

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 674**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2019 PCT/EP2019/062756**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2019 WO19219889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2019 E 19724502 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2023 EP 3794041**

54 Título: **Anticuerpo anti-MUC1**

30 Prioridad:

18.05.2018 EP 18173253

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

24.10.2023

73 Titular/es:

**GLYCOTOPE GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**GELLERT, JOHANNA;
FLECHNER, ANKE;
WEIGELT, DOREEN y
DANIELCZYK, ANTJE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 951 674 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-MUC1

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de los anticuerpos. Se proporciona un anticuerpo anti-MUC1 mutado con aumento de la afinidad de unión al antígeno. En particular, se proporciona una versión mutada del anticuerpo humanizado PankoMab en el que la asparagina 57 de la región variable de la cadena pesada está sustituida por otro aminoácido. De este modo, se suprime el sitio de glicosilación en la región CDR2 y se aumenta la afinidad de unión al antígeno. En las realizaciones específicas, la presente invención se refiere al uso terapéutico y de diagnóstico de este anticuerpo ya los métodos para producir dichos anticuerpos.

10 Antecedentes de la invención

15 Los anticuerpos contra antígenos asociados a tumores son tratamientos ampliamente utilizados contra el cáncer. Hoy en día, muchos anticuerpos contra el cáncer están aprobados para la terapia humana. Algunos de estos anticuerpos actúan al bloquear ciertas rutas de señalización que son críticas para la supervivencia o proliferación de células cancerosas específicas. Otros anticuerpos contra el cáncer activan la respuesta inmunitaria del paciente contra las células cancerosas diana, por ejemplo, al iniciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) a través de las células destructoras naturales. Este mecanismo es inducido por la unión de la parte Fc del anticuerpo a los receptores Fc sobre las células inmunitarias.

20 Un grupo interesante e importante de anticuerpos son aquellos dirigidos contra proteínas de mucina. Las mucinas son una familia de proteínas altamente glicosiladas de alto peso molecular producidas por muchos tejidos epiteliales en vertebrados. Se pueden subdividir en proteínas de mucina que están unidas a la membrana debido a la presencia de un dominio hidrofóbico que atraviesa la membrana que favorece la retención en la membrana plasmática, y mucinas que se secretan sobre las superficies mucosas o se secretan para convertirse en un componente de la saliva. La familia de proteínas de mucina humana consiste en muchos miembros de la familia, que incluye la MUC1 unida a la membrana.

25 El aumento de la producción de mucina ocurre en muchos adenocarcinomas, que incluyen el cáncer del páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, etc. Las mucinas también se sobreexpresan en enfermedades pulmonares tales como el asma, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o fibrosis quística. Dos mucinas de membrana, MUC1 y MUC4, se han estudiado ampliamente en relación con su implicación patológica en el proceso de la enfermedad. Más aún, las mucinas también se están investigando por su potencial como marcadores de diagnóstico. Varios anticuerpos dirigidos contra proteínas de mucina (Clin. Cancer Res., 2011 Nov 1;17(21):6822-30, PLoS One, 2011 Jan 14;6(1):e15921, Cancer Immunol. Immunother., 2006 Feb 17;55(11):1337-47, US 2015/0005474, WO 2011/012309 A1), en particular MUC1, son conocidos en la técnica. Sin embargo, aún se podría mejorar su eficacia terapéutica.

35 En vista de esto, subsiste la necesidad en la técnica de proporcionar anticuerpos anti-MUC1 terapéuticos con propiedades mejoradas. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico)

Resumen de la invención

40 Los presentes inventores han descubierto que la supresión del sitio de glicosilación en la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-MUC1 PankoMab no anuló la unión al antígeno, sino que aumentó inesperadamente la afinidad del anticuerpo del antígeno. Esto fue particularmente sorprendente ya que el sitio de glicosilación está ubicado en la segunda región determinante de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (CDR-H2). Las CDR son aquellas regiones de un anticuerpo que están directamente implicadas en la unión al antígeno y proporcionan el contacto con el epítipo. Por lo tanto, generalmente se espera que modificar los aminoácidos de una CDR sea perjudicial para la afinidad de unión al antígeno. El anticuerpo PankoMab humanizado comprende adicionalmente un sitio de glicosilación en CDR-H2, que lleva una gran estructura de carbohidratos. Esta estructura de carbohidrato está presente directamente en la interfaz de unión al antígeno y, por tanto, se consideró que estaba implicada en la unión al antígeno. Sin embargo, como se demuestra en los ejemplos, la variante de PankoMab (N54Q) en la que el sitio de glicosilación se suprime al sustituir el aminoácido que lleva la estructura de carbohidrato muestra un aumento de la afinidad de unión al antígeno.

50 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo capaz de unirse a MUC1, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y

(ii) una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención. Además, se proporcionan en un tercer aspecto, un casete o vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención y un promotor conectado operativamente con dicho ácido nucleico y, en un cuarto aspecto, una célula huésped que comprende el ácido nucleico o el casete o vector de expresión de acuerdo con la invención.

10 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un conjugado que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención conjugado a un agente adicional.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención, el ácido nucleico de acuerdo con la invención, el casete o vector de expresión de acuerdo con la invención, la célula huésped de acuerdo con la invención, o el conjugado de acuerdo con la invención.

15 De acuerdo con un séptimo aspecto, la invención proporciona el anticuerpo, el ácido nucleico, el casete o vector de expresión, la célula huésped, la composición o el conjugado de acuerdo con la invención para uso en medicina, en particular en el tratamiento, prevención o diagnóstico del cáncer

Se describe además un método para aumentar la afinidad de unión a MUC1 de anticuerpo que comprende

20 (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y

(ii) una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6,

25 el método comprende la etapa de sustituir el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 con cualquier residuo de aminoácido excepto asparagina, lo que resulta en CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En un octavo aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1, que comprende

(a) proporcionar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende

30 (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y

35 (ii) una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

(b) introducir una mutación en dicho ácido nucleico para producir un ácido nucleico mutado, en la que la mutación se introduce en el codón que codifica el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 de tal manera que dicho codón codifica glutamina; y

40 (c) producir el anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1 al expresar el ácido nucleico mutado en una célula huésped.

Se describe además un método para tratar el cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto con cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con la invención, el ácido nucleico de acuerdo con la invención, el casete o vector de expresión de acuerdo con la invención, o la célula huésped de acuerdo con la invención.

45 Además, se describen kits o dispositivos que comprenden el anticuerpo de acuerdo con la invención, y los métodos asociados que son útiles en el diagnóstico, detección o monitorización de trastornos asociados con MUC1, tal como el cáncer.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

5 Como se utiliza en el presente documento, las siguientes expresiones en general tienen preferiblemente los significados que se establecen a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario.

10 La expresión “comprende”, como se utiliza en el presente documento, además de su significado literal también incluye y se refiere específicamente a las expresiones “consiste esencialmente en” y “consiste en”. Por lo tanto, la expresión “comprende” se refiere a realizaciones en las que la materia objeto que “comprende” elementos enumerados específicamente no comprende elementos adicionales, así como las realizaciones en las que el objeto que “comprende” elementos enumerados específicamente puede y/o de hecho abarca elementos adicionales. Asimismo, la expresión “tener” se debe entender como la expresión “comprender”, que incluye también y se refiere específicamente a las expresiones “consistir esencialmente en” y “consistir en”. El término “consistir esencialmente en”, cuando sea posible, en particular se refiere a realizaciones en las que la materia objeto comprende 20 % o menos, 15 en particular 15 % o menos, 10 % o menos o especialmente 5 % o menos de elementos adicionales además de los elementos específicamente enumerados en los cuales consiste esencialmente la materia objeto.

El término “anticuerpo” en particular se refiere a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de la cadena pesada (V_H) y una región constante de la cadena pesada (C_H). Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (V_L) y una región constante de la cadena ligera (C_L). La región constante de la cadena pesada comprende tres o, en el caso de anticuerpos de tipo IgM o IgE, cuatro dominios constantes de cadena pesada (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}) en el que el primer dominio constante C_{H1} es adyacente a la región variable y puede estar conectado al segundo dominio constante C_{H2} por una región bisagra. La región constante de la cadena ligera consiste solo en un dominio constante. Las regiones variables se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR), en las que cada región variable comprende tres CDR y cuatro FR. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de cadena pesada pueden ser de cualquier tipo, tal como cadenas pesadas de tipo γ , δ , α , μ o ϵ . Preferiblemente, la cadena pesada del anticuerpo es una cadena γ . Además, la región constante de la cadena ligera también puede ser de cualquier tipo, tal como cadenas ligeras de tipo κ o λ . Preferiblemente, la cadena ligera del anticuerpo es una cadena κ . Los términos “cadena pesada de tipo γ - (δ -, α -, μ - o ϵ -)” y “cadena ligera de tipo κ - (λ -)” se refieren a cadenas pesadas de anticuerpos o cadenas ligeras de anticuerpos, respectivamente, que tienen secuencias de aminoácidos de región constante derivadas de secuencias de aminoácidos de regiones constantes de cadena ligera o pesada de origen natural, especialmente secuencias de aminoácidos de regiones constantes de cadenas ligeras o pesadas humanas. En particular, la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de una cadena pesada de tipo γ (especialmente de tipo $\gamma 1$) es al menos un 95 %, especialmente al menos un 98 %, idéntica a la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de una cadena pesada γ de anticuerpo humana (especialmente $\gamma 1$ humana). Además, la secuencia de aminoácidos del dominio constante de una cadena ligera de tipo κ es en particular al menos un 95 %, especialmente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo κ humano. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humanizado, humano o quimérico.

