em água. A taxa de absorção do fármaco então depende de sua taxa de dissolução que, por sua vez, pode depender do tamanho do cristal e da forma cristalina. Alternativamente, absorção retardada de uma forma farmacêutica parenteralmente administrada é realizada por dissolução ou suspensão do fármaco em um veículo oleoso. Formas *depot* injetáveis são preparadas pela formação de matrizes de microcápsula do fármaco em polímeros biodegradáveis como poli(lactídeo-co-glicolídeo). Dependendo da razão entre fármaco e polímero e da natureza do polímero específico utilizado, a taxa de liberação de fármaco pode ser controlada. Exemplos de polímeros biodegradáveis incluem poli(ortoésteres) e poli(anidridos). Formulações *depot* injetáveis são preparadas pela captura do fármaco em lipossomas ou microemulsões que são compatíveis com os tecidos corporais.

[00505] Em algumas modalidades, as composições da presente revelação podem ser administradas intravenosamente. A administração pode ser por injeção intravenosa de *bolus*.

Administrações retal e vaginal

[00506] As composições para administração retal ou vaginal são tipicamente supositórios que podem ser preparados por misturação das composições com excipientes não irritantes adequados como manteiga de cacau, poli(glicol etilênico) ou uma cera para supositório que são sólidas à

temperatura ambiente mas líquidas à temperatura corporal e por conseguinte fundem-se na cavidade retal ou vaginal e liberam o ingrediente ativo.

Administração oral

[00507] Formas de dosagem sólidas para administração oral incluem cápsulas, comprimidos, pílulas, pós, e grânulos. Em tais formas de dosagem sólidas, um ingrediente ativo é misturado com pelo menos um excipiente inerte, farmacologicamente aceitável, como citrato de sódio ou fosfato de dicálcio e/ou enchimentos ou extensores (*e.g.* amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol, e ácido silícico), aglutinantes (*e.g.* carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarose, e acácia), umectantes (*e.g.* glicerol), agentes desintegrantes (*e.g.* ágar, carbonato de cálcio, amido de batata ou de tapioca, ácido alginico, determinados silicatos, e carbonato de sódio), agentes retardadores de solubilização (*e.g.* parafina), aceleradores de absorção (*e.g.* compostos de amônio quaternário), agentes umectantes (*e.g.* álcool cetílico, e monoestearato de glicerol), absorventes (*e.g.* argilas caulim e bentonita), e lubrificantes (*e.g.* talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, poli(glicóis etilênicos) sólidos, laurilsulfato de sódio), e misturas dos mesmos. No caso de cápsulas, comprimidos e pílulas, a forma de dosagem pode compreender agentes tamponantes.

Administração tópica ou transdérmica

[00508] Como aqui descritas, as composições contendo anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem ser formuladas para administração tópica. A pele pode ser um sítio-alvo adequado para distribuição porque é facilmente acessível. Expressão gênica pode ser restrita não apenas à pele, potencialmente evitando toxicidade não específica, mas também também às outras camadas específicas e aos tipos de células específicos dentro da pele.

[00509] O sítio de expressão cutânea das composições distribuídas dependerá da rota de distribuição de ácido nucleico. Três rotas são

comumente consideradas para distribuir anticorpos interagentes com glicanas para a pele: (i) aplicação tópica (*e.g.* para tratamento local/regional e/ou aplicações cosméticas); (ii) injeção intradérmica (*e.g.* para tratamento local/regional e/ou aplicações cosméticas); e (iii) distribuição sistêmica (*e.g.* para tratamento de doenças dermatológicas que afetam ambas as regiões cutâneas e extracutâneas), os anticorpos interagentes com glicanas podem ser distribuídos para a pele por várias abordagens diferentes conhecidas na técnica.

[00510] Em uma modalidade, a invenção provê uma variedade de curativos (*e.g.*, curativos para ferimentos) ou bandagens (*e.g.*, bandagens adesivas) para conveniente e/ou eficazmente realizar os métodos da presente invenção. Tipicamente os curativos ou as bandagens podem compreender quantidades diferentes de composições farmacêuticas e/ou de anticorpos interagentes com glicanas aqui descritos(as) para permitir que um usuário realize múltiplos tratamentos em um sujeito(s).

[00511] Em uma modalidade, a invenção provê composições compreendendo anticorpos interagentes com glicanas para serem distribuídas em mais do que uma injeção.

[00512] As formas de dosagem para administração tópica e/ou transdérmica de uma composição podem incluir pomadas, pastas, cremes, loções, géis, pós, soluções, borrifos, inalantes e/ou emplastros. Em geral, um ingrediente ativo é misturado sob condições estéreis com um excipiente farmacêuticamente aceitável e/ou quaisquer conservantes ou agentes tamponantes necessários conforme pode ser exigido.

[00513] Adicionalmente, a presente invenção considera o uso de emplastros transdérmicos, que com frequência têm a vantagem de prover distribuição controlada de um composto para o corpo. Tais formas de dosagem podem ser preparadas, por exemplo, por dissolução e/ou dispersão do composto em um meio apropriado. Alternativa, ou adicionalmente, a taxa

de distribuição pode ser controlada pela provisão de uma membrana controladora de taxa de distribuição e/ou pela dispersão do composto em um gel polimérico e/ou uma matriz polimérica.

[00514] Formulações para administração tópica incluem, mas não são limitados a, preparações líquidas e/ou semilíquidas como linimentos, loções, emulsões de óleo em água e/ou de água em óleo como cremes, pomadas e/ou pastas, e/ou soluções e/ou suspensões.

[00515] Formulações topicamente administráveis podem, por exemplo, compreender de cerca de 1% a cerca de 10% (p/p) de ingrediente ativo, embora a concentração de ingrediente ativo possa ser tão alta quanto o limite de solubilidade do ingrediente ativo no solvente. Formulações para administração tópica podem compreender, ainda, um ou mais dos ingredientes adicionais aqui descritos.

Administração de depot

[00516] Como aqui descrito, em algumas modalidades, as composições da presente invenção são formuladas em *depots* para liberação prolongada. Em geral, um órgão ou tecido específico (um “tecido-alvo”) é selecionado para administração.

[00517] Em alguns aspectos da invenção, os anticorpos interagentes com glicanas estão espacialmente retidos dentro ou próximos de um tecido-alvo. São providos métodos para prover composições para um ou mais tecidos-alvo de um sujeito mamífero pelo contato dos um ou mais tecidos-alvo (compreendendo uma ou mais células-alvo) com as composições sob condições tais que as composições, em particular o(s) componente(s) anticorpo(s) interagente(s) com glicanas das composições, são substancialmente retidas no tecido-alvo, significando que pelo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 ou mais que 99,99% da composição é retido no tecido-alvo. Vantajosamente, a retenção é determinada pela medição do nível de anticorpos interagentes com glicanas

presentes nas composições entrando nos tecidos-alvo e/ou nas células-alvo. Por exemplo, pelo menos 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 ou mais que 99,99% dos anticorpos interagentes com glicanas administrados ao sujeito estão presentes intracelularmente em um período de tempo após a administração. Por exemplo, injeção intramuscular a um sujeito mamífero é realizada usando uma composição aquosa compreendendo um ou mais anticorpos interagentes com glicanas e um agente de transfecção, e a retenção da composição é determinada pela medição do nível de anticorpos interagentes com glicanas presentes nas células musculares.

[00518] Determinados aspectos da invenção são direcionados para métodos de prover as composições para tecidos-alvo de sujeitos mamíferos, pelo contato dos tecidos-alvo (contendo uma ou mais células-alvo) com composições sob condições tais que as composições são substancialmente retidas no tecido-alvo. As composições contêm uma quantidade eficaz de anticorpos interagentes com glicanas de modo que o efeito de interesse seja produzido em pelo menos uma célula-alvo. As composições em geral contêm agentes penetrantes em célula e um carreador farmacologicamente aceitável, embora anticorpos interagentes com glicanas “nus” (como anticorpos interagentes com glicanas sem agentes penetrantes em célula ou outros agentes) sejam também considerados.

[00519] Em algumas modalidades, as composições incluem uma pluralidade de diferentes anticorpos interagentes com glicana, onde um ou mais dos anticorpos interagentes com glicanas reconhecem uma glicana de interesse. Opcionalmente, as composições também contêm agentes penetrantes em célula para ajudar na distribuição intracelular das composições. É realizada uma determinação de uma dose de composição requerida para reconhecer glicanas de interesse em uma percentagem substancial de células contidas dentro de um volume predeterminado do

tecido-alvo (em geral, sem reconhecer glicanas em tecido adjacente ao volume predeterminado, ou distalmente aos tecidos-alvo). Subsequente a esta determinação, a dose determinada pode ser introduzida diretamente no tecido do sujeito mamífero.

[00520] Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos interagentes com glicanas a serem distribuídos em mais que uma injeção ou por injeções de dose divididas.

Administração pulmonar

[00521] As composições farmacêuticas podem ser preparadas, embaladas, e/ou vendidas em formulações adequadas para administração pulmonar por meio de a cavidade bucal. Tais formulações podem compreender partículas secas compreendendo, ainda, ingrediente ativos e tendo um diâmetro na faixa de cerca de 0,5 nm a cerca de 7 nm ou de cerca de 1 nm a cerca de 6 nm. Tais composições estão adequadamente na forma de pós secos para administração usando um dispositivo compreendendo um reservatório de pó seco para o qual uma corrente de propelente pode ser direcionada para dispersar o pó e/ou usando um recipiente dispensador de pó/solvente autopropelente como um dispositivo compreendendo o ingrediente ativo dissolvido e/ou suspenso em um propelente de ebulição baixa em um recipiente vedado. Tais pós compreendem partículas em que pelo menos 98% em peso das partículas têm um diâmetro maior que 0,5 nm e pelo menos 95% em número das partículas tem um diâmetro menor que 7 nm. Alternativamente, pelo menos 95% em peso das partículas têm um diâmetro maior que 1 nm e pelo menos 90% em número das partículas têm um diâmetro menor que 6 nm. Composições de pó seco podem incluir um diluente em pó fino sólido como açúcar e são convenientemente providas em uma forma de dosagem unitária.

[00522] Propelentes de baixa ebulição em geral incluem propelentes líquidos tendo um ponto de ebulição de abaixo de 18°C (65°F) à pressão

atmosférica. Em geral, o propelente pode constituir de 50% a 99,9% (p/p) da composição, e o ingrediente ativo pode constituir de 0,1% a 20% (p/p) da composição. Um propelente pode compreender, ainda, ingredientes adicionais como um tensoativo líquido não iônico e/ou sólido aniônico e/ou um diluente sólido (que pode ter um tamanho de partícula da mesma ordem que as partículas compreendendo o ingrediente ativo).

[00523] As composições farmacêuticas formuladas para distribuição pulmonar podem prover um ingrediente ativo na forma de gotículas de uma solução e/ou suspensão. Tais formulações podem ser preparadas, embaladas, e/ou vendidas como soluções e/ou suspensão aquosas e/ou alcoólicas diluídas, opcionalmente estéreis, compreendendo o ingrediente ativo, e podem ser convenientemente administradas usando qualquer dispositivo de nebulização e/ou de atomização. Tais formulações podem compreender, ainda, um ou mais ingredientes adicionais incluindo, mas não limitados a, um agente flavorizante como sacarina sódica, um óleo volátil, um agente tamponante, um agente ativo de superfície, e/ou um conservante como hidroxibenzoato de metila. As gotículas providas por esta rota de administração podem ter um diâmetro médio na faixa de cerca de 0,1 nm a cerca de 200 nm.

Administrações intranasal, nasal e bucal

[00524] As formulações aqui descritas, por serem úteis para distribuição pulmonar, são úteis para distribuição intranasal de uma composição farmacêutica. Outra formulação para administração intranasal é um pó grosso compreendendo o ingrediente ativo e tendo um tamanho médio de partícula de 0,2 μm a 500 μm . Uma tal formulação é administrada na maneira na qual fungação é realizada, *i.e.* por inalação rápida através da passagem nasal a partir de um recipiente do pó seguro próximo ao nariz.

[00525] As formulações adequadas para administração nasal podem, por exemplo, compreender de cerca de tão pouco quanto 0,1% (p/p) a tanto quanto 100% (p/p) de ingrediente ativo, e podem compreender um ou mais

dos ingredientes adicionais aqui descritos. Uma composição farmacêutica pode ser preparada, embalada, e/ou vendida em uma formulação adequada para administração bucal. Tais formulações podem estar, por exemplo, na forma de comprimidos e/ou pastilhas losângicas preparados(as) usando métodos convencionais, e podem, por exemplo, ter de 0,1% a 20% (p/p) de ingrediente ativo, o restante compreendendo uma composição oralmente dissolúvel e/ou degradável e, opcionalmente, um ou mais dos ingredientes adicionais aqui descritos. Alternativamente, as formulações adequadas para administração bucal podem compreender um pó e/ou uma solução ou suspensão aerossolizada e/ou atomizada compreendendo o ingrediente ativo. Tais formulações em pó, aerossolizadas, e/ou atomizadas, quando dispersadas, podem ter um tamanho médio de partícula e/ou tamanho médio de gotícula na faixa de 0,1 nm a cerca de 200 nm, e podem compreender, ainda, um ou mais de quaisquer ingredientes adicionais aqui descritos.

Administração oftálmica ou ótica

[00526] Uma composição farmacêutica pode ser preparada, embalada, e/ou vendida em uma formulação adequada para administração oftálmica ou ótica. Tais formulações podem, por exemplo, estar na forma de colírios ou gotas para ouvido incluindo, por exemplo, uma solução ou suspensão 0,1/1,0% (p/p) do ingrediente ativo em um excipiente líquido aquoso ou oleoso. Tais colírios e gotas para ouvido podem compreender, ainda, agentes tamponantes, sais, e/ou um ou mais de quaisquer ingredientes adicionais aqui descritos. Outras formulações oftalmicamente administráveis que são úteis incluem aquelas que compreendem o ingrediente ativo em forma microcristalina e/ou em uma preparação lipossomal. Insertos subretinianos também podem ser usados como uma forma de administração.

Administração de carga útil

[00527] Os anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados em numerosos cenários diferentes nos quais a distribuição de uma substância (a

“carga útil”) para um alvo biológico é desejada, por exemplo a distribuição de substâncias detectáveis para detecção do alvo, ou a distribuição de um agente terapêutico ou diagnóstico. Métodos de detecção podem incluir, mas não são limitados a, métodos de imageamento tanto *in vitro* quanto *in vivo*, *e.g.*, imuno-histoquímica, imageamento por bioluminescência (BLI, *BioLuminescence Imaging*), Imageamento por Ressonância Magnética (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*), tomografia por emissão de pósitrons (PET, *Positron Emission Tomography*), microscopia eletrônica, tomografia computadorizada de raios-X, imageamento Raman, tomografia de coerência óptica, imageamento por absorção, imageamento térmico, imageamento de fluorescência e refletância, microscopia de fluorescência, imageamento tomográfico molecular de fluorescência, imageamento por ressonância magnética nuclear, imageamento por raios-x, imageamento por ultrassom, imageamento fotoacústico, ensaios laboratoriais, ou em qualquer situação onde é requerido(a) etiquetagem/coloração/imageamento.

[00528] Os anticorpos interagentes com glicanas podem ser desenhados para incluir tanto um conector quanto uma carga útil em qualquer orientação útil. Por exemplo, um conector tendo duas extremidades é usado para conectar uma extremidade à carga útil e a outra extremidade aos anticorpos interagentes com glicanas. Os anticorpos interagentes com glicanas da invenção podem incluir mais que uma carga útil e também um conector clivável. Em outro exemplo, um fármaco que pode estar conectado aos anticorpos interagentes com glicanas por meio de um conector e pode estar fluorescentemente marcado pode ser usado para rastrear o fármaco *in vivo*, *e.g.* intracelularmente.

[00529] Outros exemplos incluem, mas não são limitados a, o uso de anticorpos interagentes com glicanas em distribuição reversível de fármaco para dentro das células.

[00530] Os anticorpos interagentes com glicanas aqui descritos podem

ser usados em direcionamento intracelular de uma carga útil, *e.g.*, agentes terapêuticos ou detectáveis, para organelas específicas. Além disso, os anticorpos interagentes com glicanas aqui descritos podem ser usados para distribuir os agentes terapêuticos para células ou tecidos, *e.g.*, em animais vivos. Por exemplo, os anticorpos interagentes com glicanas aqui descritos podem ser usados para distribuir agentes quimioterapêuticos para matar células cancerosas, os anticorpos interagentes com glicanas conectados aos agentes terapêuticos mediante conectores podem facilitar a permeação de membrana permitindo que o agente terapêutico penetre para dentro de uma célula para alcançar um alvo intracelular.

[00531] Em algumas modalidades, a carga útil pode ser um agente terapêutico como uma citotoxina, um íon radioativo, um agente quimioterapêutico, ou outro agente terapêutico. Uma citotoxina ou um agente citotóxico inclui qualquer agente que pode ser prejudicial para células. Exemplos incluem, mas não são limitados a, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, teniposídeo, vincristina, vimblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxiantracinaadiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, maitansinoides, *e.g.*, maitansinol (consulte a Patente U.S. nº 5.208.020 aqui incorporada em sua totalidade), raquelmicina (CC-1065, consulte as Patentes U.S. nºs 5.475.092, 5.585.499, e 5.846.545, todas as quais são aqui incorporadas como referências), e análogos ou homólogos dos mesmos. Íons radioativos incluem, mas não são limitados a, iodo (*e.g.*, iodo 125 ou iodo 131), estrôncio 89, fósforo, paládio, cério, irídio, fosfato, cobalto, ítrio 90, samário 153, e praseodímio. Outros agentes terapêuticos incluem, mas não são limitados a, antimetabólitos (*e.g.*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracila decarbazina), agentes alquilantes (*e.g.*, mecloretamina, tiotepa clorambucil,

raquelmicina (CC-1065), melfalana, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina-platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (*e.g.*, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) e doxorrubicina), antibióticos (*e.g.*, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramycin (AMC)), e agentes antimitóticos (*e.g.*, vincristina, vimblastina, taxol e maitansinoides). No caso de anticorpos anti-STn da presente invenção, a matança de tumor pode ser reforçada pela conjugação de uma toxina com tais anticorpos anti-STn.