La porción de unión a antígeno de un anticuerpo usualmente se refiere a la longitud completa o uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab, cada uno de los cuales se une al mismo antígeno, ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb, que consiste en un dominio V_H .

La “parte Fab” de un anticuerpo en particular se refiere a una parte del anticuerpo que comprende las regiones variables de la cadena ligera y pesada (V_H y V_L) y los primeros dominios de las regiones constantes de cadena ligera y pesada (C_{H1} y C_L). En los casos en donde el anticuerpo no comprende todas estas regiones, el término “parte Fab” solo se refiere a las de las regiones V_H , V_L , C_{H1} y C_L que están presentes en el anticuerpo. Preferiblemente, “parte Fab” se refiere a la parte de un anticuerpo que corresponde al fragmento obtenido al digerir un anticuerpo natural con papaína que contiene la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. En particular, la parte Fab de un anticuerpo abarca el sitio de unión al antígeno o la capacidad de unión al antígeno del mismo. Preferiblemente, la parte Fab comprende al menos la región V_H del anticuerpo.

La "parte Fc" de un anticuerpo en particular se refiere a una parte del anticuerpo que comprende las regiones constantes de cadena pesada 2, 3 y, cuando corresponda, 4 (C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}). En particular, la parte Fc comprende dos de cada una de estas regiones. En los casos en donde el anticuerpo no comprende todas estas regiones, el término "parte Fc" solo se refiere a aquellas de las regiones C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} que están presentes en el anticuerpo. Preferiblemente, la parte Fc comprende al menos la región C_{H2} del anticuerpo. Preferiblemente, "parte Fc" se refiere a la parte de un anticuerpo que corresponde al fragmento obtenido al digerir un anticuerpo natural con papaína que no contiene la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. En particular, la parte Fc de un anticuerpo es capaz de unirse al receptor Fc y, por tanto, por ejemplo, comprende un sitio de unión al receptor Fc o una capacidad de unión al receptor Fc.

Los términos "anticuerpo" y "construcción de anticuerpo", como se utilizan en el presente documento, se refieren en ciertas realizaciones a una población de anticuerpos o construcciones de anticuerpos, respectivamente, del mismo tipo. En particular, todos los anticuerpos o construcciones de anticuerpos de la población exhiben las características utilizadas para definir el anticuerpo o la construcción de anticuerpos. En ciertas realizaciones, todos los anticuerpos o construcciones de anticuerpos en la población tienen la misma secuencia de aminoácidos. La referencia a un tipo específico de anticuerpo, como tales un anticuerpo capaz de unirse específicamente a MUC1, se refiere en particular a una población de este tipo de anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, también incluye fragmentos y derivados de dicho anticuerpo. Un "fragmento o derivado" de un anticuerpo en particular es una proteína o glicoproteína que se deriva de dicho anticuerpo y es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular al mismo epítipo que el anticuerpo. Por lo tanto, un fragmento o derivado de un anticuerpo en el presente documento generalmente se refiere a un fragmento o derivado funcional. En realizaciones particularmente preferidas, el fragmento o derivado de un anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa o derivados del mismo. Los ejemplos de fragmentos de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada cadena pesada y ligera; (ii) fragmentos $F(ab)_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que consisten en la región variable de la cadena pesada y cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptidos; (vi) fragmentos $(Fv)_2$ que consisten en dos fragmentos Fv unidos covalentemente; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera ligadas covalentemente de tal manera que la asociación de las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera solo puede ocurrir intermolecular pero no intramolecular. Los derivados de un anticuerpo en particular incluyen anticuerpos que se unen o compiten con el mismo antígeno que el anticuerpo original, pero que tienen una secuencia de aminoácidos diferente a la del anticuerpo original del que se deriva. Estos fragmentos de anticuerpos y derivados se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Una secuencia de aminoácidos diana se "deriva" de o "corresponde" a una secuencia de aminoácidos de referencia si la secuencia de aminoácidos diana comparte una homología o identidad en toda su longitud con una parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de referencia de al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 93 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. La "parte correspondiente" significa que, por ejemplo, la región marco 1 de una región variable de la cadena pesada (FRH1) de un anticuerpo diana corresponde a la región marco 1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de referencia. En realizaciones particulares, una secuencia de aminoácidos diana que se "deriva" de o "corresponde" a una secuencia de aminoácidos de referencia es 100 % homóloga, o en particular 100 % idéntica, en toda su longitud con una parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de referencia. Una "homología" o "identidad" de una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos se determina preferiblemente de acuerdo con la invención en toda la longitud de la secuencia de referencia o en toda la longitud de la parte correspondiente de la secuencia de referencia que corresponde a la secuencia que se define en la homología o identidad. Un anticuerpo derivado de un anticuerpo original que se define por una o más secuencias de aminoácidos, tales como secuencias de CDR específicas o secuencias de regiones variables específicas, en particular es un anticuerpo que tiene secuencias de aminoácidos, tales como secuencias de CDR o secuencias de regiones variables, que son al menos el 75 %, preferiblemente al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 93 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % homólogas o idénticas, especialmente idénticas a las respectivas secuencias de aminoácidos del anticuerpo original. En ciertas realizaciones, el anticuerpo derivado de (es decir, derivado de) un anticuerpo original comprende las mismas secuencias de CDR que el anticuerpo original, pero difiere en las secuencias restantes de las regiones variables.

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, también se refiere a anticuerpos multivalentes y multiespecíficos, es decir, construcciones de anticuerpos que tienen más de dos sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítipo y construcciones de anticuerpos que tienen uno o más sitios de unión que se unen a un primer epítipo y uno o más sitios de unión que se unen a un segundo epítipo y, opcionalmente, incluso sitios de unión adicionales que se unen a epítipos adicionales.

“Unión específica” preferiblemente significa que un agente tal como un anticuerpo se une más fuerte a una diana tal como un epítipo para el que es específico en comparación con la unión a otra diana. Un agente se une más fuerte a un primer objetivo en comparación con un segundo objetivo si se une al primer objetivo con una constante de disociación (K_d) que es menor que la constante de disociación para la segunda diana. Preferiblemente, la constante de disociación para la diana a la que se une específicamente el agente es más de 100, 200, 500 o más de 1000 veces menor que la constante de disociación para la diana a la que el agente no se une específicamente. Además, el término “unión específica” en particular indica una afinidad de unión entre los socios de unión con una constante de afinidad K_a de al menos 10^6 M^{-1} , preferiblemente al menos 10^7 M^{-1} , más preferiblemente al menos 10^8 M^{-1} . Un anticuerpo específico para un cierto antígeno en particular se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a dicho antígeno con una afinidad que tiene una K_a de al menos 10^6 M^{-1} , preferiblemente al menos 10^7 M^{-1} , más preferiblemente al menos 10^8 M^{-1} . Por ejemplo, el término “anticuerpo anti-MUC1” en particular se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a MUC1 y preferiblemente es capaz de unirse a MUC1 con una afinidad que tiene una K_a de al menos 10^6 M^{-1} , preferiblemente al menos 10^7 M^{-1} , más preferiblemente al menos 10^8 M^{-1} .

El término “MUC1” se refiere a la proteína MUC1, también conocida como mucina-1, mucina epitelial polimórfica (PEM) o antígeno de cáncer 15-3, en particular a la MUC1 humana (número de acceso P15941). MUC1 es un miembro de la familia de las mucinas y codifica una fosfoproteína glicosilada unida a la membrana. MUC1 tiene una masa de proteína de núcleo de 120-225 kDa que aumenta a 250-500 kDa con glicosilación. Se extiende 200-500 nm más allá de la superficie de la célula. La proteína está anclada a la superficie apical de muchas células epiteliales por un dominio transmembrana. El dominio extracelular incluye un dominio de repetición en tándem de número variable (VNTR) de 20 aminoácidos, con un número de repeticiones que varía desde 20 hasta 120 en diferentes individuos. Estas repeticiones son ricas en residuos de serina, treonina y prolina, lo que permite una fuerte O-glicosilación. En ciertas realizaciones, el término “MUC1” se refiere a MUC1 asociado a tumor (“TA-MUC1”). TA-MUC1 es MUC1 presente en las células cancerosas. Este MUC1 difiere del MUC1 presente en células no cancerosas en su nivel de expresión mucho mayor, su localización y su glicosilación. En particular, TA-MUC1 está presente de forma apolar en toda la superficie celular en las células cancerosas, mientras que en las células no cancerosas, MUC1 tiene una expresión estrictamente apical y, por lo tanto, no es accesible para los anticuerpos administrados sistémicamente. Además, TA-MUC1 tiene una O-glicosilación aberrante que expone nuevos epítopos de péptido en la estructura principal de la proteína MUC1 y nuevos antígenos tumorales de carbohidratos tales como el antígeno alfa de Thomsen-Friedenreich (TF α).

“TF α ”, también llamado antígeno alfa de Thomsen-Friedenreich o Core-1, se refiere al disacárido Gal- β 1,3-GalNAc que está ligado O-glicosídicamente en una configuración alfa-anomérica a los hidroxiaminoácidos serina o treonina de las proteínas en células de carcinoma

El término “ácido siálico” en particular se refiere a cualesquier derivados sustituido en N o en O del ácido neuramínico. Se puede referir tanto al ácido 5-N-acetilneuramínico como al ácido 5-N-glicolilneuramínico, pero preferiblemente solo se refiere al ácido 5-N-acetilneuramínico. El ácido siálico, en particular el ácido 5-N-acetilneuramínico, se adhiere preferiblemente a una cadena de carbohidratos a través de un ligamiento 2,3 o 2,6. Preferiblemente, en los anticuerpos descritos en el presente documento están presentes tanto los ácidos siálicos acoplados en 2,3 como los acoplados en 2,6.

Una “cantidad relativa de glicanos” de acuerdo con la invención se refiere a un porcentaje o rango de porcentaje específico de los glicanos adherida a los anticuerpos de una preparación de anticuerpos o en una composición que comprende anticuerpos, respectivamente. En particular, la cantidad relativa de glicanos se refiere a un porcentaje o rango de porcentaje específico de todos los glicanos comprendidos en los anticuerpos y, por lo tanto, adheridos a las cadenas de polipéptidos de los anticuerpos en una preparación de anticuerpos o en una composición que comprende anticuerpos. 100 % de los glicanos se refiere a todos los glicanos adheridos a los anticuerpos de la preparación de anticuerpos o en una composición que comprende anticuerpos, respectivamente. Por ejemplo, una cantidad relativa de glicanos que llevan GlcNAc de bisección del 10 % se refiere a una composición que comprende anticuerpos en los que el 10 % de todos los glicanos comprendidos en los anticuerpos y, por tanto, adheridos a las cadenas de polipéptidos del anticuerpo en dicha composición comprenden un residuo de GlcNAc de bisección mientras que el 90 % de todos los glicanos comprendidos en los anticuerpos y, por lo tanto, adheridos a las cadenas de polipéptidos del anticuerpo en dicha composición no comprenden un residuo de GlcNAc de bisección. La cantidad de referencia correspondiente de glicanos que representa el 100 % puede ser todas las estructuras de glicanos adheridas a los anticuerpos en la composición, o todos los N-glicanos, es decir, todas las estructuras de glicanos adheridas a un residuo de asparagina de los anticuerpos en la composición, o todas las glicanos de tipo complejo. El grupo de referencia de estructuras de glicano generalmente se indica explícitamente o se puede derivar directamente de las circunstancias por parte del experto.

El término “N-glicosilación” se refiere a todos los glicanos adheridos a residuos de asparagina de la cadena de polipéptidos de una proteína. Estos residuos de asparagina generalmente son parte de los sitios de N-glicosilación que tienen la secuencia de aminoácidos Asn-Xaa-Ser/Thr, en la que Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Asimismo, los “N-glicanos” son glicanos adheridos a residuos de asparagina de una cadena de polipéptidos. Los términos “glicano”, “estructura de glicano”, “carbohidrato”, “cadena de carbohidratos” y “estructura de carbohidratos” se utilizan generalmente como sinónimos en el presente documento. Los N-glicanos generalmente tienen una estructura de núcleo común que consiste en dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y tres residuos

de manosa, que tienen la estructura $\text{Man}\alpha 1,6\text{-(Man}\alpha 1,3\text{)-Man}\beta 1,4\text{-GlcNAc}\beta 1,4\text{-GlcNAc}\beta 1\text{-Asn}$ donde Asn es el residuo asparagina de la cadena de polipéptidos. Los N-glicanos se subdividen en tres tipos diferentes, a saber, glicanos de tipo complejo, glicanos de tipo híbrido y glicanos de tipo alto en manosa.

5 Los números dados en el presente documento, en particular las cantidades relativas de una propiedad de glicosilación específica, se deben entender preferiblemente como números aproximados. En particular, los números pueden ser preferiblemente hasta un 10 % más alto y/o más bajo, en particular hasta un 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % más altos y/o bajos.

10 En un “conjugado” se ligan juntos dos o más compuestos. En ciertas realizaciones, al menos algunas de las propiedades de cada compuesto se conservan en el conjugado. El ligamiento se puede lograr mediante un enlace covalente o no covalente. Preferiblemente, los compuestos del conjugado se ligan a través de un enlace covalente. Los diferentes compuestos de un conjugado se pueden unir directamente entre sí a través de uno o más enlaces covalentes entre los átomos de los compuestos. Alternativamente, los compuestos se pueden unir entre sí a través de una fracción química tal como una molécula ligadora en la que el ligador está adherido covalentemente a los átomos de los compuestos. Si el conjugado está compuesto por más de dos compuestos, entonces estos compuestos pueden, por ejemplo, estar ligados en una conformación de cadena, un compuesto adherido al siguiente compuesto, o varios compuestos, cada uno de los cuales puede estar adherido a un compuesto central.

15 El término “ácido nucleico” incluye ácidos nucleicos y ácidos ribonucleicos de hebra sencilla y de hebra doble, así como ácidos desoxirribonucleicos. Puede comprender nucleótidos de origen natural así como sintéticos y se puede modificar de forma natural o sintética, por ejemplo mediante metilación, capuchón 5' y/o 3'.

20 El término “casete de expresión” en particular se refiere a una construcción de ácido nucleico que es capaz de permitir y regular la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos codificante introducida en el mismo. Un casete de expresión puede comprender promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. La estructura exacta del casete de expresión puede variar en función de la especie o el tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas que están involucradas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, como caja TATA, secuencia de capuchón, secuencia CAAT y similares. Más específicamente, las secuencias de control de expresión no transcritas en 5' comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico operativamente conectado. Los casetes de expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en dirección 5'.

30 De acuerdo con la invención, el término “promotor” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se ubica en dirección 5' (5') de la secuencia de ácidos nucleicos que se va a expresar y controla la expresión de la secuencia al proporcionar un sitio de unión y reconocimiento para las polimerasas de ARN. El “promotor” puede incluir sitios de unión y reconocimiento adicionales para factores adicionales que están implicados en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procariótico o eucariótico. Además, un promotor puede ser “inducible”, es decir, iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor, o puede ser “constitutivo” si la transcripción no está controlada por un agente inductor. Un gen que está bajo el control de un promotor inducible no se expresa o solo se expresa en pequeña medida si no hay un agente inductor. En presencia del agente inductor, el gen se activa o aumenta el nivel de transcripción. Esto está mediado, en general, por la unión de un factor de transcripción específico.

35 El término “vector” se utiliza en el presente documento en su sentido más general y comprende cualquier vehículo intermediario de un ácido nucleico que permita, por ejemplo, introducir dicho ácido nucleico en células procariotas y/o eucariotas y, en su caso, integrarlo en un genoma. Los vectores de este tipo preferiblemente se replican y/o expresan en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales. El término “plásmido”, como se utiliza en el presente documento, generalmente se refiere a una construcción de material genético extracromosómico, usualmente un dúplex de ADN circular, que se puede replicar independientemente del ADN cromosómico.

40 De acuerdo con la invención, el término “célula huésped” se refiere a cualquier célula que se pueda transformar o transfectar con un ácido nucleico exógeno. El término “células huésped” comprende de acuerdo con la invención células procariotas (por ejemplo E. coli) o eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, en particular células humanas, células de levadura y células de insecto). Se da preferencia particular a células de mamíferos tales como células de humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras o primates. Las células pueden derivar de una multiplicidad de tipos de tejido y comprenden células primarias y estirpes celulares. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula huésped en forma de una única copia o de dos o más copias y, en una realización, se expresa en la célula huésped.

45 El término “paciente” significa de acuerdo con la invención un ser humano, un primate no humano u otro animal, en particular un mamífero tal como una vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o un roedor tal como un ratón y una rata. En una realización particularmente preferida, el paciente es un ser humano.

El término “cáncer” de acuerdo con la invención comprende en particular leucemias, seminomas, melanomas, carcinomas, teratomas, linfomas, sarcomas, mesoteliomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer de recto, cáncer de

5 endometrio, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer de la sangre, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglio linfático, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y las metástasis de los mismos. El término cáncer de acuerdo con la invención también comprende metástasis de cáncer.

Por "tumor" se entiende un grupo de células o tejido que se forma por una proliferación celular mal regulada. Los tumores pueden mostrar una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal y, usualmente, forman una masa distinta de tejido, que puede ser benigna o maligna.