[00532] Em algumas modalidades, a carga útil pode ser um agente detectável, como várias moléculas orgânicas pequenas, compostos inorgânicos, nanopartículas, enzimas ou substratos de enzima, materiais fluorescentes, materiais luminescentes (*e.g.*, luminol), materiais bioluminescentes (*e.g.*, luciferase, luciferina, e aequorina), materiais quimioluminescentes, materiais radioativos (*e.g.*, ^{18}F , ^{67}Ga , $^{81\text{m}}\text{Kr}$, ^{82}Rb , ^{111}In , ^{123}I , ^{133}Xe , ^{201}Tl , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (*e.g.*, como pertecnetato (tecnetato(VII), TcO_4^-)), e agentes de contraste (*e.g.*, ouro (*e.g.*, nanopartículas de ouro), gadolínio (*e.g.*, Gd quelado), óxidos de ferro (*e.g.*, óxido de ferro superparamagnético (SPIO, *Superparamagnetic Iron Oxide*), nanopartículas de óxido de ferro monocristalino (MIONs, *Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles*), e óxido de ferro superparamagnético ultrapequeno (USPIO, *Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide*)), quelatos de manganês (*e.g.*, Mn-DPDP), sulfato de bário, meios de contraste iodados (ioexol), microbolhas, ou perfluorocarbonetos). Tais marcadores opticamente detectáveis incluem por exemplo, sem limitação, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-dissulfônico; acridina e derivados (*e.g.*, acridina e isotiocianato de acridina); ácido 5-(2'- aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfônico (EDANS); 4-amino-N-[3- vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5-dissulfonato; N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; BODIPY; Amarelo Brilhante;

cumarina e derivados (*e.g.*, cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), e 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Cumarina 151)); corantes de cianina; cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5''-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (Vermelho de Bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilenotriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodi-hidro-estilbeno-2,2'-dissulfônico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-dissulfônico; 5-[dimetilamino]-naftaleno-1-cloreto de sulfonila (DNS, cloreto de dansila); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina e derivados (*e.g.*, eosina e isotiocianato de eosina); eritrosina e derivados (*e.g.*, eritrosina B e isotiocianato de eritrosina); etídio; fluoresceína e derivados (*e.g.*, 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, X-rodamina-5-(e -6)-isotiocianato (QFITC ou XRITC), e fluorescamina); hidróxido de 2-[2-[3-[[1,3-di-hidro-1,1-dimetil-3-(3-sulfopropil)-2H-benz[e]indol-2-ilideno]etilideno]-2-[4-(etoxicarbonil)-1-piperazinil]-1-ciclopenten-1-il]etenil]-1,1-dimetil-3-(3-sulfopropil)-1H-benz[e]indólio, sal interno, composto com N,N-dietiletanamina(1:1) (IR144); perclorato de 5-cloro-2-[2-[3-[(5-cloro-3-etil-2(3H)-benzotiazol-ilideno)etilideno]-2-(difenilamino)-1-ciclopenten-1-il]etenil]-3-etilbenzotiazólio (IR140); Isocianato de Verde Malaquita; 4-metilumbeliferona; ortocresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Vermelho de Fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdeído; pireno e derivados (*e.g.*, pireno, butirato de pireno, e succinimidil-1-pireno); pontos quânticos de butirato; Vermelho Reativo 4 (CIBACRON™ Brilliant Red 3B-A); rodamina e derivados (*e.g.*, 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-rodamina (R6G); Lissamine™ cloreto de rodamina-B-sulfonila; rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina-X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101, derivado de cloreto de sulfonila de sulforrodamina 101

(Vermelho Texas), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA) tetrametilrodamina, e isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC)); riboflavina; ácido rosólico; derivados de quelato de térbio; Cianina-3 (Cy3); Cianina-5 (Cy5); cianina-5,5 (Cy5,5), Cianina-7 (Cy7); IRD 700; IRD 800; Alexa 647; Azul La Jolla; ftalocianina; e naftalocianina.

[00533] Em algumas modalidades, o agente detectável pode ser um precursor não detectável que se torna detectável após ativação (*e.g.*, constructos fluorogênicos de tetrazina-fluoróforo (*e.g.*, *tetrazine-BODIPY FL*, *tetrazine-Oregon Green 488*, ou *tetrazine-BODIPY TMR-X*) ou agentes fluorogênicos ativáveis por enzima [*e.g.*, PROSENSE® (VisEn Medical)]. Ensaio *in vitro* nos quais as composição marcadas com enzima podem ser usadas incluem, mas não são limitados a, ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISAs, *Enzyme Linked Immunosorbent Assays*), ensaios de imunoprecipitação, imunofluorescência, imunoensaio de enzima (EIA, *Enzyme Immunoassays*), radioimunoensaio (RIA, *RadioImmunoAssays*), e análise por transferência de Western (*Western blot analysis*).

Combinações

[00534] Os anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos, profiláticos, diagnósticos, ou de imageamento. Por “em combinação com”, não é pretendido para significar que os agentes precisam ser administrados ao mesmo tempo e/ou formulados para distribuição juntos, embora estes métodos de distribuição estejam dentro do escopo da presente revelação. As composições podem ser administradas simultaneamente com, antes de, ou subsequente a, um ou mais outros procedimentos terapêuticos ou médicos desejados. Em geral, cada agente será administrado em uma dose e/ou em um cronograma de tempo determinado para aquele agente. Em algumas modalidades, a presente revelação abrange a distribuição de composições farmacêuticas, profiláticas, diagnósticas, e/ou de imageamento em

combinação com agentes que podem melhorar a biodisponibilidade deles, reduzir e/ou modificar o metabolismo deles, inibir a excreção deles, e/ou modificar a distribuição deles dentro do corpo.

[00535] Em algumas modalidades, os anticorpos interagentes com glicanas podem ser usados em combinação com um ou mais agentes terapêuticos para câncer, como um agente quimioterapêutico, um anticorpo terapêutico, e/ou um inibidor do ciclo celular. A combinação de tratamento que usa anticorpos interagentes com glicanas com agentes terapêuticos para câncer pode prover propriedades terapêuticas benéficas, *e.g.* atividade antitumoral sinérgica, e pode ser usada para o tratamento de câncer. Em alguns casos, tais métodos podem ser usados para reconhecer células cancerosas que são resistentes à quimioterapia, à terapia com anticorpo e/ou ao tratamento com inibidor do ciclo celular. Os métodos de reconhecimento de células cancerosas resistentes a fármacos pode beneficiar-se de alterações na expressão de STn em células cancerosas que ocorrem após quimioterapia, terapia com anticorpo e/ou tratamento com inibidor do ciclo celular. Em alguns casos, as células cânceres resistentes a fármacos expressam STn antes e/ou após o tratamento. Em alguns casos, a expressão de STn na superfície celular em células cancerosas resistentes a fármacos pode ser aumentada após o tratamento. Após os tratamentos, algumas células cancerosas podem proliferar-se resultando em uma população de células cancerosas expressoras de STn que são resistentes ao(s) agente(s) terapêutico(s) usado(s). Em alguns casos, as células cancerosas resistentes a fármacos são células-tronco cancerosas.

[00536] Consequentemente, os métodos da invenção podem incluir métodos de administração de um anticorpo anti-STn a um sujeito para reconhecer células cancerosas expressoras de STn presentes após a administração de um ou mais agentes terapêuticos para câncer. Tais anticorpos anti-STn podem incluir um domínio variável com uma sequência

de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-12. Sujeitos e/ou tecidos cancerosos em sujeitos tratados com anticorpos anti-STn podem experimentar uma redução em células positivas para STn. Em algumas modalidades, a redução pode incluir um decréscimo em células positivas para STn de cerca de 10% a cerca de maior que 90% (por exemplo, de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, ou pelo menos 90%).

[00537] Em algumas modalidades, os agentes quimioterapêuticos usados em combinação com anticorpos anti-STn podem incluir, mas não são limitados a, taxanos (*e.g.* paclitaxel e docetaxel), agentes à base de platina (*e.g.* cisplatina, oxaliplatina, e carboplatina), inibidores de topoisomerase (*e.g.* irinotecano), análogos de nucleotídeo (*e.g.* 5-fluorouracila e gencitabina), inibidores de quinases [*e.g.* ponatinibe (ICLUSIG®) e sorafenibe (NEXAVAR®)], e inibidores de PARP [*e.g.* olaparibe (LYNPARZA™)]. Os agentes quimioterapêuticos podem causar morte celular ou prevenir crescimento celular mediante mecanismos que incluem, mas não são limitados a, inibição de função de microtúbulo, função enzimática, ou síntese de DNA.

[00538] Em algumas modalidades, os anticorpos terapêuticos usados em combinação com anticorpos anti-STn podem incluir anticorpos que reconhecem receptores de superfície de célula de câncer. Tais receptores de superfície podem estar envolvidos em vias de sinalização celular importantes para proliferação e/ou migração celulares. Em alguns casos, o receptor de superfície pode ser um receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*), um receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), ou um receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER, *Human Epidermal Growth Factor Receptor*). Os anticorpos que reconhecem estes

receptores ou fatores associados pode inibir o crescimento de células cancerosas e/ou a migração de células cancerosas. Anticorpos anti-EGFR exemplificadores incluem cetuximabe (ERBITUX®) e panitumumabe (VECTIBIX®). Anticorpos anti-VEGF exemplificadores incluem bevacizumabe (AVASTIN®) e ramucirumabe (CYRAMZA®). Anticorpos anti-HER2 exemplificadores incluem trastuzumabe (HERCEPTIN®). Dentre eles, cetuximabe, panitumumabe, bevacizumabe e ramucirumabe são anticorpos aprovados pela FDA (Administração de Alimentos e Fármacos dos Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration*)) para tratamento de câncer colorretal.

[00539] Em algumas modalidades, inibidores do ciclo celular podem ser usados em combinação com tratamentos com anticorpos anti-STn. Os inibidores do ciclo celular podem incluir, mas não são limitados a, inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDK, *Cyclin-Dependent Kinase*), inibidores de quinases de pontos de checagem, inibidores de quinases tipo Polo (PLKs, *Polo-Like Kinases*), e inibidores de quinases Aurora. Como aqui usado, o termo “inibidor do ciclo celular” refere-se a qualquer agente que torna mais lenta ou interrompe a progressão do ciclo celular. Os inibidores do ciclo celular podem induzir parada do ciclo celular em diferentes estágios, e podem resultar em morte celular e/ou em inibição de crescimento celular.

[00540] Em algumas modalidades, os inibidores do ciclo celular podem ser inibidores de CDK. As quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são um grupo de serina/treonina-quinases. As CDKs e suas parceiras ciclinas são enzimas regulatórias-chave que regulam as transições do ciclo celular. Dentre elas, CDK4 e CDK6 são regulatórias-chave da transição da fase G0 ou G1 para a fase S. CDK4 e CDK6 (aqui referidas como CDK4/6) são homólogos próximos que são expressados em uma maneira tecido-específica. CDK4/6 forma um complexo com ciclina D e fosforila a proteína retinoblastoma (Rb). A fosforilação de Rb atenua sua supressão de fatores de transcrição E2F, que

resulta em transcrição de genes codificantes de proteínas necessárias para a replicação de DNA. Isto pode permitir a entrada de célula na fase S. A progressão através da fase S é controlada pelos complexos de ciclina E-CDK2 e ciclina A-CDK2. A transição da fase G2 para a fase M é regulada pela CDK1 mediante interações com parceiras ciclinas, ciclina A2 e ciclina B. Os agentes terapêuticos direcionadores de CDKs (CDKs gerais ou específicas) podem impedir a progressão do ciclo celular e prevenir a proliferação celular. Consulte Otto e Sicinski, *Nat. Rev. Cancer*. 2017;17(2):93-115; e Asghar *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov*. 2015; 14(2): 130-146; cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00541] Em alguns casos, os inibidores de CDK podem ser inibidores seletivos de CDK4/6. Devido à função de CDK4/6 na transição de G1 para S, a inibição de CDK4/6 causa parada do ciclo celular na fase G1. Inibidores de CDK4/6 exemplificadores incluem, mas não são limitados a, palbociclibe (Pfizer), ribociclibe (Novartis), e abemaciclibe (Eli Lilly). Palbociclibe (PD-0332991, IBRANCE®) é um fármaco aprovado para o tratamento de câncer de mama avançado (metastático) (Finn *et al.*, *Breast Cancer Res*. 2009; 11(5):R77; Rocca *et al.*, *Expert Opin. Pharmacother*. 2014; 15(3):407-20; Patentes U.S. nº 6.936.612; 7.863.278; 7.208.489; e 7.456.168, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Palbociclibe pode ser preparado e caracterizado de acordo com os métodos revelados em Patente U.S. nº 7.345.171, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências. Similarmente, ribociclibe (LEE011) também seletivamente inibe CDK4/6 com alta potência. Ribociclibe e sais farmaceuticamente aceitáveis de ribociclibe podem ser preparados de acordo com os métodos revelados em Patentes U.S. nºs 8.685.980 e 9.193.732, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências. Abemaciclibe (LY-2835219) inibe não apenas CDK4 e CDK6 mas também várias outras quinases incluindo PIM1 (Patente

U.S. nº 7.855.211, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Atividade inicial de abemaciclibe foi relatada em pacientes com câncer de pulmão, câncer ovariano, e melanoma (Shapiro *et al.*, *ASCO Meeting Abstracts* 2013; 31:2500).

[00542] Em alguns casos, inibidores de CDK podem ser inibidores de pan-CDK. Tais inibidores podem bloquear várias CDKs e resultar em parada do ciclo celular em estágios diferentes, como parada de G1, parada de G2, e/ou parada de G2/M. Inibidores de pan-CDK exemplificadores incluem, mas não são limitados a, flavopiridol (alvocidibe), dinaciclibe (MK-7965), R-roscovitina, AT7519, milciclibe, TG02, CYC065 e RGB-286638. Por exemplo, inibidores de pan-CDK podem ser flavopiridol semissintético (*e.g.*, consulte a Patente U.S. nº 4.900.727) ou análogos de flavopiridol (*e.g.*, consulte as Patentes U.S. nºs 5.733.920 e 5.849.733, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências). Como outro exemplo, inibidores de pan-CDK podem ser dinaciclibe, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, como revelado na Patente U.S. nº 7.119.200, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00543] Em algumas modalidades, inibidores do ciclo celular usados em combinação com anticorpos interagentes com glicanas podem ser inibidores de quinases de pontos de checagem. A inibição de quinases de pontos de checagem, por exemplo CHK1, CHK2, ou WEE1, pode comprometer os pontos de checagem do ciclo celular (*e.g.*, ponto de checagem S, ponto de checagem G2/M ou o ponto de checagem da montagem do fuso mitótico), permitindo a progressão do ciclo celular mesmo na presença de dano no DNA. Isso pode disparar a morte celular durante a mitose por meio de um mecanismo conhecido como “catástrofe mitótica”. Inibidores de quinases de pontos de checagem exemplificadores incluem, mas não são limitados a, MK-8776, prexasertibe (LY2606368), AZD1775, GDC-0575, e aqueles descritos em Visconti *et al. J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016; 35:153,

cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências.

[00544] Em algumas modalidades, os inibidores do ciclo celular podem ser inibidores de quinases tipo Polo (PLKs). As quinases tipo Polo (PLKs) são serina/treonina-quinases regulatórias do ciclo celular. PLK1 é o membro mais caracterizado da família de PLKs e é a proteína quinase mitótica crucial que está envolvida em muitos eventos regulatórios como a transição G2/M, a maturação da montagem do fuso, a separação cromossômica, e a saída mitótica. Inibidores de PLK1 exemplificadores incluem, mas não são limitados a, rigosertibe (ON 01910.Na), volasertibe (BI 6727), BI 2536, HMN-176, TKM-080301, NMS-P937, DAP-81, Cyclopalin1, ZK-Tiazolidinona (TAL), SBE13, COM-36, LFM-A13, escitonemina, wortmanina, e GSK461364A (Kumar e Kim, *Biomed. Res. Int.* 2015:2015:705745, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

[00545] Em algumas modalidades, os inibidores do ciclo celular podem ser inibidores de quinases Aurora. As quinases Aurora incluem uma família de serina/treonina-quinases elevadamente conservadas que são importantes para a transição confiável através da mitose. Aurora A desempenha uma função crítica em vários eventos mitóticos incluindo maturação centrossômica, alinhamento cromossômico, montagem do fuso, maturação meiótica, e citocinese. Aurora B é um componente do complexo de passagem cromossômica e está envolvida em condensação cromossômica e orientação cromossômica e também na execução apropriada de citocinese. Inibidores de quinases Aurora exemplificadores incluem, barasertibe (AZDI 152), alisertibe (MLN8237), danusertibe (PHA-739358), ENMD-2076, AT9283, PF-03814735, e AMG 900 (Bavetsias e Linardopoulos, *Front Oncol.* 2015; 5: 278, cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

Dosagem

[00546] A presente revelação abrange a distribuição de anticorpos interagentes com glicanas para qualquer um(a) de terapêutico, farmacêutico, diagnóstico ou imageamento por qualquer rota apropriada considerando-se os prováveis avanços nas ciências de distribuição de fármacos. A distribuição pode ser nua ou formulada.

Distribuição nua

[00547] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser distribuídos para células, tecidos, órgãos ou organismos na forma nua. Como aqui usado, o termo “nu(a)” refere-se aos anticorpos interagentes com glicanas distribuídos isentos de agentes ou modificações que promovem a transfecção ou permeabilidade. Os anticorpos interagentes com glicanas nus podem ser distribuídos para células, tecidos, órgãos e/ou organismos usando rotas de administração conhecidas na técnica e aqui descritas. A distribuição nua pode incluir formulação em um agente tamponante simples como solução salina ou solução salina tamponada com fosfato (SSTCF).

Distribuição formulada

[00548] Os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção podem ser formulados, usando os métodos aqui descritos. As formulações podem compreender anticorpos interagentes com glicanas que podem estar modificados e/ou não modificados. As formulações podem incluir, ainda, mas não são limitadas a, agentes penetrantes em célula, carreadores farmacologicamente aceitáveis, agentes de distribuição, polímeros bioerodíveis ou biocompatíveis, solventes, e *depots* de distribuição de liberação prolongada. Os anticorpos interagentes com glicanas formulados podem ser distribuídos para células usando rotas de administração conhecidas na técnica e aqui descritas.

[00549] As composições podem também ser formuladas para distribuição direta para órgãos ou tecidos em qualquer uma das várias maneiras na técnica incluindo, mas não limitadas a, embebimento ou banho

direto, por meio de um cateter, por géis, pó, pomadas, cremes, géis, loções, e/ou gotas, pelo uso de substratos como materiais tecidos ou biodegradáveis revestidos ou impregnados com composições, e semelhantes.

Dosagem

[00550] A presente invenção provê métodos compreendendo administrar um ou mais anticorpos interagentes com glicanas de acordo com a invenção a um sujeito que necessita dos mesmos. Ácidos nucleicos codificantes de anticorpos interagentes com glicanas, proteínas ou complexos compreendendo anticorpos interagentes com glicanas, ou composições farmacêuticas, para imageamento, diagnósticas, ou profiláticas dos mesmos, podem ser administrados(as) a um sujeito usando qualquer quantidade e qualquer rota de administração eficaz para prevenir, tratar, diagnosticar, ou imagear uma doença, um distúrbio, e/ou uma condição. A quantidade exata requerida variará de sujeito para sujeito, dependendo da espécie, da idade, e da condição geral do sujeito, da severidade da doença, da composição específica, do seu modo de administração, do seu modo de atividade, e semelhantes. As composições de acordo com a invenção são tipicamente formuladas em forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Entretanto, será entendido, que o uso diário total das composições da presente invenção será decidido pelo médico atendente dentro do escopo do julgamento médico sensato. O nível de dose específico terapeuticamente eficaz, profilaticamente eficaz, ou para imageamento apropriado para qualquer paciente específico dependerá de uma variedade de fatores incluindo o distúrbio sendo tratado e a severidade do distúrbio; a atividade do composto específico utilizado; a composição específica utilizada; a idade, o peso corporal, a saúde geral, o sexo e a dieta do paciente; o tempo de administração, a rota de administração, e a taxa de excreção do composto específico utilizado; a duração do tratamento; os fármacos usados em combinação ou coincidentes com o composto específico utilizado; e fatores

semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas.

[00551] Em algumas modalidades, os compostos da presente revelação (*e.g.*, os anticorpos anti-STn) podem ser administrados como parte de uma composição, em que a composição inclui uma concentração de tais compostos de cerca de 0,01 mg/mL a cerca de 1 mg/mL, de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 5 mg/mL, de cerca de 0,5 mg/mL a cerca de 10 mg/mL, de cerca de 2 mg/mL a cerca de 20 mg/mL ou de cerca de 5 mg/mL a cerca de 50 mg/mL.

[00552] Em algumas modalidades, as composições podem ser administradas em um volume por peso de sujeito de cerca de 0,01 mL/kg a cerca de 1 mL/kg, de cerca de 0,2 mL/kg a cerca de 1,2 mL/kg, de cerca de 0,05 mL/kg a cerca de 2 mL/kg, de cerca de 0,1 mL/kg a cerca de 3 mL/kg, de cerca de 0,5 mL/kg a cerca de 5 mL/kg, de cerca de 2 mL/kg a cerca de 10 mL/kg, or de cerca de 5 mL/kg a cerca de 20 mL/kg. A administração pode ser por administração intravenosa (*e.g.*, injeção intravenosa de *bolus*).

[00553] Em determinadas modalidades, os compostos ou as composições da presente revelação podem ser administrados(a) em níveis de dosagem suficientes para distribuir uma quantidade de composto ativo (*e.g.*, anticorpo anti-STn ou agente quimioterapêutico) por peso corporal do sujeito de cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 1 mg/kg a cerca de 6mg/kg, de cerca de 2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, de cerca de 5 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, ou de cerca de 10 mg/kg a cerca de 200 mg/kg. As administrações podem ser realizadas uma ou mais vezes por dia, para obter o efeito terapêutico, diagnóstico, profilático ou de imageamento desejado. A dosagem desejada pode ser distribuída de acordo com qualquer cronograma de dosagem, incluindo, mas não limitados a, três vezes por dia, duas vezes por dia, uma vez por dia, a cada dois dias, a cada três dias, a cada semana, a cada duas semanas, a cada três semanas, ou a cada quatro semanas, a cada dois

meses, a cada três meses, a cada quatro meses, a cada 5 meses, a cada 6 meses, ou a cada ano. Em determinadas modalidades, a dosagem desejada pode ser distribuída usando administração múltiplas (*e.g.*, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, ou mais administrações).

[00554] De acordo com a presente invenção, os anticorpos interagentes com glicanas podem ser administrados em regimes de dose dividida. Como aqui usada, uma “dose dividida” é a divisão de uma dose unitária única ou dose diária total em duas ou mais doses, *e.g.*, duas ou mais administrações da dose unitária única. Como aqui usada, uma “dose unitária única” é uma dose de qualquer agente terapêutico administrada em uma dose/em um tempo/rota única/ponto único de contato, *i.e.*, evento de administração único. Como aqui usada, uma “dose diária total” é uma quantidade dada ou receitada em um período de 24 horas. Pode ser administrada como uma dose unitária única. Em uma modalidade, os anticorpos interagentes com glicanas da presente invenção são administrados a um sujeito em doses divididas. Os anticorpos interagentes com glicanas podem ser formulados em apenas agente tamponante ou em uma formulação aqui descrita. As composições farmacêuticas compreendendo anticorpos interagentes com glicanas como aqui descritos podem ser formuladas em uma forma de dosagem aqui descrita, como uma forma de dosagem tópica, intranasal, intratraqueal, ou injetável (*e.g.*, intravenosa, intraocular, intravítrea, intramuscular, intracardíaca, intraperitoneal ou subcutânea). Considerações gerais sobre a formulação e/ou a fabricação de agentes farmacêuticos podem ser encontradas, por exemplo, em “Remington: The Science and Practice of Pharmacy” 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (aqui incorporado como referência).

Revestimentos ou películas

[00555] Formas de dosagem sólidas de comprimidos, drágeas, cápsulas, pílulas, e grânulos podem ser preparadas com revestimentos e

películas como revestimentos entéricos e outros revestimentos bem conhecidos na técnica de formulação farmacêutica. Podem opcionalmente compreender agentes opacificantes e podem ser de uma composição que eles liberam o(s) ingrediente(s) ativo(s) apenas, ou preferivelmente, em uma determinada parte do trato gastrointestinal, opcionalmente, em uma maneira retardada. Exemplos de composições de embebimento que podem ser usadas incluem ceras e substâncias poliméricas. Composições sólidas de um tipo similar podem ser utilizadas como enchimentos em cápsulas de gelatina moles ou duras preenchidas usando tais excipientes como lactose ou açúcar de leite e também poli(glicóis etilênicos) de peso molecular alto e semelhantes.

IV. Kits e dispositivos

Kits

[00556] Qualquer uma das composições aqui descritas pode estar incluída em um kit. Em um exemplo não limitador, reagentes para geração de anticorpos interagentes com glicanas, incluindo moléculas de antígeno estão incluídos em um kit. O kit pode incluir, ainda, reagentes ou instruções para criar ou sintetizar anticorpos interagentes com glicanas. Pode também incluir um ou mais agentes tamponantes. Outros kits da invenção podem incluir componentes para preparar bibliotecas ou arranjos de ácidos nucleicos ou proteínas anticorpos interagentes com glicanas e, portanto, podem incluir, por exemplo, um suporte sólido.

[00557] Em algumas modalidades, a presente revelação inclui kits para triagem, monitoração, e/ou diagnóstico de um sujeito que incluem um ou mais anticorpos interagentes com glicanas. Tais kits podem ser usado sozinhos ou em combinação com um ou mais outros métodos de triagem, monitoração, e/ou diagnóstico (*e.g.*, como um diagnóstico complementar). Alguns kits incluem um ou mais de um agente tamponante, um padrão biológico, um anticorpo secundário, um reagente de detecção, e uma composição para pré-tratamento de amostra (*e.g.*, para bloqueio, recuperação de antígeno, etc.).

[00558] Os componentes dos kits podem estar embalados em meio aquoso ou em forma liofilizada. O meio recipiente dos kits em geral incluirá pelo menos um pote, um tubo de ensaio, um frasco, uma garrafa, uma seringa ou outro meio recipiente, para dentro do qual um componente pode ser adicionado, e ser preferivelmente, adequadamente aliquotado. Se houver mais que um componente no kit (reagente de marcação e marcador podem estar embalados juntos), o kit também em geral conterá um segundo, terceiro ou outro recipiente adicional para dentro do qual os componentes adicionais podem ser separadamente adicionados. Os kits podem também compreender um segundo meio recipiente para conter um agente tamponante farmacologicamente aceitável, estéril e/ou outro diluente farmacologicamente aceitável, estéril. Entretanto, várias combinações de componentes podem estar compreendidas em um pote. Os kits da presente invenção também incluirão, tipicamente, um meio para conter os anticorpos interagentes com glicanas, *e.g.*, recipientes de proteínas, ácidos nucleicos, e quaisquer outros recipientes de reagentes em confinamento fechado para venda comercial. Tais recipientes podem incluir recipientes de plástico moldados por sopro ou por injeção para dentro dos quais os potes desejados são retidos.

[00559] Quando os componentes do kit são providos em uma e/ou mais soluções líquidas, a solução líquida é uma solução aquosa, com uma solução aquosa estéril sendo particularmente preferida. Entretanto, os componentes do kit podem ser providos como pó(s) seco(s). Quando reagentes e/ou componentes são providos como um pó seco, o pó pode ser reconstituído pela adição de um solvente adequado. É previsto que o solvente seja também provido em outro meio recipiente. Em algumas modalidades, corantes de marcação são providos como um pó seco. É considerado que 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000 microgramas ou pelo menos 1.000 microgramas ou no máximo 10 g de corante seco sejam providos em kits da

invenção. O corante pode ser, então, ressuspenso em qualquer solvente adequado, como DMSO (sulfóxido dimetílico).

[00560] Um kit pode incluir instruções para utilização dos componentes do kit e também o uso de qualquer outro reagente não incluído no kit. As instruções podem também incluir variações que podem ser implementadas.

Dispositivos

[00561] Qualquer uma das composições aqui descritas pode ser combinada com, revestida sobre ou embebida em um dispositivo. Dispositivos incluem, mas não são limitados a, implantes dentários, *stents*, substituições ósseas, articulações artificiais, válvulas, marca-passos ou outros dispositivos terapêuticos implantáveis.

V. Equivalentes e escopo

[00562] Aquelas pessoas versadas na técnica reconhecerão ou serão capazes de averiguar usando não mais que experimentação rotineira, muitos equivalentes às modalidades específicas de acordo com a invenção aqui descrita. O escopo da presente invenção não é pretendido para ser limitado à Descrição acima, mas, ao contrário, é apresentado nas reivindicações em anexo.

[00563] Nas reivindicações, os artigos como “um”, “uma”, “o” e “a” podem significar um(a) ou mais do que um(a) salvo indicação em contrário ou diferentemente evidente a partir do contexto. As reivindicações ou descrições que incluem “ou” entre um ou mais membros de um grupo são consideradas satisfeitas e um, mais que um, ou todos os membros do grupo estão presentes em, são utilizados em, ou são diferentemente relevantes para um dado produto ou processo salvo indicação em contrário ou diferentemente evidente a partir do contexto. A invenção inclui modalidades nas quais um membro de um grupo está presente em, é utilizado em, ou é diferentemente relevante para um dado produto ou processo. A invenção inclui modalidades nas quais mais que

um, ou os membros do grupo inteiro estão presentes em, são utilizados em, ou são diferentemente relevantes para um dado produto ou processo.

[00564] Também é observado que o termo “compreendendo” é pretendido para ser aberto e permite mas não exige a inclusão de elementos ou etapas adicionais. Quando o termo “compreendendo” é aqui usado, o termo “consistindo em”, é, por conseguinte, também abrangido e revelado.

[00565] Onde faixas são apresentadas, os pontos (valores numéricos) de extremidade estão incluídos. Ademais, deve ser entendido, salvo indicação em contrário ou diferentemente evidente a partir do contexto, e do entendimento de uma pessoa comumente versada na técnica, que os valores que são expressados como faixas podem assumir qualquer valor ou subfaixa dentro das faixas mencionadas em diferentes modalidades da invenção, até um décimo da unidade do limite inferior da faixa, a não ser que o contexto dite claramente em contrário.

[00566] Além disso, deve ser entendido que qualquer modalidade específica da presente invenção que cai dentro da técnica anterior pode ser explicitamente excluída de qualquer uma ou mais das reivindicações. Visto que tais modalidades são consideradas como sendo conhecidas por uma pessoa comumente versada na técnica, elas podem estar excluídas mesmo se a exclusão não for explicitamente aqui apresentada. Qualquer modalidade específica das composições da invenção (*e.g.*, qualquer ácido nucleico ou proteína codificada pelo mesmo; qualquer método de produção; qualquer método de uso; etc.), pode ser excluída de qualquer uma ou mais reivindicações, por qualquer razão, esteja ou não relacionada com a existência da técnica anterior.

[00567] Todas as fontes citadas, por exemplo, referências, publicações, bases de dados, entradas de bases de dados, e a técnica aqui citada, são incorporadas neste pedido como referências, mesmo se não expressamente mencionadas na citação. No caso de afirmações conflitantes de uma fonte

citada e o presente pedido, a afirmação do presente pedido deve prevalecer.

[00568] Os cabeçalhos de seções e tabelas não são pretendidos para serem limitadores.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Análise com arranjo de glicanas

[00569] Arranjos de glicanas otimizados são utilizados para testar afinidade e especificidade de anticorpos para múltiplas glicanas em um único experimento. Os arranjos de glicanas incluem 71 glicanas quimicamente sintetizadas e bem definidas, a maioria das quais são pares de glicanas Neu5Ac e Neu5Gc. Lâminas de arranjo são obtidas comercialmente (ArrayIt Corp, Sunnyvale, CA) e incluem as glicanas listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Arranjos de glicanas

Nº ID Glicana	Glicana
1	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
2	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
3	Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
4	Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
5	Neu5Ac α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
6	Neu5Gc α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
7	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
8	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
9	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
10	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
11	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
12	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
13	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
14	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
15	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
16	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
17	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
18	Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
19	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
20	Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
21	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
22	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
23	Neu5,9Ac2 α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
24	Neu5Gc9Ac α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
25	Neu5Ac α 2,3Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
26	Neu5Gc α 2,3Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
27	Neu5Ac α 2,6Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
28	Neu5Gc α 2,6Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
29	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
30	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
31	Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
32	Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
33	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

34	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
35	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
36	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
37	Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
38	Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
39	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
40	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
41	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
42	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
43	Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
45	Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
47	GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
51	Gal β 1,3GalNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
52	Gal β 1,3GlcNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
53	Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
54	Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
55	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
56	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
57	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
58	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
59	Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
60	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
61	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
62	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
63	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
64	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₃ NHCOCH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂
65	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₃ NHCOCH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂
66	Neu5Ac α 2,6(Neu5Ac α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
67	Neu5Ac α 2,6(Neu5Gc α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
68	Neu5Ac α 2,6(KDN α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
69	Neu5Gc α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
70	KDN α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
71	Neu5Ac α 2,8Kdn α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
72	Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
73	Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
74	KDN α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
75	Neu5Gc α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
76	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

[00570] 300 mL de solução tampão bloqueadora de epoxi [*Epoxy Blocking Buffer*] são preparados pela combinação de 15 mL de solução tamponante Tris 2 M (pH 8) com 0,9 mL de etanolamina 16,6 M e 284,1 mL de água destilada. A solução é trazida para um pH final de 9,0 com HCl. A solução é filtrada usando uma membrana de nitrocelulose de 0,2 μ m. A solução tampão bloqueadora de epoxi e também 1L de água destilada são pré-aquecidos para 50°C. Lâminas de vidro são posicionadas em um suporte de lâminas e rapidamente submersas em um recipiente para coloração com a solução tampão bloqueadora de epoxi. As lâminas são incubadas na solução tampão bloqueadora de epoxi durante 1 hora a 50°C com agitação periódica

para desativar os sítios de ligação de epoxi. A seguir, as lâminas são enxaguadas e bloqueadas com solução salina tamponada com fosfato (SSTF) com 1% de OVA (ovalbumina) a 25°C durante uma hora. Amostras de soro com anticorpos policlonais (1:1.000) ou anticorpos monoclonais purificados (1µg/mL), são diluídas em SSTF com 1% de OVA e adicionadas ao arranjo de glicanas durante uma hora a 25°C. Após lavagem extensiva, as ligações dos anticorpos são detectadas pela incubação das lâminas de microarranjo de glicanas com IgG anti-camundongo conjugada com Cy3 [*Cy3-conjugated anti-mouse IgG*] (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante um hora. As lâminas são, então, extensivamente lavadas, secadas e escaneadas com um escâner Genepix 4000B (Laser a 100%; ganho a 350; pixels de 10 µm). Dados brutos das imagens escaneadas são extraídos usando o *software* Genepix e a análise dos dados brutos é realizada. Os anticorpos são considerados como elevadamente específicos para AcSTn e GcSTn se eles demonstram ligação às ambas moléculas, mas não ao Tn ou a quaisquer outras glicanas no arranjo.