10 Por "metástasis" se entiende la propagación de células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y normalmente implica el desprendimiento de células cancerosas de un tumor primario, que ingresan a la circulación corporal y se asientan para crecer dentro de los tejidos normales en otras partes del cuerpo. Cuando las células tumorales hacen metástasis, el nuevo tumor se denomina tumor secundario o metastásico, y sus células normalmente se parecen a aquellas del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que, si el cáncer de mama hace metástasis a los pulmones, el tumor secundario está elaborado por células mamarias anormales, no por células pulmonares anormales. El tumor en el pulmón entonces se llama cáncer de mama metastásico, no cáncer de pulmón.

El término "composición farmacéutica" se refiere particularmente a una composición adecuada para administrar a un humano o a un animal, es decir, una composición que contiene componentes que son farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, una composición farmacéutica comprende un compuesto activo o una sal o profármaco junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéutico tal como un tampón, un conservante y un modificador de la tonicidad.

Los rangos numéricos descritos en el presente documento incluyen los números que definen el rango. Los encabezados proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los varios aspectos o realizaciones de esta invención que se pueden leer con referencia a la especificación en su conjunto. De acuerdo con una realización, la materia objeto descrita en el presente documento que comprende ciertas etapas en el caso de métodos o que comprende ciertos ingredientes en el caso de composiciones se refiere a la materia objeto que consiste en las respectivas etapas o ingredientes. Se prefiere seleccionar y combinar aspectos y realizaciones preferidas descritas en el presente documento y la materia objeto especifica que surge de una combinación respectiva de realizaciones preferidas también pertenece a la presente divulgación.

30 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de una variante del anticuerpo anti-MUC1 humanizado PankoMab en el que se suprime el sitio de glicosilación en la CDR-H2. La supresión del sitio de glicosilación se consiguió al sustituir el aminoácido Asn (asparagina) 57 de la región variable de la cadena pesada por otro aminoácido, especialmente Gln (glutamina). Asn 57 es el residuo de aminoácido aceptor del sitio de glicosilación al que se adhiere la estructura de carbohidrato. La sustitución de este residuo de asparagina por otro residuo suprime la glicosilación porque la estructura del carbohidrato solo se puede transferir a un residuo de asparagina mediante las enzimas de la célula huésped. Sorprendentemente, se encontró que la supresión del sitio de glicosilación en la CDR-H2 de PankoMab aumentaba la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo.

En vista de estos hallazgos, la presente invención proporciona un anticuerpo capaz de unirse a MUC1, que comprende

40 (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y

(ii) una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Unión a MUC1

El anticuerpo se une específicamente a un epítipo de MUC1. "Unión específica" significa unión que no es una adsorción no específica. Los ejemplos de criterios para la determinación de si la unión es específica o no puede incluir una constante de disociación (en adelante denominada como " K_D "). El epítipo está en las repeticiones extracelulares en tándem de MUC1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une a MUC1 de manera dependiente de la glicosilación. En particular, el anticuerpo se une más fuerte si dichas repeticiones en tándem están glicosiladas en un residuo de treonina con N-acetil galactosamina (Tn), sialil α 2-6 N-acetil galactosamina (sTn), galactosa β 1-3 N-acetil galactosamina (TF) o galactosa β 1-3 (sialil α 2-6) N-acetil galactosamina (sTF), preferiblemente con Tn o TF. Preferiblemente, la fracción de carbohidrato está unida al residuo de treonina mediante un enlace α -O-glicosídico. El epítipo en el dominio de repetición en tándem de MUC1 en particular comprende la secuencia de aminoácidos PDTR (SEQ ID NO: 13) o PESR (SEQ ID NO: 14). La unión a este epítipo depende preferiblemente de la glicosilación, como

se describió anteriormente, en la que en particular la unión aumenta si la fracción de carbohidrato descrita anteriormente se adhiere al residuo de treonina de la secuencia PDTR o PESR (SEQ ID NO: 13 y 14), respectivamente.

El epítipo es un epítipo MUC1 asociado a tumor (TA-MUC1). Un epítipo TA-MUC1 en particular se refiere a un epítipo de MUC1 que está presente en las células tumorales pero no en las células normales y/o al que solo pueden acceder los anticuerpos en la circulación del huésped cuando está presente en las células tumorales pero no cuando está presente en las células normales. En ciertas realizaciones, la unión del anticuerpo a las células que expresan el epítipo TA-MUC1 es más fuerte que la unión a las células que expresan MUC1 normal, no tumoral. Preferiblemente, dicha unión es al menos 1.5 veces más fuerte, preferiblemente al menos 2 veces más fuerte, al menos 5 veces más fuerte, al menos 10 veces más fuerte o al menos 100 veces más fuerte. Para la unión de TA-MUC1, el anticuerpo preferiblemente se une específicamente al epítipo tumoral MUC1 glicosilado de tal manera que la fuerza del enlace aumente al menos en un factor 2, preferiblemente un factor 4 o un factor 10, lo más preferiblemente un factor 20 en comparación con el enlace al péptido no glicosilado de longitud idéntica y secuencia de péptidos idéntica. Dicha unión se puede ensayar o determinar mediante ELISA, RIA, análisis de resonancia de plasmón de superficie (en adelante, denominado como "SPR"), o similares. Los ejemplos de equipos utilizados en el análisis de SPR pueden incluir BIAcore(TM) (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Crop.), ProteOn(TM) (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.), DRX2 Biosensor (fabricado por Dynamic Biosensors GmbH), SPR-Navi(TM) (fabricado por BioNavis Oy Ltd.), Spreeta(TM) (fabricado por Texas Instruments Inc.), SPRi-PlexII(TM) (fabricado por Horiba, Ltd.) y Autolab SPR(TM) (fabricado por Metrohm). La unión del anticuerpo al antígeno expresado sobre la superficie celular se puede ensayar mediante citometría de flujo o similar.

Además, el anticuerpo puede exhibir propiedades de unión a antígeno similares a las de un anticuerpo de referencia que comprende una región variable de la cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 10 y una región variable de la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. Preferiblemente, el anticuerpo de referencia es el anticuerpo humanizado PankoMab. En particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención se une específicamente al mismo antígeno que el anticuerpo de referencia, y preferiblemente se une a dicho antígeno con mayor afinidad. Es decir, el anticuerpo preferiblemente se une al antígeno con una afinidad que tiene una constante de disociación que es inferior a la del anticuerpo de referencia, más preferiblemente al menos un 10 % inferior, al menos un 20 % inferior, al menos un 30 % inferior o al menos un 50 % inferior. % más bajo. Además, el anticuerpo preferiblemente muestra especificidad cruzada con el anticuerpo de referencia que comprende una región variable de la cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una región variable de la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En particular, el anticuerpo humanizado puede bloquear la unión del anticuerpo de referencia a MUC1 si está presente en una concentración lo suficientemente alta. Esto es posible si se dificulta la unión del anticuerpo de referencia a MUC1 cuando el anticuerpo de acuerdo con la invención ya está unido al antígeno MUC1.

El anticuerpo anti-MUC1

Un anticuerpo capaz de unirse a MUC1 de la presente invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y la CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En las realizaciones específicas, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. Especialmente, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, en particular al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En estas realizaciones, la región variable de la cadena pesada comprende la CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y la CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, cualesquier desviaciones de secuencia a la SEQ ID NO: 10 se ubican en las regiones marco, pero no en las CDR. En particular, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

En ciertas realizaciones, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. Especialmente, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, en particular al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En estas realizaciones, la región variable de la cadena ligera aún comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo tanto, cualesquier desviaciones de secuencia a la SEQ ID NO: 12 se ubican en las regiones marco, pero no en las CDR. En particular, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

En las realizaciones específicas, la región variable de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 3, y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En particular, la región variable de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 3, y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

En las realizaciones específicas, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 20 a 136 de la SEQ ID NO: 20. Especialmente, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, en particular al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 20 a 136 de la SEQ ID NO: 20. En estas realizaciones, la región variable de la cadena pesada comprende la CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y la CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, cualesquier desviaciones de secuencia a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 20 a 136 de la SEQ ID NO: 20 se ubican en las regiones marco, pero no en las CDR. En particular, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 20 a 136 de la SEQ ID NO: 20, en la que el aminoácido en la posición 76 de la SEQ ID NO: 20 es glutamina. En particular, la CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y/o la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 20 a 136 de la SEQ ID NO: 23.

En las realizaciones específicas, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 21 a 133 de la SEQ ID NO: 21. Especialmente, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, en particular al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 21 a 133 de la SEQ ID NO: 21. En estas realizaciones, la región variable de la cadena ligera aún comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo tanto, cualesquier desviaciones de secuencia a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 21 a 133 de la SEQ ID NO: 21 se ubican en las regiones marco, pero no en las CDR. En particular, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 21 a 133 de la SEQ ID NO: 21.