[00571] Com base na análise de arranjo, os anticorpos são classificados de acordo com o perfil de ligação às glicanas do arranjo. Anticorpos são classificados como anticorpos do “Grupo 1”, capazes de ligação aos AcSTn e GcSTn, se eles se ligarem às glicanas 5, 6, 23 e 24. Tais anticorpos são referidos como anticorpos Pan-STn devido à capacidade deles para se associarem com uma ampla variedade de estruturas de STn e a porção de STn indicada pela elipse maior na Figura 1A. Anticorpos são classificados como anticorpos do “Grupo 2”, capazes de ligação ao STn e também a algumas estruturas relacionadas que incluem ligação-O à serina ou à treonina, se eles se ligarem às glicanas 5, 6, 23, 24, 27 e 31. Considera-se que estes anticorpos associam-se com a porção de STn indicada pela elipse maior na Figura 1B. Alguns anticorpos do Grupo 2 preferivelmente se ligam mais às estruturas com AcSTn do que às estruturas com GcSTn. Anticorpos são classificados

como anticorpos do “Grupo 3” (capazes de ligação ao STn, mas podem também se ligarem a um conjunto mais amplo de estruturas relacionadas) se eles se ligam às glicanas 5, 6, 23, 24, 17, 3, 19, 37, 27 e 31. Diferentemente dos anticorpos do Grupo 2, os anticorpos do Grupo 3 não requerem que tais estruturas tenham uma ligação-O à serina ou à treonina. Considera-se que os anticorpos do Grupo 3 associam-se com a porção de STn indicada pela elipse maior na Figura 1C. Finalmente, anticorpos são anticorpos do “Grupo 4”, capazes de ligação a ambos AcSTn e GcSTn e também ao antígeno Tn não sialilado (tendo, portanto, uma especificidade mais ampla) se eles se ligam às glicanas 5, 6, 23, 24 e 47. Considera-se que os anticorpos do Grupo 4 associam-se com a porção de STn indicada pela elipse maior na Figura 1D.

Exemplo 2. Geração de anticorpos de camundongo anti-STn

[00572] Anticorpos mSIA101 e mSIA102 foram gerados usando domínios variáveis de anticorpos monoclonais anti-STn obtidos, como previamente descrito na Publicação U.S. nº US2016/0130356 (cujos conteúdos são aqui incorporados em suas totalidades como referências), mediante imunização murina com mucinas. Sequências de domínio variável de mSIA103 foram obtidas de anticorpos 3F1 IgG1 (SBH Biosciences, Natick, MA). Constructos de vetor de expressão de IgG2a (plasmídeo H1206 para cadeias pesadas de anticorpo e plasmídeo L1206 para cadeias leves de anticorpo, LakePharma, Belmont, CA) foram modificados para codificarem os domínios variáveis de mSIA101, mSIA102, e mSIA103 a montante das regiões constantes de IgG2a. As sequências dos domínios expressadas são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Sequências utilizadas na geração de anticorpos IgG2a

Domínio	Sequência	SEQ ID NO
domínio VH de mSIA101	QVQLQQSDAELVKPGASVKISKASGYTFTDHAHWVKQKPEQ GLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLNSLS SDDSAVYFCKRSLSTPYWGQGTLLVTVSA	1
domínio VL de mSIA101	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLRGNHKNYLTWYR QKPGLPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFALTISSVQAE LAVYYCQNDYTPYTFGGGTKLEIKR	2

domínio VH de mSIA102	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHFWVKQKPEQ GLEWIGYFSPGNDIKYNEKFKVKATLTADKSSSTAYMQLTSLT SEDSAVYFCKRSYYGDWQGQTTTLTVSS	3
domínio VL de mSIA102	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSHLAWYQQKQKSP QLLVYGATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKIHSLSQSEDFGSYYC QHFWGAPFTFGSGTKLEIK	4
domínio VH de mSIA103	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHFWVKQKPEQ GLDWIGYISPGNGDIKYNEKFKDKVTLTADKSSSTACMHLNSLT SEDSAVYFCKRSLLALDYWGQGTTLTVSS	5
domínio VL de mSIA103	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGNTIAWYQQKPGRS PKVLIYASSTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLTDYFC QQYSSFPLTFGVGKLELK	6
domínio constante da cadeia pesada de IgG2a	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPITCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYS CSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	13
domínio constante da cadeia leve <i>kappa</i>	RADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSTSPIVKSFNRNEC	14

[00573] Plasmídeos codificantes de sequências de aminoácidos da cadeia pesada completa e plasmídeos codificantes de sequências de aminoácidos da cadeia leve completa foram transfectados para dentro de células e expressados para produzir anticorpos maduros.

[00574] Células de ovário de hamster chinesa-K1 (CHO-K1) foram transfectadas para a geração de linhagens celulares estáveis expressoras de anticorpos IgG2a. As células foram cultivadas em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37°C em meio quimicamente definido (CD-CHO, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com L-glutamina.

[00575] Aproximadamente 80 milhões de células CHO em suspensão, crescendo em fase log, foram transfectadas por eletroporação (MaxCyte) com 80 µg de plasmídeo total codificante das cadeias leves e pesadas de comprimento completo. Vinte e quatro horas mais tarde, as células transfectadas foram postas sob seleção para integração estável dos genes de anticorpo. Durante o processo de seleção as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de seleção fresco a cada 2-3 dias até que o acervo recuperasse suas taxa de crescimento e viabilidade. As células foram monitoradas para crescimento, título, e integração estável dos constructos de

expressão de anticorpos. A taxa de duplicação foi de 20 horas.

[00576] Linhagens celulares estáveis foram cultivadas para produção em grande escala e 10L de cultura foram produzidos. O meio condicionado colhido da rodada de produção de acervo de células estáveis foi clarificado por centrifugação e filtração em membrana de 0,2 µm. O anticorpo foi purificado usando cromatografia de afinidade com Proteína-A, então esterilizado e clarificado das partículas pela passagem através de um filtro de membrana de 0,2 µm. Após filtração e purificação para baixo teor de endotoxinas, a concentração foi ajustada para 5 mg/mL e 120 mg de anticorpo foram recuperados.

[00577] Para preparar conjugados de anticorpo-fármaco (CAFs), os anticorpos foram conjugados com monometil-auristatina E (MMAE). Isto foi realizado pelo contato dos anticorpos com maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenziloxicarbonil-monometil-auristatina E (MC-vc-PAB-MMAE, aqui referida como CL-MMAE). A conjugação resultante é com base em maleimida-cisteína, onde as ligações dissulfeto intercadeia de anticorpo foram reduzidas com TCEP e, então, ligadas à porção maleimida do fármaco.

[00578] Os anticorpos conjugados foram dessalinizados em colunas Sephadex G50 para remover toxinas residuais e, então, foram dialisados em HEPES 30 mM de pH 7,7 com NaCl 150 mM. Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC, *Size-Exclusion Chromatography*) e cromatografia de interação hidrofóbica (HIC, *Hydrophobic Interaction Chromatography*) foram usadas para determinar a razão entre fármaco e anticorpo (RFA).

Exemplo 3. Caracterização de anticorpos de camundongo e de CAFs

[00579] Os anticorpos de camundongo foram caracterizados para eficácias *in vitro* e *in vivo* em modelos de câncer de mama, câncer de cólon e câncer ovariano. Os anticorpos foram usados para identificar linhagens celulares de CRC (câncer colorretal) que expressam STn sobre a superfície. Cinco linhagens de CRC foram incubadas *in vitro* e crescidas para

confluência. A expressão % de STn foi determinada por citometria de fluxo usando anticorpos anti-STn. Aproximadamente 30-70% de células SW403, COLO205 e LS174T cultivadas naturalmente expressaram STn sobre a superfície (conforme detectado usando mSIA103), enquanto que as células HT29 e RKO tiveram muito pouco ou nenhum STn detectável (conforme detectado usando hSIA101) sobre superfície celular delas (consulte a Tabela 6).

Tabela 6. Expressão de STn em linhagens celulares de CRC

Linhagem celular	Expressão % de STn
COLO205	67,7
LS174T	69,9
SW403	30,0
RKO	Baixa ou não detectável
HT29	Baixa ou não detectável

[00580] Além disso, um Microarranjo de Tecido de CRC [*CRC Tissue MicroArray (TMA)*] (NBP2-30214; Novus Bio, Littleton, CO) foi corado para a expressão de STn. O arranjo consiste em 59 núcleos com e sem um tratamento com enzima neuraminidase (sialidase). Neuraminidase especificamente cliva ácidos siálicos terminais e destrói o antígeno STn presente sobre o tecido. Dentre os 51 núcleos neoplásicos sobre TMA, 45 demonstraram algum nível de coloração de membrana positiva, e coloração com mSIA103 anti-STn em todos os 45 foi abolida com o tratamento com neuraminidase a 250 mU/mL. A coloração com anticorpo específico para vimentina não foi afetada, sugerindo que a ligação do anticorpo mSIA103 anti-STn é específica para ácido siálico. A coloração em cólon normal (8 núcleos) foi restrita à cripta e à mucosa da superfície, e no lado apical de células que devem estar protegidas de um agente terapêutico CAF intravenosamente administrado.

[00581] Um estudo de xenoenxerto preliminar foi realizado usando as células COLO205 para avaliar a eficácia *in vivo* dos conjugados de anticorpo-fármaco (CAFs) de camundongo. Modelo de xenoenxerto subcutâneo COLO205 foi gerado por injeção de 5×10^6 células/camundongo para dentro

do flanco direito de camundongos Nus Atímicos. Os tratamentos iniciaram quando o tumor alcançou um tamanho médio de 180 mm³. Os camundongos foram dosados uma vez por semana a 5 mg/kg durante três semanas. mSIA103 sozinho sem toxina, mSIA103-CL-MMAE, mSIA103 conjugado com monometil-auristatina F (MMAF) usando um conector não clivável, e um veículo como controle foram avaliados no estudo. mSIA103-CL-MMAE demonstrou significativa inibição de crescimento de tumor com uma razão entre tratamento e controle (T/C) de 44,5% (p=0,008), comparado com os outros três grupos.

Exemplo 4. Geração de anticorpos humanizados anti-STn

[00582] Versões humanizadas de domínios variáveis de mSIA101, mSIA102, e mSIA103 foram preparadas pela incorporação de CDRs em sequências de linhagem germinativa humanas, um processo referido como “transplante de CDR”. Os domínios variáveis resultantes foram usados para preparar anticorpos humanizados hSIA101, hSIA102, e hSIA103, pela expressão de constructos codificantes de domínios variáveis humanizados com domínios constantes de IgG1 humana. Sequências de domínios variáveis e de domínios constantes de anticorpo expressados são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Domínios variáveis humanizados

Anticorpo	Domínio	Sequência	SEQ ID NO
hSIA101	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY TFTDHAHWVRQAPGQGLEWMGYFSP GNDDIKYNEKFRGRVTMTADKSSSTAY MELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQ GTLVTVSS	7
hSIA101	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS LLNRGNHKNYLTWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQNDYTYPYTFGQGTKV EIK	8
hSIA102	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY TFTDHAHWVRQAPGQGLEWIGYFSPG NDDIKYNEKFKVRATLTADKSSSTAYM ELRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQGT LTVSS	9
hSIA102	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENI YSHLAWYQQKPGKAPKLLVYGATNLA SGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFA TYYCQHFHWGAPFTFGQGTKVEIK	10

hSIA103	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAHWRQAPGQGLEWMGYISP GNGDIKYNEKFKDRVTMTADKSSSTAY MQLRSLRSDDTAVYFCKRSLALDYW GQGTLVTVSS	11
hSIA103	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQD VGTNIAWYQQKPGKAPKVLIIYASTRH TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYFCQQYSSFLPTFGQGTKVEIK	12
IgG1 humana	Domínio constante da cadeia pesada	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK	15
IgG1 humana	Domínio constante da cadeia leve	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	16

[00583] A preparação de conjugados de anticorpo(humanizado)-fármaco (CAFs) com MMAE foi realizada utilizando os mesmos métodos como previamente descritos com os anticorpos murinos.

Exemplo 5. Caracterização de anticorpos humanizados

[00584] Anticorpos IgG1 humanizados, preparados como descrito acima, foram submetidos à análise de caracterização incluindo análise de ligação com base em citometria de fluxo com células MDA-MB-231-STn; análise de ligação por BSM ELISA; e análise com arranjos de glicanas.

[00585] Em estudos de ligação com base em citometria de fluxo, os anticorpos foram triados ao longo de uma faixa de concentrações de 0 nM a 300 nM, comparando a ligação às células MDA-MB-231 com ou sem expressão de STn induzida por transfecção. A ligação foi determinada usando um anticorpo secundário anti-APC-humana conjugado e apenas células vivas foram consideradas (com base em janela de obtenção de células para análise positivas para iodeto de propídio [*propidium iodide negative gating*]). 5.000 eventos foram coletados em média por amostra. Os dados foram analisados usando o *software* FlowJo (Asland, OR) e foram obtidas a média de APC e a

% de APC. Estes dados foram transformados em log, então, ajustados para um modelo de regressão não linear para obter uma curva de dose-resposta e informação de ligação como concentração efetiva para obtenção de metade do efeito máximo (CE_{50}). Anticorpo humano de isótipo IgG1 foi usado como um isótipo controle negativo. Receptor de fator de crescimento epidérmico (LA22, EMD Millipore, Billerica, MA) foi usado como um controle positivo.

[00586] Para análise BSM ELISA, os anticorpos foram triados ao longo de uma faixa de concentrações de 0 nM a 100 nM em poços revestidos com mucina submaxilar bovina (BSM, *Bovine Submaxillary Mucin*). Um subconjunto de poços foi tratado com solução branda de periodato antes da introdução de anticorpo para remover a cadeia lateral nos resíduos de ácido siálico terminais (destruindo o antígeno STn). As densidades ópticas dos poços tratados com periodato e não tratados com periodato foram determinadas e transformadas em log, então, foram ajustadas para um modelo de regressão não linear para obter uma curva de dose-resposta. Os valores de densidade óptica obtidos dos poços tratados com periodato foram subtraídos dos valores de densidade óptica dos poços não tratados com periodato para obter uma curva de ligação ao STn sensível ao periodato e os correspondentes valores de CE_{50} .

[00587] A análise com arranjos de glicanas foi realizada como descrito previamente e os anticorpos foram atribuídos aos perfis de ligação às glicanas no arranjo com base nestes resultados.

[00588] Os resultados de citometria de fluxo, ELISA, e análise com arranjos de glicanas são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados de caracterização de anticorpos

ID do Clone	Ligação às células MDA-MB-231-STn [CE_{50} (nM)]	BSM ELISA [CE_{50} (nM)]	Perfil de ligação às glicanas no arranjo
hSIA101	2,0	4,2	Grupo 1
hSIA102	0,1	Não Determinado	Grupo 4
hSIA103	0,3	1,8	Grupo 1

[00589] Todos os anticorpos testados demonstraram ligação ao STn associado com célula e associado com BSM. Não foi observado ligação com

o isótipo IgG1 humano controle (Southern Biotech, Birmingham, AL). A ligação de hSIA102 não foi sensível ao periodato nos ensaios ELISA, de modo que uma CE_{50} confiável não pôde ser determinada por BSM ELISA.

Exemplo 6. Análise de conjugados de anticorpo(humanizado)-fármaco

[00590] Versões CAF de hSIA101, hSIA102, e hSIA103 conjugados com MMAE foram avaliadas por um ensaio de citotoxicidade de CAF usando células MDA-MB-231 (parentais ou transfectadas para expressão intensificada de STn). As células parentais foram crescidas em Meio Essencial Mínimo de Eagle (EMEM, *Eagle's Minimum Essential Medium*) suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, soro fetal bovino), Penicilina/Estreptomicina 1x e 45 µg/mL de gentamicina. As células positivas para STn foram crescidas no mesmo meio exceto com a adição de 1 mg/mL de G418 para seleção de antibiótico. As células foram semeadas separadamente (4.000 células/poço para células parentais ou 2.000 células/poço para células positivas para STn) em placas de 96 poços usando meio apropriado descrito acima. As células foram crescida de um dia para outro. Após 16-20 horas, as células foram tratadas com concentrações variadas de anticorpos de teste em triplicata (50 nM a 0,012 nM) durante 72 horas. Então, as células foram analisadas usando kit de ensaio luminescente de viabilidade de células [ADC CELLTITER-GLO® Luminescent Cell Viability Assay Kit] (Promega, Madison, WI) para determinar a quantidade de ATP presente, um indicador de células metabolicamente ativas. O ensaio usa um reagente único que é adicionado às células cultivadas em meio suplementado com soro. O reagente lisa as células e gera um sinal luminescente proporcional à quantidade de ATP presente. Os sinais luminescentes foram analisados e usados para calcular os valores de concentração inibitória semimáxima (CI_{50}) para cada anticorpo usado com base na concentração requerida para matar as células positivas para STn em níveis semimáximos (consulte a Tabela 9).

Tabela 9. Valores de CI_{50} para CAFs com anticorpos humanizados

Anticorpo Humanizado	CI_{50} (nM)
hSIA103	1,3
hSIA102	2,6
hSIA101	5,2

[00591] Todos os anticorpos testados demonstraram valores de CI_{50} na faixa nanomolar única indicando uma capacidade forte de cada um para matar células expressoras de STn.

[00592] Estudos similares foram realizados usando células OVCAR3 em cultura. Doses de hSIA101-MMAE e hSIA102-MMAE de 5 pM a cerca de 300 nM foram usadas, dando um valor de CI_{50} de 29 nM para hSIA101-MMAE e um valor de CI_{50} de 15 nM para hSIA102-MMAE.

Exemplo 7. Ensaios de STn

[00593] Ensaios ELISA são desenvolvidos para identificar e quantificar níveis de STn em amostras de sujeitos. Mucina submaxilar bovina (BSM, *Bovine Submaxillary Mucin*), que está elevadamente sialilada, é usada para gerar curvas-padrão e para ajudar em otimização de ensaio. Em ensaios iniciais, anticorpos de camundongo anti-STn comercialmente disponíveis [e.g., anticorpo 3F1 (SBH Sciences, Natick, MA), anticorpo B72.3 (consulte Colcher, D. *et al.*, 1981. *PNAS*. 78(5): 3199-203), e anticorpo CC49 (consulte Muraro, R. *et al.*, 1988. *Cancer Res.* 48: 4588-96)] são usados para revestir placas de ensaio e capturar BSM em amostras (soluções tamponadas ou amostras de soro com BSM adicionada) sendo testadas. Anticorpos humanizados anti-STn (e.g., hSIA101, hSIA102, e hSIA103) são usados para detectar BSM capturada. Os anticorpos usados para captura e detecção são testados por dois métodos. Um é pelo teste para pareamento de par nos ensaios ELISA sanduíche. O segundo é por citometria de fluxo para ligação competitiva pelo uso de marcadores fluorescentes de anticorpo e alternância da ordem de exposição às células expressoras de STn. Os pares de anticorpos que não se ligam competitivamente são usados para desenvolvimento de ensaio adicional.