En las realizaciones específicas, la región variable de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 20 a 136 de la SEQ ID NO: 20, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 3, y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 21 a 133 de la SEQ ID NO: 21, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En particular, la región variable de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 20 a 136 de la SEQ ID NO: 20, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 3, y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 21 a 133 de la SEQ ID NO: 21, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

En las realizaciones específicas, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. Especialmente, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, en particular al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En estas realizaciones, la cadena pesada comprende la CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y la CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, cualesquier desviaciones de secuencia a la SEQ ID NO: 15 se ubican en las regiones marco, pero no en las CDR. En particular, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, en la que el aminoácido en la posición 57 de la SEQ ID NO: 15 es glutamina. En particular, la CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y/o la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 20 a 136 de la SEQ ID NO: 22.

En las realizaciones específicas, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. Especialmente, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, en particular al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos

de la SEQ ID NO: 16. En estas realizaciones, la cadena ligera aún comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo tanto, cualesquier desviaciones de secuencia a la SEQ ID NO: 16 se ubican en las regiones marco, pero no en las CDR. En particular, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

- 5 En las realizaciones específicas, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 3, y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En particular, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 3, y la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

- 15 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluye y abarca formas modificadas del mismo. La forma modificada del anticuerpo de la presente invención significa un anticuerpo de la presente invención proporcionado con modificación química o biológica. La forma modificada químicamente incluye formas en las que el esqueleto de aminoácidos está conjugado con una fracción química, formas que tienen una cadena carbohidrato ligada a N o ligada a O químicamente modificada, y similares. Dicha fracción química o forma puede ser tóxica o citotóxica. Las formas biológicamente modificadas incluyen formas que han experimentado modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glicosilación ligada a N o ligada a O, procesamiento de terminal N o de terminal C, desamidación, isomerización de ácido aspártico u oxidación de metionina), formas que contienen un residuo de metionina agregado al terminal N mediante expresión utilizando células huésped procarióticas y similares. Dicha forma modificada también pretende incluir una forma marcada para permitir la detección o el aislamiento del anticuerpo de la presente invención o antígeno del mismo, por ejemplo, formas marcadas con enzima, formas marcadas con fluorescencia y formas marcadas con afinidad. Dicha forma modificada del anticuerpo de la presente invención es útil en la mejora de la estabilidad o la retención de sangre del anticuerpo original de la presente invención, la reducción de la antigenicidad, detección o aislamiento del anticuerpo o el antígeno, etc.

- 20 En particular, el anticuerpo puede comprender una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en defucosilación, fucosa reducida, glicosilación ligada a N, glicosilación ligada a O, procesamiento de terminal N, procesamiento de terminal C, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, sustituciones de dos residuos de leucina (L) por alanina (A) en la posición 234 y 235 de la cadena pesada (LALA), amidación de un residuo de prolina y supresión o ausencia de uno, dos o tres aminoácidos en el terminal carboxilo. En las realizaciones específicas, el anticuerpo carece de uno, dos o tres aminoácido(s) de terminal carboxilo en una o ambas cadenas pesadas, o carece de un aminoácido de terminal carboxilo y los residuos de prolina de terminal carboxilo están amidados en una o ambas cadenas pesadas.

Dicha modificación se puede realizar en una posición arbitraria o en la posición deseada en el anticuerpo del mismo. Alternativamente, se pueden realizar las mismas o dos o más modificaciones diferentes en una o dos o más posiciones de la misma.

- 40 Por ejemplo, se sabe que los anticuerpos producidos por células de mamífero cultivadas carecen de un residuo de lisina de terminal carboxilo en su cadena pesada (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)). También se sabe que ocasionalmente faltan 2 residuos de aminoácidos de terminal carboxilo (es decir, glicina y lisina) de una cadena pesada y que un residuo de prolina recién ubicado en el terminal carboxilo está amidado (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, dicha falta o modificación en estas secuencias de cadenas pesadas no afecta ni la capacidad del anticuerpo para unirse a su antígeno ni las funciones efectoras (activación del complemento, citotoxicidad dependiente del anticuerpo, etc.) del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una supresión o ausencia de 1 o 2 aminoácidos en el terminal carboxilo de la cadena pesada y tiene un residuo amidado (por ejemplo, un residuo de prolina amidado en el sitio de terminal carboxilo de la cadena pesada). Sin embargo, el anticuerpo no se limita a los tipos descritos anteriormente siempre que el mutante por supresión mantenga la capacidad de unirse al antígeno.

- 50 En ciertas realizaciones, dos cadenas pesadas del anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden estar compuestas por cualquier tipo de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las cadenas pesadas de longitud completa y las cadenas pesadas del mutante por supresión o pueden estar compuestas por la combinación de cualquiera de los dos tipos seleccionados de los mismos. La relación cuantitativa de la(s) cadena(s) pesada(s) variante(s) de supresión depende del tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y de las condiciones de cultivo de las células.

En las realizaciones específicas, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede incluir dos cadenas pesadas, las cuales carecen de un residuo de aminoácido de terminal carboxilo.

En las realizaciones específicas, el anticuerpo comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 1 a 446 de la SEQ ID NO: 22 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos Nos. 1 a 219 de la SEQ ID NO: 16.

5 En ciertas realizaciones, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención compite por la unión a TA-MUC1 con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, o un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12

10 En ciertas realizaciones, el anticuerpo tiene las siguientes propiedades: (a) unirse específicamente a MUC1, y/o (b) tener la actividad de ser internalizado en células que expresan MUC1 a través de la unión a MUC1.

15 En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende al menos una cadena pesada de anticuerpo. Especialmente, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo. Las cadenas pesadas de anticuerpos en particular comprenden un dominio VH, un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En ciertas otras realizaciones, las cadenas pesadas del anticuerpo comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3, pero no comprenden un dominio CH1. En realizaciones adicionales, uno o más dominios constantes de las cadenas pesadas se pueden reemplazar por otros dominios, en particular dominios similares tales como, por ejemplo, albúmina. Las cadenas pesadas del anticuerpo pueden ser de cualquier tipo, que incluyen las cadenas γ , α , ϵ , δ y μ , y preferiblemente son cadenas γ , que incluyen las cadenas $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$, especialmente las cadenas $\gamma 1$. Por lo tanto, el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo de tipo IgG tal como un anticuerpo de tipo IgG1, IgG3 o IgG4, en particular un anticuerpo de tipo IgG1.

20

En particular, el anticuerpo comprende además al menos una cadena ligera de anticuerpo, especialmente dos cadenas ligeras de anticuerpo. Las cadenas ligeras de anticuerpos en particular comprenden un dominio VL y un dominio CL. La cadena ligera del anticuerpo puede ser una cadena κ o una cadena λ y especialmente es una cadena κ .

25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo. En particular, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo de tipo $\gamma 1$, cada una de las cuales comprende un dominio VH, un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y dos cadenas ligeras de anticuerpo de tipo κ , cada una de las cuales comprende un dominio VL y un dominio CL.

30 En realizaciones alternativas, el anticuerpo no comprende una cadena ligera de anticuerpo. En estas realizaciones, la región variable de la cadena ligera se puede fusionar con el terminal N de la región variable de la cadena pesada o se inserta en el terminal C de la región variable de la cadena pesada. Pueden estar presentes ligadores de péptido para conectar la región variable de la cadena ligera con las partes restantes de la cadena pesada.

35 En realizaciones preferidas, el anticuerpo comprende una región Fc. El anticuerpo puede ser especialmente un anticuerpo completo, que comprende dos cadenas pesadas, cada una de las cuales comprende los dominios VH, CH1, la región bisagra, CH2 y CH3, y dos cadenas ligeras, cada una de las cuales comprende los dominios VL y CL. El anticuerpo en particular es capaz de unirse a uno o más receptores Fc γ humanos, especialmente al receptor Fc γ IIIA humano. En realizaciones alternativas, el anticuerpo no se une o no se une significativamente al receptor Fc γ IIIA humano, y especialmente no se une o no se une significativamente a ningún receptor Fc γ humano. En estas realizaciones, el anticuerpo en particular no comprende un sitio de glicosilación en el dominio CH2.

40 En realizaciones alternativas, el anticuerpo no comprende una región Fc. En estas realizaciones, el anticuerpo en particular es un fragmento de región variable de la cadena única (scFv) u otro fragmento de anticuerpo que no comprende una región Fc.