[00594] Outros ensaios utilizam anticorpos anti-STn como anticorpos de captura, ligados às placas de ensaio, e anticorpos de detecção espécie-específicos para detectar proteínas ligadas. Por exemplo, mAb humano anti-STn pode ser utilizado tanto como mAb de revestimento quanto como mAb de detecção se o mAb de detecção for diretamente marcado (*e.g.* com Alexa-488, HRP etc.) Por exemplo, mAb murino anti-STn pode ser utilizado tanto como mAb de revestimento quanto como mAb de detecção se o mAb de detecção for diretamente marcado (*e.g.* com Alexa-488, HRP etc.) As detecções de STn em amostras de camundongo (*e.g.*, coletadas dos estudos de modelo de xenoenxerto aqui descritos) e em amostras de humanos (*e.g.*, amostras de soro obtidas como aqui descrito) são avaliadas com ambos os anticorpos de detecção murino e humano.

Exemplo 8. Ensaio de STn com anticorpos humanizados anti-STn

[00595] Um ensaio STn ELISA foi realizado usando mSIA102 como um anticorpo de captura e hSIA102 ou hSIA103 como um anticorpo de detecção, com isótipo humano IgG como um anticorpo de detecção de controle. Soluções de cinco microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) de anticorpo de captura foram usadas para revestir, de um dia para outro, a superfície de uma placa de ensaio ELISA. As placas foram lavadas e bloqueadas antes de serem tratadas com uma série de diluições de mucina submaxilar bovina (BSM) na faixa de 0 nM a 6×10^{-8} nM. BSM ligada à superfície de ensaio foi detectada usando anticorpo de detecção a $3 \mu\text{g/mL}$. Anticorpo anti-humano com conjugado de peroxidase de rábano ($0,08 \mu\text{g/mL}$) foi usado para ligar anticorpos de detecção e os complexos de anticorpo-antígeno foram detectados usando substrato de HRP (*HorseRadish Peroxidase*). Resultados demonstraram que anticorpos humanizados anti-STn foram capazes de detectar BSM ligada com uma concentração efetiva para obtenção de metade do efeito máximo (CE_{50}) para ligação de anticorpo de 9×10^{-9} nM para hSIA103 e de 2×10^{-8} nM para hSIA101. Não foi observada ligação com o

anticorpo de detecção de isótipo controle.

Exemplo 9. Estudos farmacocinéticos

[00596] Anticorpos hSIA101 e hSIA102, ambos conjugados com MMAE, foram administrados a camundongo fêmeas atímicos em uma dose de 5 mg/kg (dosagem determinada gravimetricamente) por administração por injeção intravenosa (IV) na cauda para avaliar a meia-vida de eliminação terminal do anticorpo. Cada grupo consistiu em 9 camundongos. Sangue (soro) foi coletado a 1, 4, 8, 24, 48, 72, 168, 336 e 672 horas e usado para calcular a meia-vida do anticorpo.

[00597] Avaliação de parâmetros farmacocinéticos (PK *Pharmacokinetic*) foi realizada no término do estudo usando o *software* WINNONLIN® (Pharsight Corp., Mountain View, CA). A área sob a curva (ASC) foi avaliada a partir da primeira dose administrada até o tempo após a dosagem da última concentração observada quantificável ($ASC_{\text{última}}$) e a partir do início do estudo até o infinito (ASC_{INF}). A concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) observada, a depuração (CL, *clearance*) observada, a meia-vida de eliminação terminal (HL, *half-life*), o volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{ss}) e o volume de distribuição na fase terminal (V_z) foram também determinados. Os parâmetros PK foram calculados usando análise não compartimental com amostragem esparsa. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros PK

Anticorpo	$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$ASC_{\text{última}}$ (Dia* $\mu\text{g/mL}$)	ASC_{INF} (Dia* $\mu\text{g/mL}$)	CL (mL/Dia/kg)	HL (Dia)	V_z (mL/kg)	V_{ss} (mL/kg)
hSIA101-MMAE	254	1.050,00	1.050,00	4,77	2,55	17,51	20,07
hSIA102-MMAE	285	1.075,00	1.079,17	4,63	3,77	25,16	23,57

[00598] A partir do estudo, foi determinado que hSIA101-MMAE tem uma meia-vida de eliminação terminal de 2,55 dias, enquanto que foi determinado que hSIA102-MMAE tem uma meia-vida de eliminação terminal de 3,77 dias. Estes valores foram comparáveis com aqueles relatados com

outros conjugados de anticorpo-fármaco (consulte, *e.g.*, Leal, M. *et al.*, 2015, *Bioconjugate Chem.*, 26: 2223-32, que relata uma meia-vida de eliminação terminal para um conjugado de anticorpo-anti-5T4-fármaco de 3,5 dias).

Exemplo 10. Geração de linhagens celulares superexpressoras de STn

[00599] Linhagens celulares cancerosas estabelecidas são modificadas para estavelmente expressarem STn como descrito por Julien *et al.* (Julien, S. *et al.*, 2005. *Breast Cancer Res. Treat.* 90(1): 77-84). As células são transduzidas com vetores lentivirais distribuidores de constructos de expressão ST6GalNAc I (hST6GalNAc I pRc-CMV) ou controle (vetor vazio pRc-CMV). Transfecções estáveis são selecionadas em meio contendo geneticina 418 (G418, 1 mg/mL). Células resistentes são semeadas em placas de 96 poços usando a estratégia de diluição limite e subclonadas três vezes para obter linhagens clonais estáveis. As linhagens clonais demonstram expressão variada de ST6GalNAc I [conforme determinada por meio de análise por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR, *quantitative Polymerase Chain Reaction*)]. Linhagens celulares OVCAR3 estavelmente expressoras de STn adicional STn (em comparação com as células de tipo selvagem) são referidas como células “OVCAR3-STn”. Expressão bem sucedida de STn é verificada por análise por citometria de fluxo usando anticorpos anti-STn.

Exemplo 11. Geração de linhagens celulares SKOV3 com expressão intensificada de ST6GalNAc I

[00600] Células SKOV3 foram transduzidas com vetores lentivirais distribuidores de constructos de expressão ST6GalNAc I (hST6GalNAc I pRc-CMV). Acervos de células estáveis foram gerados e 6 clones com expressão variada de ST6GalNAc I [conforme determinada por meio de análise por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)] foram selecionados (consulte a Tabela 11).

Tabela 11. Níveis de expressão de ST6GalNAc I em clones selecionados

ID do Clone	Nível de expressão de ST6GalNAc I mRNA (nível de expressão em vezes sobre o controle)
Clone 7	165
Clone 8	105
Clone 10	15
Clone 13	125
Clone 15	20
Clone 16	30

[00601] Clones 7, 8, e 13 demonstraram o nível mais alto de ST6GalNAc I mRNA quando comparados com os níveis em linhagens celulares não transduzidas.

[00602] Os clones SKOV3 expressores de nível nenhum (tipo selvagem), nível moderado (clone 15), e nível alto (clone 13) de STn foram testados para sensibilidade ao tratamento com anticorpo anti-STn. As células foram cultivadas e tratadas com veículo controle, hSIA101, hSIA101-MMAE, hSIA102, ou hSIA102-MMAE em níveis de concentração de 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, e 100 nM. A viabilidade das células foi subsequentemente medida pelo ensaio MTT (EMD Millipore, Billerica, MA). A viabilidade das células foi reduzida com todas as doses de tratamento com hSIA101-MMAE e hSIA102-MMAE nas células expressoras de níveis altos de STn e nas doses mais altas que 2,5 nM em células expressoras moderadas de STn. A viabilidade das células foi reduzida com todas as doses de tratamento com hSIA101-MMAE e hSIA102-MMAE nas células expressoras de níveis moderados de STn e em doses maiores que 5 nM em células expressoras moderadas de STn. Em células não expressoras de STn, hSIA101-MMAE e hSIA102-MMAE tiveram pouco efeito, exceto na dose mais alta usada. Estes resultados indicam que a suscetibilidade celular ao tratamento com anticorpos anti-STn é dependente do nível de expressão de STn.

Exemplo 12. Estudos *in vivo* em xenoenxerto derivado de linhagem celular OVCAR3 em camundongo

[00603] Um modelo em camundongo de xenoenxerto subcutâneo em camundongo Nu Atímico foi gerado com células de câncer ovariano humano OVCAR3. Os animais foram tratados com CAFs humanizados anti-STn (1

mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg), um CAF isótipo (1 mg/kg, 5 mg/kg), Paclitaxel (20 mg/kg) ou veículo sozinho. CAFs foram administrados intravenosamente uma vez por semana durante quatro semanas. Paclitaxel foi administrado intraperitonealmente uma vez por semana durante três semanas. O volume de tumor e o peso corporal foram medidos nos dias indicados na Tabela 12. Os CAFs humanizados significativamente reduziram os volumes de tumor em comparação com o veículo e o CAF isótipo controle (consulte a Tabela 12), enquanto que tiveram poucos efeitos sobre o peso corporal total. Estes dados sugerem que os CAFs anti-STn não são tóxicos *in vivo* e são eficazes na redução dos volumes de xenoenxerto ovariano seroso. No término do estudo, os tecidos tumorais foram coletados e analisados usando imuno-histoquímica para a expressão de STn. Os tecidos de tumores de camundongos tratados com CAFs anti-STn mostraram expressão reduzida de STn em comparação com os outros tratamentos.

Tabela 12. Volume de Tumor

Tratamento	Volume médio de tumor (mm ³)									
	1ºDia	4ºDia	9ºDia	12ºDia	15ºDia	18ºDia	23ºDia	26ºDia	30ºDia	31ºDia
Veículo	161,8	242,8	373,5	539,1	678,4	803,1	987,1	1039,3	1175,6	1224,0
hSIA101-MMAE, 1 mg/kg	161,7	228,9	347,7	448,2	551,5	609,0	768,4	882,7	937,1	966,8
hSIA101-MMAE, 2,5 mg/kg	161,9	213,2	275,8	302,6	313,5	299,7	234,0	195,9	169,7	169,1
hSIA101-MMAE, 5 mg/kg	161,7	203,4	211,0	193,4	165,0	131,1	77,8	59,4	39,5	39,1
hSIA102-MMAE, 1 mg/kg	161,7	219,7	335,5	465,7	567,1	707,1	871,9	897,0	957,7	984,8
hSIA102-MMAE, 2,5 mg/kg	161,8	202,9	291,8	358,5	399,5	420,8	414,3	370,2	384,0	384,7
hSIA102-MMAE, 5 mg/kg	161,7	210,7	210,6	187,4	168,7	127,2	84,0	67,3	50,5	46,8
Isótipo-MMAE, 1 mg/kg	161,1	222,1	312,6	368,8	423,1	468,3	510,6	472,5	531,4	548,2
Isótipo-MMAE, 5 mg/kg	161,4	196,5	255,9	241,8	205,9	176,9	127,1	94,3	78,0	74,0
Paclitaxel, 20mg/kg	161,2	210,0	370,0	482,3	620,4	767,4	971,6	1133,0	1277,8	1385,2

Exemplo 13. Expressão de STn em amostras de CRC de pacientes

[00604] Amostras de CRC primário de pacientes foram sondadas por citometria de fluxo com hSIA101 e dois anticorpos comerciais B72.3 e CC49. Todas as 10 amostras testadas foram positivas para STn. Os resultados são apresentados na Tabela 13. Na tabela, %STn é expressada como % de população-CD45-/CD34-viável. A expressão de STn foi, com frequência, mais robustamente identificada com hSIA101 do que com os anticorpos comerciais. A expressão positiva para STn variou de 3% a 47%, com uma amostra metastática demonstrando o percentual mais alto de células positivas para STn. Isto sugere que os anticorpos anti-STn podem ser utilizados para identificar populações específicas para STn em amostras de tumor.

Tabela 13. Expressão de STn em amostras de pacientes

Amostra	Tecido de Origem	Anticorpo	%STn+
160093-2	Câncer de Cólon	SIA201a	22,9
		B72.3	18,9
		CC49	17,1
160101-2	Câncer de Cólon	SIA201a	10
		B72.3	5,8
		CC49	5
160102-2	Cólon	SIA201a	12,9
		B72.3	14,7
		CC49	11,4
160115-2	Câncer de Cólon	SIA201a	5,4
		B72.3	13
		CC49	5,7
160127-2	Câncer de Cólon	SIA201a	4,2
		B72.3	14,4
		CC49	3,5
160149-1	Câncer de Cólon	SIA201a	22,7
		B72.3	10,5
		CC49	9,8
160151-1	Câncer de Cólon	SIA201a	19,6
		B72.3	6,8
		CC49	11,5
169068-1	Câncer de Cólon	SIA201a	10,9
		B72.3	7,4
		CC49	8,4
1601666	Câncer de Cólon	SIA201a	29,4
		B72.3	17,3
		CC49	20,6
160104-2	Câncer de Cólon Metastático para Fígado	SIA201a	47,8
		B72.3	46,6
		CC49	39,4

Exemplo 14. Teste de toxina *in vitro* em linhagens de CRC

[00605] Com base em análises citométricas de fluxo preliminares

revelando que aproximadamente 60-70% da população celular total em linhagens COLO205 e LS174T expressam STn, foi realizado teste *in vitro* para testar os tratamentos com base em anticorpo anti-STn. Dados os resultados preliminares com MMAE-CAFs anti-STn de camundongo e humanizados, os experimentos foram realizados para identificar toxinas/conectores para um CAF anti-STn para câncer colorretal. A resistência de 8 linhagens de CRC (COLO205, LS174T, RKO, HT-29, LS180, e SW403) e também das linhagens celulares modificadas para expressão de STn [COLO205 STn *knockdown*, LS174T STn *knockdown*, RKO STn+ (superexpressão de ST6GalNAc I), e HT-29 STn+ (superexpressão de ST6GalNAc I)] com vários níveis de expressão de STn, é examinada com um painel de 10 toxinas de CAF incluindo auristatinas (MMAE e MMAF), Maitansinas (DM4 e DM1), dímeros de pirrolobenzodiazepina (Talirina e Tesirina) e inibidores de topoisomerase (SN-38 e DXd) e outros agentes naturais (Duocarmicina e Amanitina). A sensibilidade dos CRCs é comparada com o padrão de cuidado (irinotecano, também conhecido como CPT-11) e veículo sozinho para obter as concentrações inibitórias (citotóxicas) semimáximas (CI₅₀). Para realizar isto, toxinas não conjugadas são testadas em linhagens celulares de CRC com níveis variados de expressão de STn endógeno e também em derivados daquelas linhagens celulares nos quais os níveis de STn são quer aumentados quer diminuídos.

[00606] O nocaute (*knockdown*, inativação) da expressão de STn em células COLO205 e LS174T é realizado com siRNA Silenciador direcionado contra ST6GalNAc I [*ST6GalNAc I-directed Silencer siRNA*] (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) usando métodos descritos na literatura (*e.g.*, Gao *et al.*, *Nat. Med.* 2015 Nov; 21(11):1318-25). Em contraste, as células RKO e HT-29 (expressoras de níveis muito baixos ou não detectáveis de STn) são transduzidas com vetores lentivirais distribuidores de constructos de

expressão de ST6GalNAc I, para obter populações clonais expressoras de níveis elevados de STn. As células modificadas são monitoradas para a expressão de STn sobre as superfícies celulares por meio de análises por citometria de fluxo e transferência de Western e os níveis de ST6GalNAc I mRNA são monitorados utilizando qRT-PCR. Toxinas não conjugadas são adicionadas às linhagens de CRC para obter valores de CI_{50} a 24, 48, 72 e 96 horas após incubação para estabelecer sensibilidade. O kit de ensaio luminescente de viabilidade celular CELLTITER-GLO® (Promega, Madison, WI) é usado de acordo com as instruções do fabricante para avaliar a viabilidade celular após o tratamento. Duas toxinas com propriedades de CAF desejáveis são selecionadas para conjugação com anticorpo e caracterização adicional.

Exemplo 15. Avaliação de CAFs anti-STn em modelos de CRC

[00607] Duas toxinas são conjugadas com dois anticorpos humanizados anti-STn selecionados e ensaios de ligação são utilizados para garantir que é mantida a especificidade de ligação para STn. Os ensaios de ligação (ensaio com base em citometria de fluxo, ELISA e arranjo de glicanas) são realizados como previamente descritos. Um anticorpo isotípico humano IgG1 é separadamente conjugado com cada uma das duas toxinas e utilizado como um controle de ligação negativo. Os anticorpos anti-EGFR (clone LA22) e anti-CEA (clone CD66e) são utilizados como controles positivos para a ligação às linhagens MDA-MB-231 e CRC, respectivamente.

[00608] Os CAFs anti-STn são testados em três linhagens de CRC descritas acima para eficácia *in vitro*. 8 (Oito) condições, no total, são testadas incluindo: anti-STn 1+Toxina 1; anti-STn 1+Toxina 2; anti-STn 2+Toxina 1; anti-STn 2+Toxina 2; isótipo+Toxina 1; isótipo+Toxina 2; padrão de cuidado e veículo. Os CAFs anti-STn são avaliados para o efeito deles sobre a viabilidade celular e a formação de colônias usando ensaios de viabilidade e ensaios de crescimento em ágar mole, respectivamente. Os ensaios de

viabilidade são realizados de acordo com o “CELLTITER-GLO® Luminescent Cell Viability Assay Kit” (Promega, Madison, WI). A potência relativa de CAF é calculada, de acordo com as instruções do fabricante, para obter os valores de viabilidade percentual e de CI_{50} . São realizados ensaios de formação de colônias onde as células são diluídas em um meio com base em metilcelulose e crescidas a 37°C durante 5-14 dias na presença dos CAFs. Os números de colônias são contados e comparados. Em ambos os ensaios, é testada uma faixa de concentrações de CAF anti-STn e os valores de CI_{50} aplicáveis são gerados. Os resultados são comparados com os controles agente quimioterapêutico padrão de cuidado e CAF isótipo. Dois CAFs de topo são selecionados com base nos dados de CI_{50} e na informação de formação de colônias.