Glicosilación del anticuerpo anti-MUC1

45 El anticuerpo anti-MUC1 puede comprender un dominio CH2 en una o más cadenas pesadas de anticuerpos. Los anticuerpos humanos naturales de tipo IgG comprenden un sitio de N-glicosilación en el dominio CH2. Los dominios CH2 presentes en el anticuerpo pueden comprender o no un sitio de N-glicosilación. En ciertas realizaciones, el anticuerpo no comprende un sitio de glicosilación en el dominio CH2. En particular, el anticuerpo no comprende un residuo de asparagina en la posición de la cadena pesada que corresponde a la posición 297 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT/Eu. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una mutación Ala297 en la cadena pesada. En estas realizaciones, el anticuerpo preferiblemente tiene una capacidad muy reducida o carece por

50 completo de la capacidad para inducir, a través de la unión a los receptores Fc γ , la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). La capacidad fuertemente reducida a este respecto en particular se refiere a una reducción al 10 % o menos, especialmente al 3 % o menos, al 1 % o menos o al 0.1 % o menos de la actividad en comparación con el mismo anticuerpo que comprende un sitio de N-glicosilación en sus dominios CH2 y que tiene un patrón de

55 glicosilación común de mamíferos, tales como aquellos que se pueden obtener mediante la producción en estirpes celulares humanas o en estirpes celulares CHO, por ejemplo, un patrón de glicosilación como se describe en el presente documento. En estas realizaciones, el anticuerpo en particular es un anticuerpo de tipo IgG1.

En realizaciones alternativas, los dominios CH2 presentes en el anticuerpo comprenden un sitio de N-glicosilación. Este sitio de glicosilación en particular está en una posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 297 de la cadena pesada de acuerdo con el sistema de numeración IMGTEu y tiene el motivo de secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr en la que Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. La glicosilación ligada a N en Asn297 se conserva en las IgG de mamíferos, así como en regiones homólogas de otros isotipos de anticuerpos. Debido a los aminoácidos adicionales opcionales que pueden estar presentes en la región variable u otras modificaciones de la secuencia, la posición real de este sitio de glicosilación conservado puede variar en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Preferiblemente, los glicanos adheridos al anticuerpo son estructuras de carbohidratos ligados a N de tipo complejo biantenarico, que comprenden preferiblemente al menos la siguiente estructura:



en la que Asn es el residuo de asparagina de la porción de polipéptido del anticuerpo; GlcNAc es N-acetilglucosamina y Man es manosa. Los residuos de GlcNAc terminales pueden llevar además un residuo de galactosa, que opcionalmente puede llevar un residuo de ácido siálico. Un residuo de GlcNAc adicional (denominado GlcNAc de bisección) se puede unir al Man más cercano al polipéptido. Una fucosa puede estar unida a la GlcNAc unida a la Asn. En estas realizaciones, el anticuerpo en particular es un anticuerpo de tipo IgG1.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo no comprende ácidos N-glicolílicos neuramínicos (NeuGc) o cantidades detectables de NeuGc. Además, el anticuerpo preferiblemente tampoco comprende epítopos de Galili (estructuras Gal α 1,3-Gal) o cantidades detectables del epítipo de Galili. En particular, la cantidad relativa de glicanos que llevan estructuras NeuGc y/o Gal α 1,3-Gal es menor de 0.1 % o incluso menor de 0.02 % de la cantidad total de glicanos adheridos a los dominios CH2 de los anticuerpos en la población de anticuerpos.

En particular, el anticuerpo tiene un patrón de glicosilación humano. Debido a estas propiedades de glicosilación, las estructuras no humanas inmunogénicas extrañas que inducen efectos secundarios están ausentes, lo que significa que se evitan los efectos secundarios no deseados o las desventajas que se sabe que son causadas por ciertas estructuras de azúcar extrañas, tales como los ácidos siálicos no humanos inmunogénicos (NeuGc) o el epítipo Galili (estructuras Gal-Gal), ambos conocidos para sistemas de producción de roedores, u otras estructuras como estructuras inmunogénicas con alto contenido de manosa como se conocen, por ejemplo, los sistemas de levadura.

En las realizaciones específicas, el anticuerpo comprende un patrón de glicosilación que tiene una cantidad detectable de glicanos que llevan un residuo de GlcNAc de bisección. En particular, la cantidad relativa de glicanos que llevan un residuo de GlcNAc de bisección es al menos el 0.5 %, especialmente al menos el 1 % de la cantidad total de glicanos adheridos a los sitios de glicosilación del anticuerpo en una composición. Además, en ciertas realizaciones, el patrón de glicosilación comprende una cantidad relativa de glicanos que llevan al menos un residuo de galactosa de al menos el 25 % de la cantidad total de glicanos adheridos al anticuerpo en una composición. En particular, la cantidad relativa de glicanos que llevan al menos un residuo de galactosa es al menos el 30 %, especialmente al menos el 35 % o al menos el 40 % de la cantidad total de glicanos adheridos al anticuerpo en una composición. En las realizaciones específicas, el patrón de glicosilación comprende una cantidad relativa de glicanos que llevan al menos un residuo de ácido siálico de al menos el 1 % de la cantidad total de glicanos adheridos al anticuerpo en una composición. En particular, la cantidad relativa de glicanos que llevan al menos un residuo de ácido siálico es al menos el 1.5 %, especialmente al menos el 2 % de la cantidad total de glicanos adheridos al anticuerpo en una composición.

El anticuerpo puede tener un patrón de glicosilación que tiene una cantidad alta de fucosa de núcleo o una cantidad baja de fucosa de núcleo. Una cantidad reducida de fucosilación aumenta la capacidad del anticuerpo para inducir ADCC. En ciertas realizaciones, la cantidad relativa de glicanos que llevan un residuo de fucosa de núcleo es del 40 % o menos, especialmente del 30 % o menos o del 20 % o menos de la cantidad total de glicanos adheridos al anticuerpo en una composición. En realizaciones alternativas, la cantidad relativa de glicanos que llevan un residuo de fucosa de núcleo es al menos el 60 %, especialmente al menos el 65 % o al menos el 70 % de la cantidad total de glicanos adheridos al anticuerpo en una composición.

A través de la presencia o ausencia del sitio de glicosilación en el dominio CH2 del anticuerpo anti-MUC1 y la presencia o ausencia de fucosa en las estructuras de glicano en dicho sitio de glicosilación, se puede controlar la capacidad del anticuerpo para inducir ADCC y la fuerza de dicha inducción de ADCC. La actividad de ADCC aumenta mediante la glicosilación de la parte Fc del anticuerpo y, además, al reducir la cantidad de fucosilación en dicha glicosilación. En ciertas aplicaciones, el ajuste fino de la actividad ADCC es importante. Por lo tanto, en ciertas situaciones, el anticuerpo sin un sitio de glicosilación en el dominio CH2, el anticuerpo con un sitio de glicosilación en el dominio CH2 y con una alta cantidad de fucosilación, o el anticuerpo con un sitio de glicosilación en el dominio CH2 y con una baja cantidad de fucosilación pueden ser más ventajosos.

Producción del anticuerpo anti-MUC1

El anticuerpo se produce preferiblemente de forma recombinante en una célula huésped. La célula huésped utilizada para la producción del anticuerpo puede ser cualquier célula huésped que se pueda utilizar para la producción de anticuerpos. Las células huésped adecuadas son, en particular, células huésped eucarióticas, especialmente células

huésped de mamífero. Células huésped de ejemplo incluyen células de levadura tales como estirpes celulares de *Pichia pastoris*, células de insectos tales como estirpes celulares SF9 y SF21, células vegetales, células de aves tales como estirpes celulares de pato EB66, células de roedores tales como estirpes celulares CHO, NS0, SP2/0 y YB2/0, y células humanas tales como estirpes celulares HEK293, PER.C6, CAP, CAP-T, AGE1.HN, Mutz-3 y KG1.

- 5 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se produce de forma recombinante en una estirpe celular de sangre humana, en particular en una estirpe celular de leucemia mieloide humana. Las estirpes celulares humanas preferidas que se pueden utilizar para la producción del anticuerpo, así como los procedimientos de producción adecuados, se describen en el documento WO 2008/028686 A2. En una realización específica, el anticuerpo se obtiene por expresión en una estirpe celular de leucemia mieloide humana seleccionada del grupo que consiste en NM-H9D8, NM-H9D8-E6 y NM-H9D8-E6Q12 y estirpes celulares derivadas de las mismas. Estas estirpes celulares se depositaron bajo los números de acceso DSM ACC2806 (NM-H9D8; depositado el 15 de septiembre de 2006), DSM ACC2807 (NM-H9D8-E6; depositado el 5 de octubre de 2006) y DSM ACC2856 (NM-H9D8-E6Q12; depositado el 8 de agosto de 2007) de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (DE).
 10 Las células NM-H9D8 proporcionan un patrón de glicosilación con un alto grado de sialilación, un alto grado de GlycNAc de bisección, un alto grado de galactosilación y un alto grado de fucosilación. Las células NM-H9D8-E6 y NM-H9D8-E6Q12 proporcionan un patrón de glicosilación similar al de las células NM-H9D8, excepto que el grado de fucosilación es muy bajo. Otras estirpes celulares adecuadas incluyen K562, una estirpe celular de leucemia mieloide humana presente en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC CCL-243), así como las estirpes celulares derivadas de las mencionadas anteriormente.
 15
 20

En realizaciones adicionales, el anticuerpo se produce de forma recombinante en células CHO. Especialmente, el anticuerpo se puede producir de forma recombinante en una estirpe celular CHO dhfr tal como la estirpe celular de ATCC No. CRL-9096.

Conjugados del anticuerpo anti-MUC1

- 25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende uno o más agentes adicionales conjugados con el mismo. El agente adicional puede ser cualquier agente adecuado para la conjugación con el anticuerpo. Si está presente más de un agente adicional en el anticuerpo, estos agentes adicionales pueden ser idénticos o diferentes y, en particular, todos son idénticos. La conjugación del agente adicional con el anticuerpo se puede lograr utilizando cualquier método conocido en la técnica. El agente adicional puede estar adherido covalentemente, en particular por fusión o acoplamiento químico, o no covalentemente al anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente adicional se adhiere covalentemente al anticuerpo, especialmente a través de una fracción ligadora. La fracción ligadora puede ser cualquier entidad química adecuada para adherir el agente adicional al anticuerpo.
 30

- El agente adicional preferiblemente es útil en terapia, diagnóstico, pronóstico, detección y/o monitorización de una enfermedad, en particular cáncer. Por ejemplo, el agente adicional se puede seleccionar del grupo que consiste en radionúclidos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, en particular aquellos de diferente especificidad que el anticuerpo anti-MUC1, por ejemplo, anticuerpos de punto de control que bloquean o activan dianas inmunomoduladoras, enzimas, dominios de interacción, marcas detectables, toxinas, componentes citolíticos, inmunomoduladores, inmunoefectores, antígenos MHC de clase I o clase II y liposomas. Un agente adicional particularmente preferido es un radionúclido o un agente citotóxico capaz de destruir células cancerosas, tal como un agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones preferidas, un agente quimioterapéutico se adhiere al anticuerpo anti-MUC1 formando un conjugado.
 35
 40

- Los ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos que se pueden conjugar como agentes adicionales incluyen agentes alquilantes tales como cisplatino, antimetabolitos, alcaloides y terpenoides de plantas, alcaloides de vinca, podofilotoxina, taxanos tales como taxol, inhibidores de topoisomerasa tales como irinotecán y topotecán, antineoplásicos tales como doxorubicina o inhibidores de microtúbulos tales como auristatínas y maitansina/maitansinoides.
 45

- El agente quimioterapéutico se puede seleccionar en particular de un grupo que consiste en un inhibidor de V-ATPasa, un agente proapoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor de MCL1, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, una maitansina, una maitansinoide, amatoxina, una metionina aminopeptidasa, un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, inhibidores del proteasoma, inhibidores de las reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de quinasa, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de quinesina, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un aglutinante del surco menor de ADN, un inhibidor de DHFR, un inhibidor de la formación de microtúbulos, un estabilizador de microtúbulos, un estabilizador de actina, un inhibidor de topoisomerasa II, un compuesto de platino, un inhibidor de ribosomas, un inhibidor de polimerasa II de ARN y una toxina bacteriana. En las realizaciones específicas, el agente quimioterapéutico adherido al anticuerpo anti-MUC1 se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, un inhibidor de microtúbulos tal como maitansinoide, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN y un aglutinante del surco menor de ADN.
 50
 55

En algunas realizaciones, el agente quimioterápico es una maitansina o un maitansinoide. Los ejemplos específicos de maitansinoides útiles para la conjugación incluyen maitansinol, N²-desacetilo-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1), N²-desacetilo-N²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM3), y N²-desacetilo-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4). En particular, DM1 o DM4 se adhieren al anticuerpo anti-MUC1. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es una auristatina, en particular monometil auristatina F (MMAF), monometil auristatina E (MMAE) o auristatina T. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un aglutinante del surco menor del ADN, en particular pirrolobenzodiazepina (PBD), dímero de pirrolobenzodiazepina (dímero de PBD), duocarmicina, duocarmicina-hidroxibenzamida-azaindol (DUBA), seco-duocarmicina-hidroxibenzamida-azaindol (seco-DUBA) o doxorubicina. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un agente alquilante de ADN, en particular indolinobenzodiazepina u oxazolidinobenzodiazepina. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un agente que daña el ADN, en particular caliqueamicina. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de la formación de microtúbulos, en particular una tubulisina, una ansamitocina, podofilotoxina o vinblastina. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un estabilizador de microtúbulos, en particular paclitaxel o una epotilona. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un estabilizador de actina, en particular una falotoxina. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de la topoisomerasa II, en particular tenipósido, XK469, razoxano, amsacrina, idarubicina o mebarona. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un compuesto de platino, en particular cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, tetranitrato de triplatino, fenantriplatino, picoplatino o satraplatino. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de ribosomas, en particular, ricina, saporina, abrina, toxina diftérica o exotoxina A. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de la polimerasa II de ARN, en particular una amatoxina, tal como, por ejemplo, amanitina. En algunas realizaciones, el agente quimioterápico adherido al anticuerpo anti-MUC1 es una toxina bacteriana, en particular, la toxina del ántrax. Los conjugados de fármacos de anticuerpos adecuados también se describen en los documentos EP 16 151 774.3 y LU 92659, a los que se hace referencia explícita en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el agente adicional es un polipéptido o una proteína. Este polipéptido o proteína puede, en particular, fusionarse con una cadena de polipéptidos del anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente adicional que es un polipéptido o una proteína se fusiona con el terminal C de una cadena ligera de anticuerpo del anticuerpo. En realizaciones en las que el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, se puede fusionar un agente adicional que es un polipéptido o una proteína al terminal C de cada una de las dos cadenas ligeras de anticuerpo. En realizaciones adicionales, el agente adicional que es un polipéptido o una proteína se fusiona con el terminal C de una cadena pesada de anticuerpo del anticuerpo. En realizaciones en las que el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, se puede fusionar un agente adicional que es un polipéptido o una proteína al terminal C de cada una de las dos cadenas pesadas de anticuerpo. Los agentes adicionales pueden ser idénticos o diferentes y en particular tener la misma secuencia de aminoácidos. Los ejemplos adecuados de dichos agentes adicionales que son un polipéptido o una proteína se pueden seleccionar del grupo que consiste en citocinas, quimiocinas, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, enzimas y dominios de interacción.

En ciertas realizaciones, el agente adicional que es un polipéptido o una proteína es un anticuerpo de punto de control que bloquea y/o desencadena señales de activación. Los ejemplos de dianas respectivas incluyen CD40, CD3, CD137 (4-1BB), OX40, GITR, CD27, CD278 (ICOS), CD154 (ligando CD40), CD270 (HVEM) y CD258 (LIGHT) como dianas activadoras, CTLA4, PD1, CD80, CD244, A2AR, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA, IDO, KIR, LAG3, TIM-3, VISTA y fosfatidilserina como dianas inhibitorias, y sus respectivos ligandos tales como PDL1. En ejemplos específicos, el anticuerpo anti-MUC1 comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras como se describe en el presente documento, en las que un fragmento scFv que se une específicamente a CD3 se fusiona con el terminal C de cada cadena pesada; o en el que un fragmento scFv que se une específicamente a PDL1 se fusiona con el terminal C de cada cadena ligera.

En realizaciones adicionales, el agente adicional que es un polipéptido o proteína es un compuesto inmunomodulador tal como una quimiocina, citocina o factor de crecimiento. Las citocinas adecuadas a este respecto incluyen interferones tales como interferón- α , interferón- β e interferón- γ e interleucinas. Los factores de crecimiento adecuados incluyen G-CSF y GM-CSF.

El ácido nucleico, casete de expresión, vector, estirpe celular y composición.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. La secuencia de ácidos nucleicos de dicho ácido nucleico puede tener cualquier secuencia de nucleótidos adecuada para codificar el anticuerpo. Sin embargo, preferiblemente la secuencia de ácidos nucleicos se adapta al menos parcialmente al uso de codones específico de la célula huésped u organismo en el que se va a expresar el ácido nucleico, en particular el uso de codones humanos. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN de doble hebra o de hebra sencilla, preferiblemente ADN de doble hebra tal como el ADNc o ARN de hebra sencilla tal como el ARNm. Puede ser una molécula de ácido nucleico consecutiva o puede estar compuesta por varias moléculas de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica una parte diferente del anticuerpo. En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de la variante PankoMab (PM-N54Q) representada por la SEQ ID NO: 17 y una

secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de la variante PankoMab (PM-N54Q) representada por la SEQ ID NO: 18

Si el anticuerpo está compuesto por más de una cadena de aminoácidos diferente, tal como una cadena ligera y una cadena pesada del anticuerpo, el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, una única molécula de ácido nucleico que contiene varias regiones codificantes, cada una de las cuales codifica una de las cadenas de aminoácidos del anticuerpo, preferiblemente separadas por elementos reguladores tales como elementos IRES para generar cadenas de aminoácidos separadas, o el ácido nucleico puede estar compuesto por varias moléculas de ácido nucleico en las que cada molécula de ácido nucleico comprende una o más regiones codificantes cada una que codifica para una de las cadenas de aminoácidos del anticuerpo. Además de las regiones codificantes que codifican el anticuerpo, el ácido nucleico también puede comprender secuencias de ácido nucleico adicionales u otras modificaciones que, por ejemplo, pueden codificar otras proteínas, pueden influir en la transcripción y/o traducción de la(s) región(es) codificante(s), puede influir en la estabilidad u otras propiedades físicas o químicas del ácido nucleico, o puede no tener ninguna función.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un casete o vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención y un promotor conectado operativamente con dicho ácido nucleico. Además, el casete o vector de expresión puede comprender elementos adicionales, en particular elementos que son capaces de influir y/o regular la transcripción y/o traducción del ácido nucleico, la amplificación y/o reproducción del casete o vector de expresión, la integración del casete o vector de expresión en el genoma de una célula huésped, y/o el número de copias del casete o vector de expresión en una célula huésped. Casetes y vectores de expresión adecuados que comprenden casetes de expresión respectivos para expresar anticuerpos son bien conocidos en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan una descripción adicional en el presente documento.