[00609] Um TMA (*Tissue MicroArray*, Microarranjo de Tecido) de xenoenxerto de CRC é avaliado para a expressão de STn para identificar dois modelos de CRC positivos para STn para estudos *in vivo*. O arranjo consiste em 20 modelos singulares abrangendo vários estádios, subtipos, genótipos residuais (*genetic backgrounds*) e modelos responsivos/resistentes ao tratamento. A expressão de STn é avaliada por imuno-histoquímica (IHQ). O TMA é corado com os dois anticorpos anti-STn, um isótipo controle e um anticorpo secundário apenas. Detecção por IHQ é realizada usando uma estratégia de pré-complexação onde o anticorpo é incubado com anticorpo secundário anti-IgG-humana marcado com biotina e, então, incubado com o tecido. O escore da coloração é determinado para avaliar a coloração específica para membrana neoplásica. Dois modelos de xenoenxerto de CRC e um CAF anti-STn são selecionados para estudos de xenoenxerto *in vivo*.

[00610] O candidato ao CAF anti-STn é avaliado para eficácia *in vivo* em um estudo de agente único, múltiplos fármacos usando duas linhagens celulares e três concentrações de dose (1, 2,5 e 5 mg/kg). Os modelos de xenoenxerto em camundongo são preparados por injeção subcutânea de

células de CRC humano expressoras de STn (*i.e.*, 5×10^6 células 1:1 (v/v) Matrigel) para dentro do flanco direito de camundongos ICR SCID (~80 camundongos). Quando 60 camundongos têm alcançado volumes médios de tumor de $\sim 200 \text{ mm}^3$, eles são randomizados em 6 grupos (n=10 camundongos por grupo) com tamanhos médios de tumor dos grupos aproximadamente equivalentes. Os grupos receberam quer CAF anti-STn (1, 2,5 ou 5 mg/kg), CAF isótipo controle (5 mg/kg), agente SOC (*Standard Of Care*, padrão de cuidado) (irinotecano 40 mg/kg) quer veículo (DPBS). Os tratamentos são administrados por meio de injeção intravenosa uma vez por semana durante quatro semanas com base nos estudos farmacocinéticos (PK) prévios com CAF MMAE anti-STn. Os volumes de tumor e os pesos corporais são medidos duas vezes por semana e os camundongos individuais são mortos quando o tamanho de tumor alcança o ponto final ($\geq 1.500 \text{ mm}^3$) para o grupo com veículo controle ou quando um camundongo torna-se moribundo. Os camundongos de cada grupo são avaliados para expressão de STn de tumor por meio de IHQ e citometria de fluxo no término do estudo.

[00611] Com base nos resultados destes estudos, as(os) toxinas/conectores são adicionalmente otimizadas(os) para melhorar as eficácias *in vivo* e *in vitro* dos CAFs anti-STn.

Exemplo 16. Seleção de modelos de CRC PDX

[00612] Microarranjos de tumor (TMAs) de CRC das células de tumor derivado de paciente (PDX) são avaliados para expressão de STn usando anticorpos humanizados anti-STn para determinar os modelos responsivos para estudos com PDX. TMAs de PDXs fixados em formalina emblocados em parafina (FFPE) bem caracterizados, comerciais (CrownBio, Santa Clara, CA) contendo mais que 200 núcleos no total são avaliados para a expressão de STn por IHQ. Estes TMAs consistem em múltiplos modelos de PDX resistentes *naïve* e padrão de cuidado incluindo aqueles que são resistentes a AP24534 [ponatinibe, (inibidor de RET)], Cetuximabe, Bevacizumabe

(AVASTIN®), Trastuzumabe (HERCEPTIN®), Sorafenibe, 5-Fluorouracila, Cisplatina, Docetaxel, Gencitabina, Irinotecano ou Paclitaxel. TMAs são corados com um anticorpo anti-STn não conjugado, um anticorpo isótipo ou um anticorpo secundário apenas. Todos os TMAs analisados por IHQ têm o escore determinado microscopicamente em um modo cego para intensidade de coloração de anticorpo, frequência de anticorpo, e localização de anticorpo. As correlações entre a expressão de STn e a progressão de CRC são examinadas e usadas para informar as escolhas de modelos.

[00613] Com base nos dados de IHQ, 10 PDXs são escolhidos para teste *in vitro* com o candidato ao CAF anti-STn. Estes 10 modelos de PDX são avaliados para citotoxicidade e formação de colônias em ensaios de viabilidade descritos previamente. Um CAF isótipo controle, três agentes SOC (*Standard Of Care*, padrão de cuidado) (irinotecano, cetuximabe e bevacizumabe, como agentes individuais) e um veículo controle são incluídos para análise. Três modelos de PDX [incluindo 1 modelo PDX resistente padrão de cuidado (SOC, *Standard Of Care*)] são selecionados para estudos *in vivo* com base na expressão de STn e na resposta *in vitro* ao CAF anti-STn.

Exemplo 17. Estudos farmacocinéticos (PK) de dose única

[00614] Antes dos estudos *in vivo*, o candidato ao CAF anti-STn é avaliado para as propriedades farmacocinéticas (PK) em um estudo de dose única em camundongo *in vivo*. Dois níveis de dose (2,5 e 5 mg/kg) e 10 instantes de tempo (0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 168, 336, e 672 horas após a dose) são utilizados neste estudo de dose única. Nove camundongos, no total, são incluídos por grupo de tratamento, com três subgrupos de camundongos para permitir coletas de sangue escalonadas. Nos instantes de tempo indicados, os camundongos são sangrados e o soro é coletado para dentro de tubos separadores de soro. O sangue é permitido coagular durante um mínimo de 30 minutos e então é processado por centrifugação (3.500 rpm durante 10 min a 5°C) dentro de 1 hora da coleta. Após a centrifugação, o soro é separado e

usado em imunoenaios para determinar CAF anti-STn presente no soro. São determinados a meia-vida (HL) de eliminação terminal, a área sob a curva (ASC), a concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) observada, o volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{ss}) e o volume de distribuição em fase terminal (V_z). Os parâmetros farmacocinéticos (PK) são usados para determinar o regime de dosagem ótimo para estudos com PDX *in vivo*.

Exemplo 18. Avaliação de eficácia *in vivo* em modelos de PDX em camundongos

[00615] Estudos com PDX em camundongo são conduzidos usando os três modelos de PDX identificados mediante análise imuno-histoquímica de TMAs de PDX para avaliar a eficácia *in vivo* de candidatos ao CAF anti-STn como uma terapia com agente único. Os camundongos com PDX, randomizados em 6 grupos (10 camundongos por grupo), são administrados com CAF anti-STn a 1, 2,5 ou 5 mg/kg, um CAF isótipo controle (5 mg/kg), um agente SOC (irinotecano (40 mg/kg), cetuximabe (10 mg/kg) ou bevacizumabe (10 mg/kg)) ou veículo sozinho. Os animais são dosados uma vez por semana durante quatro semanas. A expressão de STn é examinada no início e no término do estudo por IHQ e citometria de fluxo.

Exemplo 19. Tratamento de combinação em modelos de PDX em camundongos

[00616] Candidatos ao CAF anti-STn são avaliados para terapia de combinação com terapias padrão de cuidado (SOC, *Standard Of Care*) em um modelo de PDX em camundongo selecionado em tratamentos simultâneos ou sequenciais.

[00617] Para tratamento simultâneo, 9 braços de tratamento, no total, com 10 camundongos por braço são testados incluindo: veículo apenas, CAF anti-STn (1 mg/kg), CAF anti-STn (5 mg/kg), SOC apenas, SOC + veículo, SOC + CAF anti-STn (1 mg/kg), SOC + CAF anti-STn (5 mg/kg), SOC + anticorpo anti-STn não conjugado (1 mg/kg), e SOC + anticorpo anti-STn não

conjugado (5 mg/kg). Os animais são dosados semanalmente durante quatro semanas. A expressão tumoral de STn é examinada no início e no término do estudo por IHQ e citometria de fluxo.

[00618] Para tratamento sequencial, os camundongos são inicialmente tratados com SOC. Após um tratamento de quatro semanas ou uma regressão mediana de tumor para < 25% a partir do volume de tumor original, os camundongos são, então, randomizados em 6 braços como segue: CAF anti-STn (1 mg/kg), CAF anti-STn (5 mg/kg), anticorpos não conjugados (1 mg/kg), anticorpos não conjugados (5 mg/kg), um CAF isótipo controle e veículo controle. Os animais são dosados semanalmente durante quatro semanas. A expressão tumoral de STn é examinada no início e no término do estudo por IHQ e citometria de fluxo.

Exemplo 20. Estudo piloto de toxicologia de múltiplas doses

[00619] Um estudo de múltiplas doses foi conduzido para avaliar as características farmacocinéticas e a toxicidade com a administração de hSIA101-MMAE a macacos Cinomolgos. Os estudos incluíram avaliações de meia-vida como mortalidade/morbidez, observações clínicas, peso corporal, consumo de alimentos, temperatura corporal, irritação local, oftalmologia, e avaliações de patologia clínica. 9 Animais machos (2-4 anos de idade) foram utilizados nestes estudos, com 3 macacos por grupo de tratamento listados na Tabela 14.

Tabela 14. Grupos de tratamento

Grupo	Dose (mg/kg)	Volume da Dose (mL/kg)	Conc. da Dose (mg/mL)	Animais por Grupo
1	1	1,2	0,833	3
2	3	1,2	2,5	3
3	6	1,2	5	3

[00620] Todos os grupos foram dosados 2 vezes no total por injeção intravenosa de *bolus*, uma vez no 1º Dia e de novo no 22º Dia. Amostras de sangue foram coletadas para estudos farmacocinéticos nos 1º Dia e 22º Dia usando o seguinte cronograma: antes da dosagem (0) e então 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96, e 168 horas após a dosagem. Amostras de sangue adicionais foram

coletadas a 240, 336, e 504 horas após a dosagem apenas para a dosagem no 1º Dia. Amostras de sangue foram coletadas para avaliações de patologia clínica (química clínica, hematologia, e coagulação) usando o seguinte cronograma: antes da dosagem (pré-teste), 8º Dia, 22º Dia (pré-segunda dose) e no 29º Dia antes da eutanásia. As avaliações químicas clínicas incluíram avaliação de creatinina sódica, proteína total, potássio, fosfatase alcalina, triglicerídeos, cloreto, alanina-aminotransferase, bilirrubina total, aspartato-de-cálcio-aminotransferase, albumina, fósforo inorgânico, glicose, globulina, nitrogênio de ureia, colesterol, e razão de albumina/globulina. As avaliações de hematologia incluíram avaliação de hematócrito, concentração média de hemoglobina corpuscular, hemoglobina, contagem de reticulócitos (absoluta e relativa), contagem de plaquetas, contagem de eritrócitos, volume médio de plaquetas, contagem total de células brancas do sangue, hemoglobina corpuscular média, contagem diferencial de células brancas do sangue (absoluta & relativa), volume médio corpuscular, e largura da distribuição de células vermelhas do sangue. K3-EDTA foi usado como um anticoagulante. As avaliações de coagulação incluíram avaliação de tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Todos os macacos dos grupos foram eutanasiados no 29º Dia e os órgãos foram coletados para necropsia.

[00621] Soro de amostras de sangue de sujeitos foi usado para avaliação farmacocinética (PK) de níveis de IgG humana. Os parâmetros farmacocinéticos (PK) foram estimados usando um *software* farmacocinético Phoenix (Certara, EUA) usando uma abordagem não compartimental consistente com a rota de administração intravenosa de *bolus*. Todos os parâmetros foram gerados a partir das concentrações de IgG humana individuais em soro dos 1º Dia e 22º Dia. Os parâmetros foram estimados usando tempos de amostragem nominais relativos ao término de cada administração de dose. A concentração no tempo zero no 1º Dia foi retroextrapolada com base nas primeiras duas concentrações séricas

observadas para o propósito de estimação de parâmetro. Os valores de concentração relatados como não quantificáveis foram tratados como amostras ausentes.

[00622] Os valores de concentração sérica de anticorpo obtidos em relação à primeira dose são apresentados na Figura 2 e os valores obtidos em relação à segunda dose são apresentados na Figura 3. A área sob a curva de concentração em função do tempo (ASC) foi calculada usando o método trapezoidal linear com interpolação linear/linear. A ASC não foi calculada para perfis farmacocinéticos (PK) com menos que 3 concentrações quantificáveis de item de teste em instantes de tempo separados. Quando prática, a fase de eliminação terminal de cada curva de concentração em função do tempo foi identificada usando pelo menos os três finais valores de concentração observados. O coeficiente angular da fase terminal foi determinado usando regressão linear-log dos dados de concentração não ponderada. Os valores médios com desvio padrão (DP; entre parênteses) são apresentados na Tabela 15 e na Tabela 16. $C_{\text{máx}}$ refere-se à concentração máxima observada medida após a dosagem. $ASC_{\text{última}}$ refere-se à área sob a curva de concentração em função do tempo a partir do início da administração de dose até a última concentração quantificável observada usando o método trapezoidal linear ou linear/log. $ASC_{0-7^{\circ}\text{Dia}}$ refere-se ao mesmo, mas em que a área além do 7º Dia não é incluída. ASC_{INF} refere-se à área sob a curva de concentração em função do tempo a partir do início da administração de dose extrapolada para o tempo infinito. CL refere-se à taxa de depuração aparente (*Apparent Clearance Rate*) do anticorpo a partir da matriz analisada. HL refere-se à meia-vida (HL, *Half-Life*) de eliminação terminal aparente. V_{ss} refere-se ao volume aparente de distribuição no estado de equilíbrio.

Tabela 15. Parâmetros PK obtidos após a primeira dose

Dose (mg/kg)	C _{máx} (µg/mL); Média (DP)	ASC _{última} (Dia*µg/mL); Média (DP)	ASC _{0-7ºDia} (Dia*µg/mL); Média (DP)	ASC _{INF} (Dia*µg/mL); Média (DP)	CL (mL/kg/dia); Média (DP)	HL (Dia); Média (DP)	V _{ss} (mL/kg); Média (DP)
1	19,13 (1,78)	57,31 (7,5)	42,6 (0,96)	62,62 (7,81)	16,13 (1,96)	4,66 (1,43)	96,83 (17,29)
3	81,24 (11,17)	228,39 (25,02)	157,34 (4,94)	267,39 (56,39)	11,57 (2,52)	7,47 (3,91)	96,16 (30,64)
6	151,37 (20,97)	419,05 (50,18)	342,22 (32,58)	440,63 (28,26)	13,65 (0,86)	3,53 (0,51)	61,62 (10,98)

Tabela 16. Parâmetros PK obtidos após a segunda dose

Dose (mg/kg)	C _{máx} (µg/mL); Média (DP)	ASC _{última} (Dia*µg/mL); Média (DP)
1	22,16 (0,01)	41,59 (4,68)
3	75,27 (5,18)	145,48 (51,93)
6	117,23 (45,7)	172,36 (141,18)

[00623] No 1º Dia, o aumento em exposição sistêmica à IgG humana foi linear e proporcional à dose entre 1 mg/kg/dose e 6 mg/kg/dose, com uma pequena tendência para ser mais que proporcional à dose. No 22º Dia, o aumento em exposição foi não linear entre 1 mg/kg/dose e 6 mg/kg/dose. Um decréscimo em exposição sistêmica à IgG humana, em termos de ASC(0-t), foi observado quando se comparam 1º Dia e 22º Dia, aumentando com o aumento do nível de dose.

[00624] Os animais sobreviventes até o 29º Dia foram eutanasiados e submetidos à necropsia. Os tecidos requeridos para avaliação microscópica foram cortados, rotineiramente processados, embebidos em parafina, e corados com hematoxilina e eosina antes da avaliação por microscopia de luz.

[00625] Não foram notadas descobertas macroscópicas relacionadas ao artigo de teste. As descobertas macroscópicas observadas foram consideradas incidentais, da natureza comumente observada nesta cepa e nesta idade de macacos Cinomolgos, e/ou foram de incidência similar nos animais de controle e tratados e, por conseguinte, foram consideradas não relacionadas com a administração de anticorpo. Não ocorreram perda de peso corporal ou mortes dentre os animais de estudo e não foram observadas alterações patológicas macroscópicas em todos os órgãos avaliados. Alterações histopatológicas foram limitadas à medula óssea, que é um efeito associado com MMAE. Foram observados celularidade decrescida mínima a moderada

e decréscimo moderado em razão entre mieloide e eritroide. Alterações em parâmetros hematológicos (*i.e.*, neutropenia moderada) foram consistentes com outros conjugados de anticorpo-fármaco-MMAE e não foram considerados relacionados com alvo. Finalmente, todos os resultados de química clínica permaneceram normais durante todo o estudo.

Exemplo 21. Geração de Linhagem Celular

[00626] Com o propósito de produzir anticorpos de grau clínico, uma linhagem celular de Ovário de Hamster Chinesa (CHO, *Chinese Hamster Ovary*) é gerada de acordo com o “GIBCO® FREEDOM® CHO-S® Kit” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). As células CHO-S são transfectadas com um constructo contendo os genes que codificam o anticorpo humanizado anti-STn. Clones estáveis são selecionados com base em um esquema de seleção de duas fases. Clones com altos rendimentos de produção são selecionados para caracterização adicional. A linhagem celular estável é transferida para uma instalação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para a produção de anticorpos para teste de toxicologia BPL (dentro das Boas Práticas Laboratoriais) e amostra para teste clínico de fase I.

Exemplo 22. Estudos de reatividade cruzada com tecidos

[00627] Estudos de reatividade cruzada com tecidos foram conduzidos para avaliar o perfil de ligação (tanto ligação em alvo previsto (*on-target*) quanto ligação potencial em alvo diferente do previsto (*off-target*)) em espécies humana e relevantes usadas em teste de segurança não clínica. Anticorpos humanizados anti-STn foram examinados para ligação a um painel de tecidos normais de humano, rato, camundongo, e macaco Cinomolgo. O estudo foi conduzido em 10 seções de tecidos normais congelados a 1-3 µg/mL: coração, cérebro, rim, estômago, pulmão, intestinos delgados, cólon, fígado, pâncreas, baço e medula óssea. O controle positivo foi um neoplasma pancreático humano que continha células cancerosas positivas para STn e o controle negativo foi células estromais normais

contidas dentro do mesmo espécime. Coloração através de todos os tecidos normais foi restrita ao citoplasma. Análises adicionais foram conduzidas sem anticorpo primário ou usando isótipo IgG controle como controles negativos.

[00628] Dentre os três anticorpos testados, hSIA101 tem a reatividade cruzada mais baixa com tecidos humanos normais. Atividade de ligação moderada foi vista com tecidos de vasos cardíacos, células epiteliais do estômago, células epiteliais do intestino delgado e vasos do baço. Também foi descoberto que os anticorpos reagem cruzadamente com tipos similares de tecido de macaco Cinomolgo (consulte a Tabela 17) e de rato (não mostrado). Na Tabela: 1+ = coloração fraca; 2+ = coloração moderada; 3+ = coloração forte; 4+ = coloração intensa; Neg = negativa; freq = frequente (coloração em >75%-100% das células); oc = ocasional (coloração >25%-50% das células); e rara refere-se à coloração em 1-5% das células.

Tabela 17. Resultados do estudo de reatividade cruzada com tecidos

Tecido	Humano	Macaco Cinomolgo
Vaso Cardíaco	2+ rara (citoplasma)	Neg
Células Epiteliais do Estômago	2-3+ freq (citoplasma)	2-3+ oc (citoplasma)
Vaso do Estômago	Neg	2+ oc (citoplasma)
Epitélio do Pulmão	Neg	2-3+ freq (citoplasma)
Células Epiteliais do Intestino Delgado	2-4+ freq (citoplasma)	3-4+ freq (citoplasma)
Células Epiteliais do Cólon	1+ freq (citoplasma)	Neg
Vaso do Cólon	Neg	4+ freq (citoplasma)
Vaso do Pâncreas	Neg	2-3+ freq (citoplasma)
Vaso do Baço	2-3+ freq (citoplasma)	Neg

[00629] Não foi observada coloração em membranas celulares em qualquer tecido. Cérebro, cerebelo, rim e fígado não coraram. Análises de controle com isótipo e anticorpo secundário-apenas não demonstraram coloração, enquanto que apenas tecido de controle positivo (neoplasma pancreático) demonstrou forte coloração em membrana com hSIA101.

Exemplo 23. Comparação entre tratamento com anticorpo anti-STn e tratamento com cisplatina em um modelo de tumor PDX ovariano

[00630] Candidatos aos CAFs anti-STn foram comparados com as terapias padrão de cuidado (SOC, *Standard Of Care*) em um modelo de tumor xenoinxertado usando tumores de câncer ovariano derivados de pacientes

humanos provenientes de dois pacientes. As amostras dos pacientes foram previamente confirmadas como expressoras de STn por coloração imuno-histoquímica e tumores de um dos pacientes não previamente tratados com quimioterapia (*químio-naïve*) e aqueles de um paciente previamente tratados com quimioterapia foram implantados em camundongos nus atímicos imunodeficientes. Os camundongos com crescimento de tumor bem sucedido foram selecionados e foram administrados com anticorpos (dose de 5 mg/kg) por injeção IV semanal; com cisplatina (dose de 3 mg/kg) por injeção intraperitoneal semanal (limitada a 3 doses); ou com veículo-controle. Os anticorpos administrados incluíram hSIA101, hSIA101-CAF (conjugado com MMAE), ou isótipo IgG controle conjugado com MMAE (isótipo-CAF). Os camundongos com tumores *químio-naïve* receberam tratamentos com anticorpo durante 4 semanas, enquanto que os camundongos com tumores quimiorresistentes receberam tratamentos com anticorpo durante 6 semanas. Os volumes dos tumores em camundongos tratados com hSIA101-CAF ou isótipo-CAF foram monitorados durante 4-5 semanas após o término do tratamento para avaliar a regressão de tumor.

[00631] Os volumes de tumores sensíveis à cisplatina (Figura 4, painel superior) e resistentes à cisplatina (Figura 4, painel inferior) foram medidos ao longo do tempo. O tratamento com hSIA101-CAF produziu a redução mais eficaz em volume de tumor em comparação com os outros tratamentos. Tumores gerados com células resistentes à cisplatina foram significativamente reduzidos pelo tratamento com hSIA101-CAF em comparação com o tratamento com cisplatina (Figura 4, painel inferior). Consequentemente, o tratamento com hSIA101-CAF pode ser usado para eficazmente tratar tumores sensíveis à cisplatina e resistentes à cisplatina. Curiosamente, 75% dos camundongos *químio-naïve* tratados com hSIA101-CAF tornaram-se completamente isentos de tumor quatro semanas após o término do tratamento, enquanto que regressão de tumor maior que 50% foi observada

em 75% dos camundongos com tumores quimiorresistentes 5 semanas após o término de tratamento com hSIA101-CAF.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de câncer em um sujeito compreendendo administrar um anticorpo, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é administrado em uma dose de cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, em que o dito anticorpo tem uma meia-vida terminal de cerca de 50 horas a cerca de 200 horas, e em que o dito anticorpo liga-se ao antígeno sialil-Tn (STn).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo compreende:

um domínio variável de cadeia pesada (VH) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7 e 9; e

um domínio variável de cadeia leve (VL) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 8 e 10.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo compreende um conjugado de anticorpo-fármaco (CAF).

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo está conjugado com monometil-auristatina E (MMAE).

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é administrado intravenosamente.

6. Método de tratamento de câncer colorretal, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende administrar um anticorpo anti-STn a um sujeito com câncer colorretal, em que o dito anticorpo anti-STn compreende:

um domínio variável de cadeia pesada (VH) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 9 e 11; e

um domínio variável de cadeia leve (VL) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 8, 10 e 12.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito câncer colorretal é resistente ao tratamento com pelo menos um(a) de cetuximabe, panitumumabe, bevacizumabe, ramucirumabe, trastuzumabe, ponatinibe, sorafenibe, 5-fluorouracila, cisplatina, docetaxel, gencitabina, irinotecano, paclitaxel e oxaliplatina.

8. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-STn compreende um CAF.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito CAF compreende pelo menos um conjugado, o dito pelo menos um conjugado selecionado dentre um(a) ou mais de uma auristatina, uma maitansina, uma tubulisina, um alcaloide de Vinca, um dímero de pirrolobenzodiazepina, uma camptotecina, uma duocarmicina, uma amanitina, um inibidor de fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K) e um inibidor de proteína quinase-quinase ativada por mitógeno (MEK).

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o dito CAF compreende um ou mais polímero, em que o dito um ou mais polímero conecta o dito anticorpo anti-STn e o dito pelo menos um conjugado.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito um ou mais polímero compreende um ou mais de um poli(glicol etilênico) (PEG), um poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (poli-HPMA), um poli(α -aminoácido), um polímero de carboidrato, um

glicopolissacarídeo, um glicolípido, um glicoconjugado, um poliglicerol, um poli(álcool vinílico), um poli(ácido acrílico), um policetal e um poliacetal.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o dito um ou mais polímero compreende um poli(1-hidroximetil-etileno-hidroximetil-formal) (PHF).

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-STn mata células expressoras de STn com uma concentração inibitória semimáxima de cerca de 0,1 nM a cerca de 50 nM.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 13, caracterizado pelo fato de que a administração do dito anticorpo anti-STn é realizada em combinação com pelo menos um outro tratamento terapêutico.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um outro tratamento terapêutico compreende um tratamento terapêutico padrão-de-cuidado.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um outro tratamento terapêutico é selecionado dentre um ou mais de cetuximabe, panitumumabe, bevacizumabe, ramucirumabe, trastuzumabe, ponatinibe, sorafenibe, 5-fluorouracila, cisplatina, docetaxel, gencitabina, irinotecano, paclitaxel e oxaliplatina.

17. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um outro tratamento terapêutico compreende administração de pelo menos um inibidor do ciclo celular.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um inibidor do ciclo celular é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK).

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de CDK inibe CDK4 e/ou CDK6.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de CDK é selecionado dentre palbociclibe, ribociclibe e abemaciclibe.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 20, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-STn é tratado simultaneamente com o dito pelo menos um outro tratamento terapêutico.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 20, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-STn é tratado sequencialmente com o dito pelo menos um outro tratamento terapêutico.

23. Método de tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende administrar um anticorpo anti-STn a um sujeito com câncer, em que o dito anticorpo anti-STn compreende:

um domínio variável de cadeia pesada (VH) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 9 e 11; e

um domínio variável de cadeia leve (VL) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 8, 10 e 12,

em que a administração do dito anticorpo anti-STn é realizada em combinação com pelo menos um inibidor do ciclo celular.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um inibidor do ciclo celular é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK).

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de CDK inibe CDK4 e/ou CDK6.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de CDK é selecionado dentre palbociclibe, ribociclibe e abemaciclibe.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-STn é administrado simultaneamente com o dito pelo menos um inibidor do ciclo celular.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-STn é administrado sequencialmente com o dito pelo menos um inibidor do ciclo celular.

29. Conjugado de Anticorpo-Fármaco (CAF), caracterizado pelo fato de que compreende:

a. um anticorpo anti-STn, em que o dito anticorpo anti-STn compreende:

um VH com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 9 e 11;

um VL com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 8, 10 e 12; e

b. um ou mais agente citotóxico.

30. CAF de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o dito um ou mais agente citotóxico é selecionado a partir de pelo menos um(a) de uma auristatina, uma maitansina, uma tubulisina, um alcaloide de Vinca, um dímero de pirrolobenzodiazepina, uma camptotecina, uma duocarmicina, uma amanitina, um inibidor de PI3K e um inibidor de MEK.

31. CAF de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-STn está conjugado com o dito um ou mais agente citotóxico por meio de um conector.

32. CAF de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, caracterizado pelo fato de que o dito CAF compreende um ou mais

polímero conectando o dito anticorpo anti-STn e o dito um ou mais agente citotóxico.

33. CAF de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito um ou mais polímero compreende um ou mais de um PEG, um poli-HPMA, um poli(α -aminoácido), um polímero de carboidrato, um glicopolissacarídeo, um glicolípido, um glicoconjugado, um poliglicerol, um poli(álcool vinílico), um poli(ácido acrílico), um policetal, um poliacetal e poli(1-hidroximetiletileno-hidroximetilformal) (PHF).

34. CAF de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito um ou mais polímero compreende PHF.

35. CAF de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 34, caracterizado pelo fato de que o dito um ou mais polímero é conectado ao dito anticorpo anti-STn por meio de um conector.

36. CAF de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 34, caracterizado pelo fato de que o dito um ou mais agente citotóxico é conectado ao dito um ou mais polímero por meio de um conector.

37. CAF de acordo com qualquer uma das reivindicações 31, 35 ou 36, caracterizado pelo fato de que o dito conector é um conector clivável.

38. Método de tratamento de câncer em um sujeito, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem pelo menos uma célula de câncer expressora de STn, o método compreendendo administrar ao sujeito o CAF como definido em qualquer uma das reivindicações 29 a 37.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma célula de câncer é uma célula de câncer ovariano.

40. Método de acordo com a reivindicação 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma célula de câncer é resistente ao tratamento com pelo menos um agente quimioterapêutico.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um agente quimioterapêutico é cisplatina.

42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 41, caracterizado pelo fato de que o CAF é administrado em uma dose de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 25 mg/kg.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 42, caracterizado pelo fato de que o CAF é administrado por injeção intravenosa.

44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 43, caracterizado pelo fato de que o CAF é administrado diária, semanal ou mensalmente.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28 ou 38 a 44, caracterizado pelo fato de que um CAF é administrado ao sujeito, o CAF compreendendo:

um VH compreendendo SEQ ID NO: 7;

um VL compreendendo SEQ ID NO: 8;

pelo menos uma região constante de IgG humana; e

um conjugado citotóxico, em que o dito conjugado citotóxico está conjugado com a pelo menos uma região constante de IgG humana por meio de um conector.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma região constante de IgG humana é selecionada a partir de uma ou mais de SEQ ID NOs: 15 e 16.

47. Método de acordo com a reivindicação 45 ou 46, caracterizado pelo fato de que o conjugado citotóxico compreende MMAE.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 47, caracterizado pelo fato de que o CAF é administrado em uma dose de cerca de 1 mg/kg a cerca de 6 mg/kg.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 48, caracterizado pelo fato de que o CAF é administrado por injeção intravenosa de bolus.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 49, caracterizado pelo fato de que o CAF é administrado como parte de uma composição, em que a composição inclui pelo menos um excipiente.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada em um volume de cerca de 0,1 mL/kg a cerca de 10 mL/kg.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada em um volume de cerca de 1,2 mL/kg.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 52, caracterizado pelo fato de que a composição compreende uma concentração de CAF de cerca de 0,5 mg/mL a cerca de 10 mg/mL.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 53, caracterizado pelo fato de que o CAF apresenta uma meia-vida aparente de eliminação terminal de cerca de 2 dias a cerca de 8 dias.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 54, caracterizado pelo fato de que CAF apresenta uma taxa aparente de depuração de cerca de 10 mL/kg/dia a cerca de 20 mL/kg/dia.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 55, caracterizado pelo fato de que o CAF apresenta um volume aparente de distribuição no estado de equilíbrio de cerca de 50 mL/kg a cerca de 100 mL/kg.

57. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 56, caracterizado pelo fato de que o CAF apresenta uma concentração máxima observada de cerca de 10 µg/mL a cerca de 200 µg/mL.

58. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 45-57, caracterizado pelo fato de que CAF apresenta uma área sob a curva de concentração em função do tempo (ASC) desde o início da administração até a última concentração quantificável observável de cerca de 50 dias* $\mu\text{g/mL}$ a cerca de 500 dias* $\mu\text{g/mL}$.

Fig. 1A

Especificidade de ligação para STn

(Grupo 1)

Epítipo detectado (elipse maior)

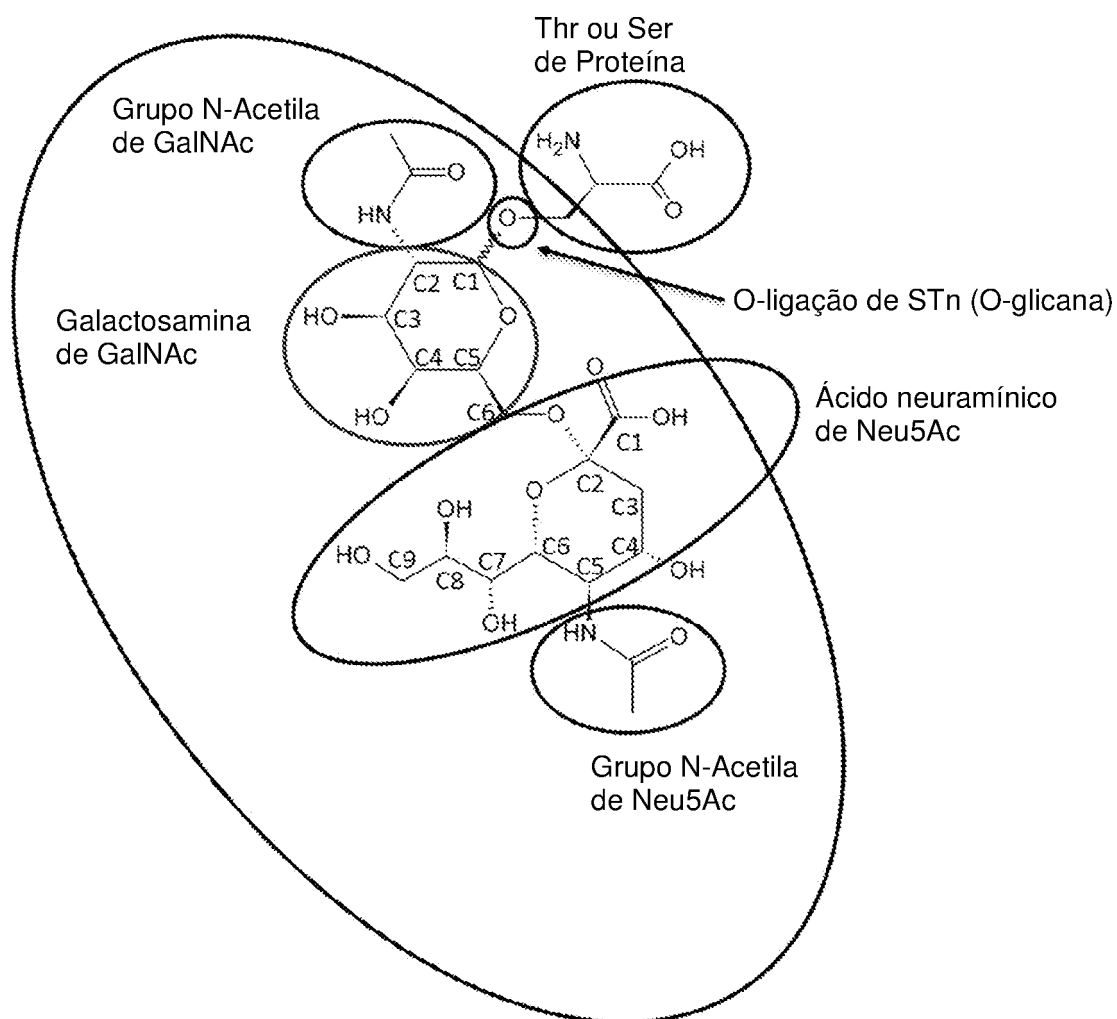


Fig. 1B

Especificidade de ligação para STn

(Grupo 2)

Epítopo detectado (elipse maior)

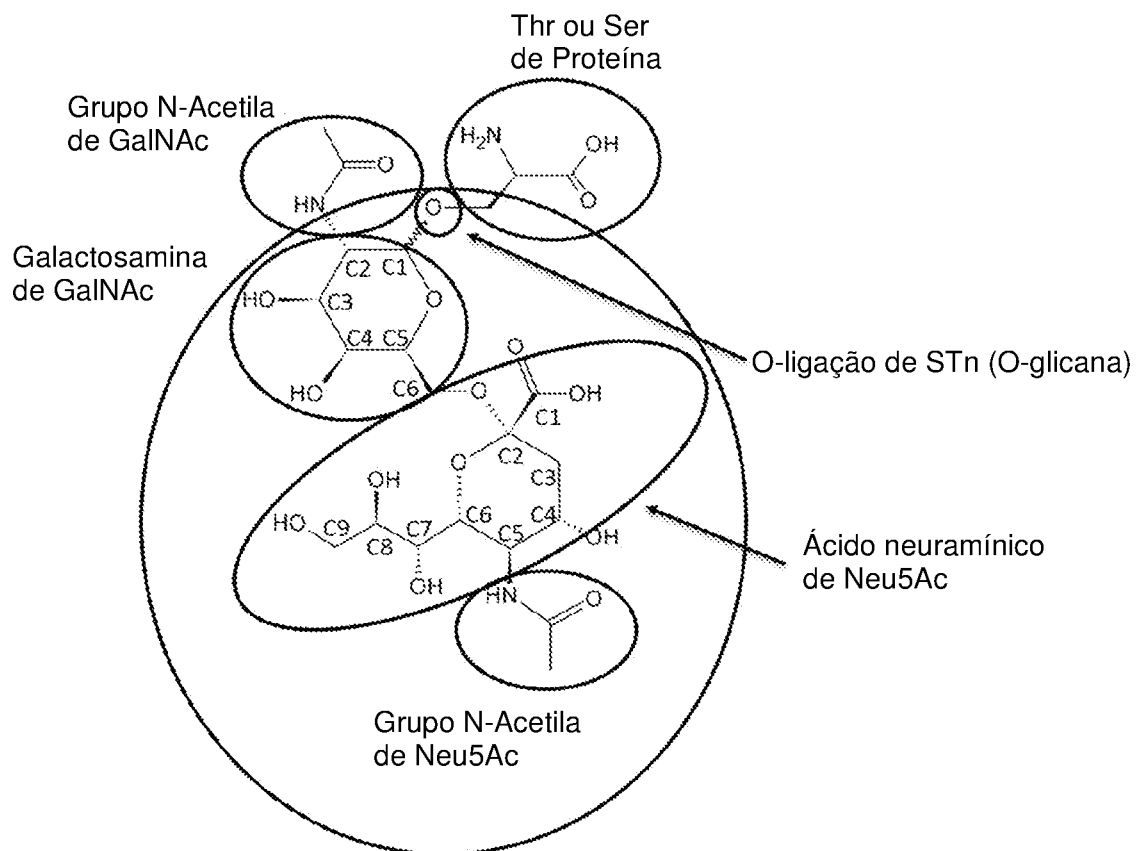


Fig. 1C

Especificidade de ligação para STn

(Grupo 3)

Epítipo detectado (elipse maior)

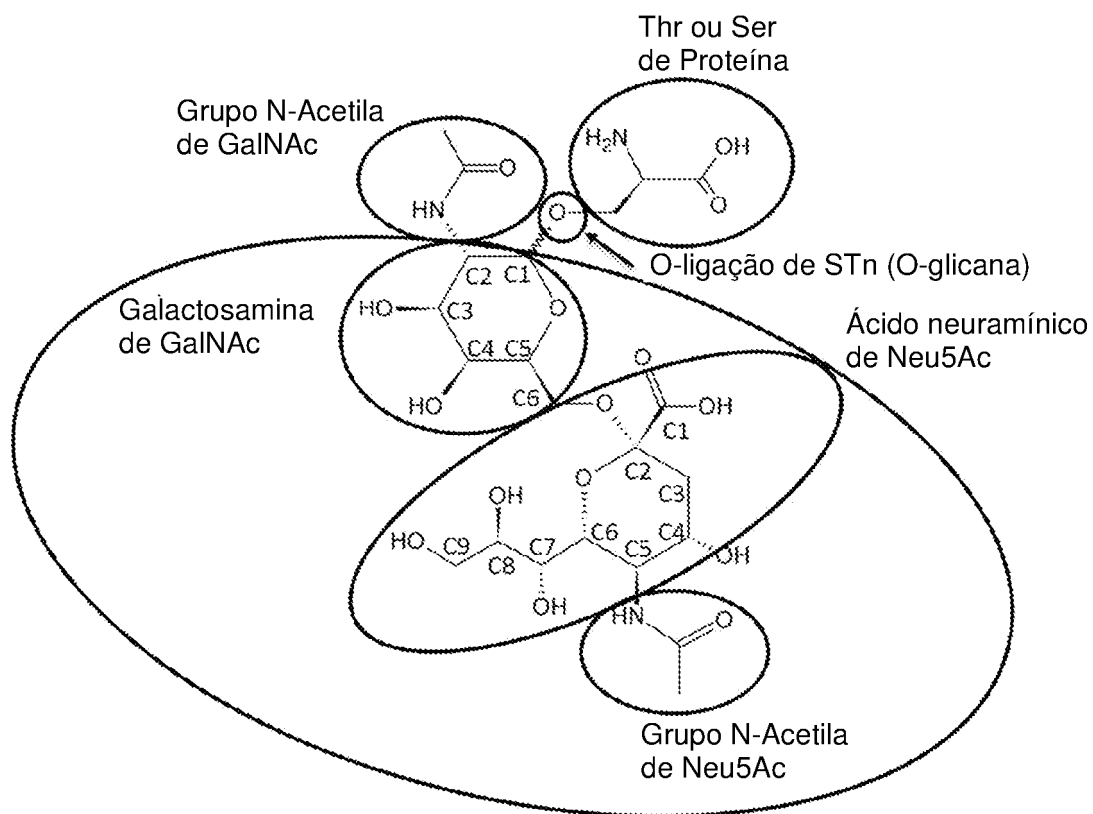


Fig. 1D

Especificidade de ligação para STn

(Grupo 4)

Epítopo detectado (elipse maior)

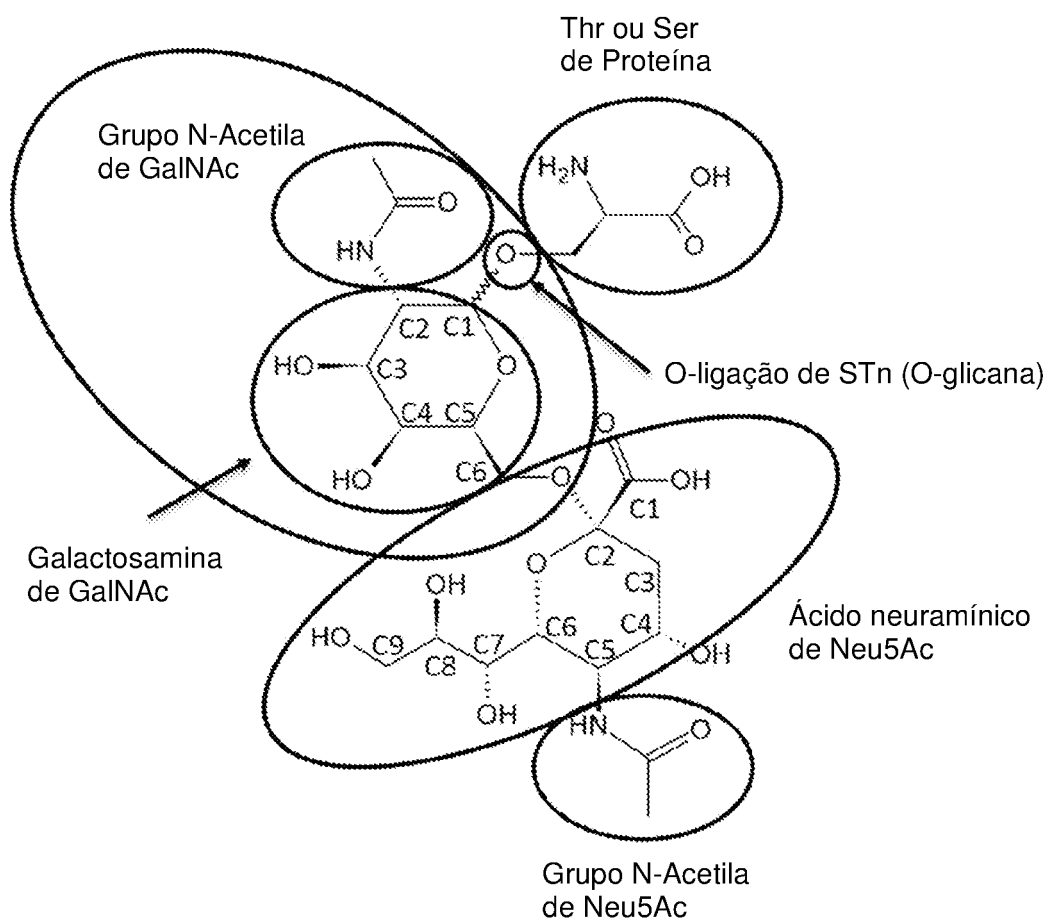


Fig. 2

Concentrações séricas de anticorpo após 1º Dia da administração

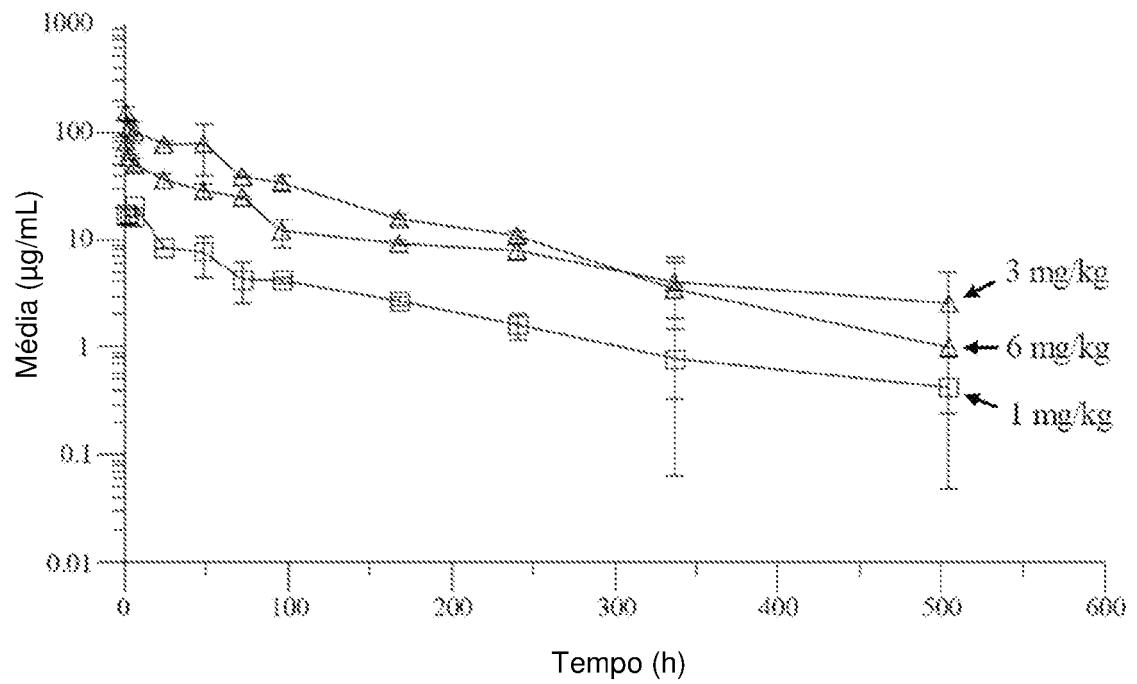


Fig. 3

Concentrações séricas de anticorpo após 22º Dia da administração

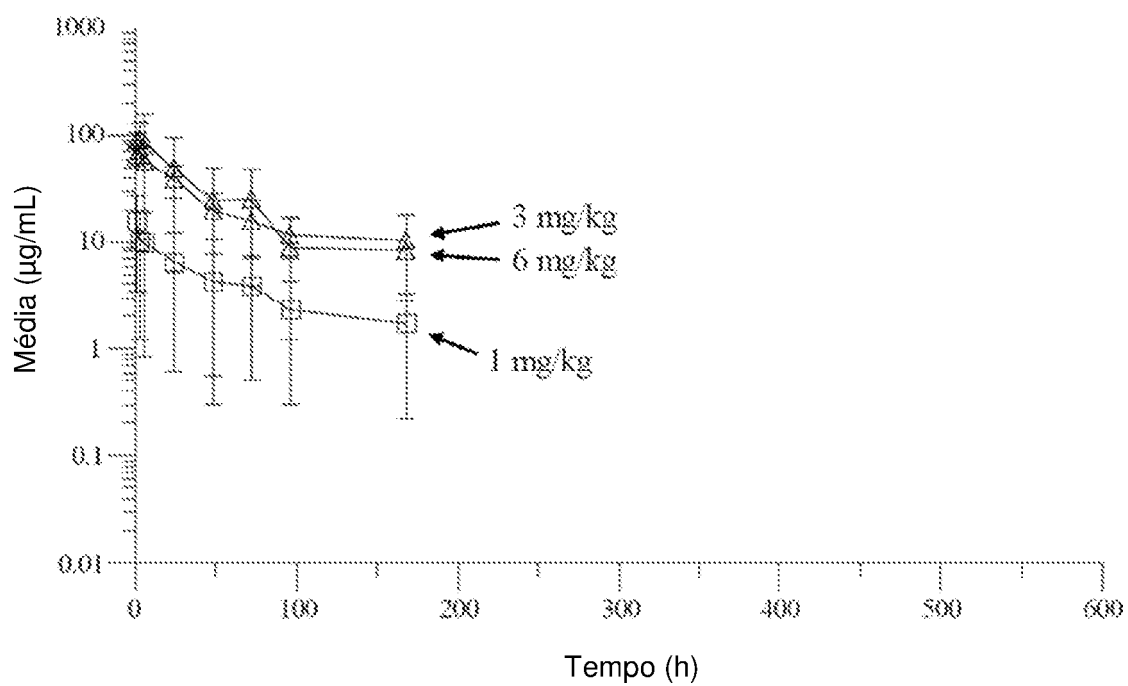
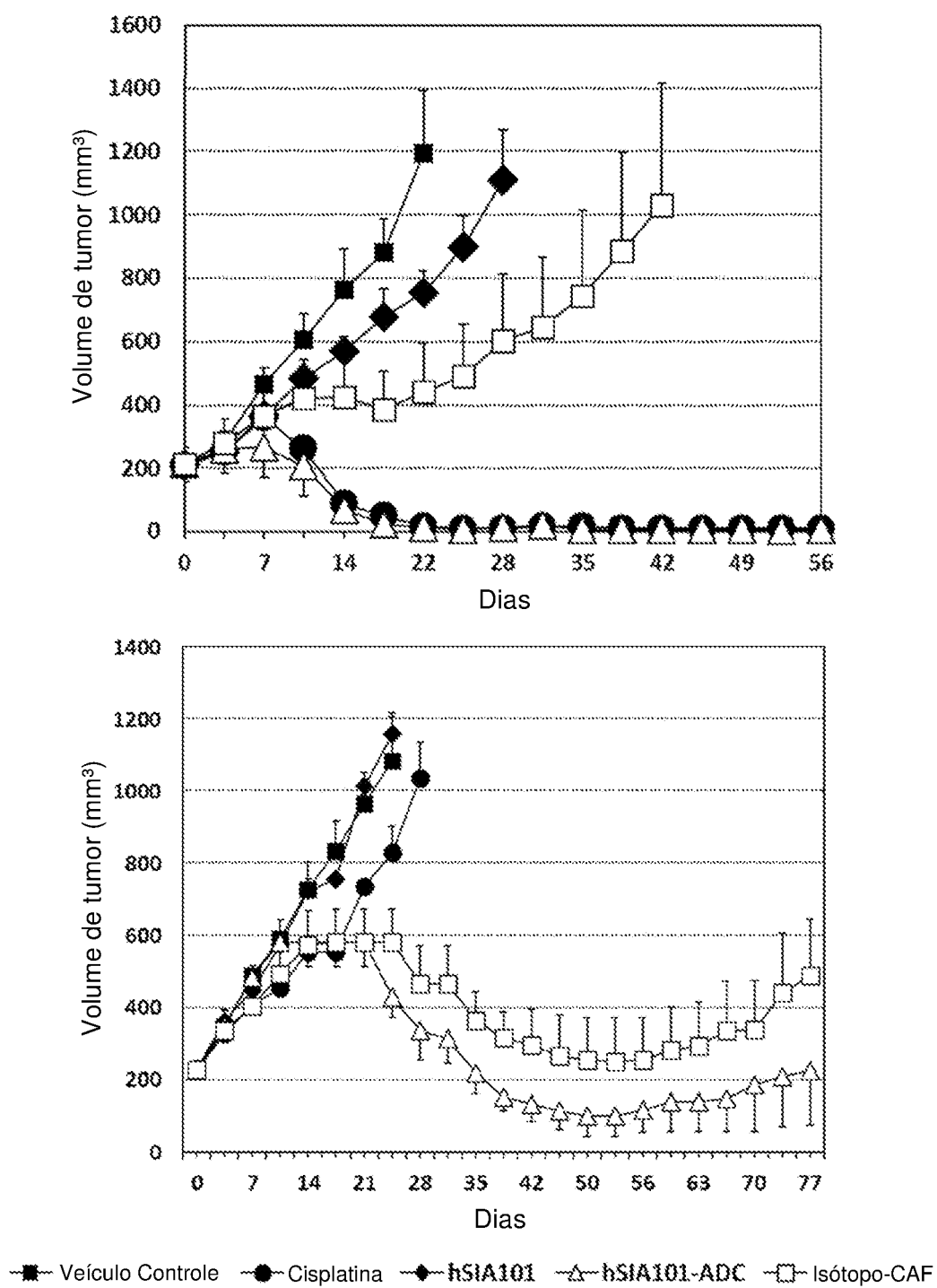


Fig. 4



RESUMO

MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER, E, CONJUGADO DE ANTICORPO-FÁRMACO

São providos métodos de tratamento de câncer que incluem administração de anticorpos interagentes com glicana. São incluídos anticorpos anti-antígeno-sialil-Tn e composições e formulações relacionadas adequados para alcançar níveis desejáveis de bioatividade, biodisponibilidade e toxicidade.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P139212list.txt
- Data de Geração do Código: 08/10/2019
- Hora de Geração do Código: 17:40:04
- Código de Controle:
 - Campo 1: 396C00D431BFF879
 - Campo 2: 7803582B5F5A7A28