Además, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención o el casete o vector de expresión de acuerdo con la invención. La célula huésped puede ser cualquier célula huésped. Puede ser una célula aislada o una célula comprendida en un tejido. Preferiblemente, la célula huésped es una célula cultivada, en particular una célula primaria o una célula de una estirpe celular establecida, preferiblemente una célula derivada de un tumor. Preferiblemente, es una célula bacteriana tal como *E. coli*, una célula de levadura tal como una célula de *Saccharomyces*, en particular *S. cerevisias*, una célula de insecto tal como una célula Sf9, o una célula de mamífero, en particular una célula humana tal como una célula humana derivada de un tumor, una célula de hámster tal como CHO, o una célula de primate. En una realización preferida de la invención, la célula huésped se deriva de células de leucemia mieloide humana. Preferiblemente, se selecciona de las siguientes células o estirpes celulares: K562, KG1, MUTZ-3, o una célula o estirpe celular derivada de las mismas, o una mezcla de células o estirpes celulares que comprende al menos una de las células anteriormente. La célula huésped se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12 y una célula o estirpe celular derivada de cualquiera de dichas células huésped. Estas estirpes celulares y sus propiedades se describen en detalle en la Solicitud PCT WO 2008/028686 A2. En realizaciones adicionales, la célula huésped es de una estirpe celular CHO dhfr tal como la estirpe celular de ATCC No. CRL-9096. En realizaciones preferidas, la célula huésped se optimiza para la expresión de glicoproteínas, en particular anticuerpos, que tienen un patrón de glicosilación específico. Preferiblemente, el uso de codones en la región codificante del ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o el promotor y los elementos adicionales del casete o vector de expresión son compatibles y, más preferiblemente, optimizados para el tipo de célula huésped utilizada. Preferiblemente, el anticuerpo es producido por una célula huésped o una estirpe celular como se describió anteriormente.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona un método para producir el anticuerpo en células huésped como se describe en el presente documento. El método en particular comprende las etapas de proporcionar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, cultivar la célula huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y obtener el anticuerpo expresado por la célula huésped. El anticuerpo de acuerdo con la invención se puede obtener u obtenerse mediante dicho método.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo, el ácido nucleico, el casete o vector de expresión, o la célula huésped. La composición también puede contener más de uno de estos componentes. Además, la composición puede comprender uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en solventes, diluyentes y excipientes. Preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica. En esta realización, los componentes de la composición preferiblemente son todos farmacéuticamente aceptables. La composición puede ser una composición sólida o fluida, en particular una solución, emulsión o suspensión, preferiblemente acuosa, o un polvo liofilizado.

Uso en medicina

El anticuerpo en particular es útil en medicina, en particular en terapia, diagnóstico, pronóstico, detección y/o monitorización de una enfermedad, en particular una enfermedad como se describe en el presente documento, preferiblemente cáncer, infecciones, enfermedades inflamatorias, enfermedad de injerto contra huésped e inmunodeficiencias

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona el anticuerpo, el ácido nucleico, el casete o vector de expresión, la célula huésped o la composición para uso en medicina. Preferiblemente, el uso en medicina es un uso en el tratamiento, pronóstico, diagnóstico, detección y/o monitorización de una enfermedad tal como, por ejemplo, enfermedades asociadas con un crecimiento anormal de células tal como el cáncer, infecciones tales como bacterias, virus, hongos o infecciones parasitarias, enfermedades inflamatorias tales como enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias del intestino, y enfermedades asociadas con una actividad inmunológica reducida tales como inmunodeficiencias. En una realización preferida, la enfermedad es cáncer.

Preferiblemente, el cáncer tiene una expresión detectable de MUC1 o TA-MUC1, preferiblemente detectable mediante inmunohistoquímica, ELISA, RIA, ensayo de inmunodetección de punto ligado a enzimas (ELISPOT), transferencia de puntos, prueba de Ouchterlony o contrainmunolectroforesis (CIE) o hibridación in situ. Se incluyen especialmente células que tienen una expresión de MUC1 o TA-MUC1 que es detectable por inmunohistoquímica o hibridación in situ. El cáncer se puede probar en el nivel de MUC1 o TA-MUC1 antes de la administración del anticuerpo anti-MUC1.

La presente invención proporciona además kits y dispositivos que comprenden el anticuerpo de acuerdo con la invención, y métodos asociados que son útiles en el diagnóstico, detección o monitorización de trastornos asociados con MUC1, como el cáncer. En algunas realizaciones, se proporciona un kit de ELISA tipo emparejado para realizar pruebas, detectar o diagnosticar que comprende el anticuerpo de la presente invención. Este kit puede comprender además uno o más de una solución de estándares de proteína MUC1 o TA-MUC1, un reactivo colorante, una solución tampón para dilución, un anticuerpo para fase sólida, un anticuerpo para detección y una solución de lavado, y similares. Preferiblemente, la cantidad de anticuerpo unido al antígeno se puede medir mediante la aplicación de un método tal como un método de absorbancia, fluorescencia, luminiscencia o radioisótopo (RI). Preferiblemente, se utiliza un lector de placas de absorbancia, un lector de placas de fluorescencia, un lector de placas de luminiscencia, un contador de centelleo líquido RI o similar en la medición.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona el anticuerpo de acuerdo con la invención para uso en análisis inmunohistoquímicos (IHC) y una composición que comprende el mismo.

La inmunohistoquímica no está particularmente limitada siempre que este enfoque implique hacer reaccionar una sección de tejido con un anticuerpo que se une al antígeno (anticuerpo primario) y detectar el anticuerpo primario unido con el antígeno.

Con el anticuerpo de acuerdo con la invención se pueden tratar diferentes formas de cánceres, que incluyen las metástasis. El cáncer se puede seleccionar en particular del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama tal como cáncer de mama triple negativo, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides y cáncer urotelial. El cáncer se puede seleccionar además en particular de cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de piel, cáncer de próstata y cáncer de sangre. En ciertas realizaciones, el cáncer es un cáncer metastásico. El cáncer puede incluir cualquier tipo de metástasis, tal como metástasis cutáneas, metástasis de ganglios linfáticos, metástasis pulmonares, metástasis hepáticas, metástasis peritoneales, metástasis pleurales y/o metástasis cerebrales. En ciertas realizaciones, el cáncer tiene un fenotipo inflamatorio. En estas realizaciones, cualquiera de los tipos de cáncer descritos anteriormente puede ser un cáncer inflamatorio.

En ciertas realizaciones, la infección viral es causada por el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del herpes simple, el virus de Epstein Barr, el virus de la influenza, el virus de la coriomeningitis linfocítica, el virus de la hepatitis B o el virus de la hepatitis C. La enfermedad inflamatoria se puede seleccionar de enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, accidente cerebrovascular isquémico, enfermedad de Alzheimer, asma, pénfigo vulgar y dermatitis/eccema. La enfermedad autoinmunitaria se puede seleccionar del grupo que consiste en enfermedad celíaca, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, vitíligo, artritis psoriásica, dermatitis atópica, esclerodermia, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, síndrome de Guillain-Barré, hepatitis autoinmunitaria y espondilitis anquilosante. En ciertas realizaciones, la enfermedad comprende o está asociada con células que expresan MUC1, especialmente TA-MUC1. Por ejemplo, un cáncer que se va a tratar es MUC1 positivo, especialmente TA-MUC1 positivo, es decir, comprende células cancerosas que expresan MUC1, especialmente TA-MUC1.

En las realizaciones específicas, el anticuerpo se utiliza para el tratamiento en combinación con otro agente terapéutico, especialmente para el tratamiento del cáncer en combinación con otro agente contra el cáncer. Dicho agente terapéutico adicional puede ser cualquier agente contra el cáncer conocido. Los agentes terapéuticos contra el cáncer adecuados que se pueden combinar con el anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser agentes quimioterapéuticos, otros anticuerpos, agentes inmunoestimuladores, citocinas, quimiocinas y vacunas. Además, la terapia con el anticuerpo se puede combinar con radioterapia, cirugía y/o medicina tradicional china.

Los agentes contra el cáncer que se pueden utilizar en combinación con el anticuerpo anti-MUC1 se pueden seleccionar de cualquier agente quimioterapéutico, en particular agentes quimioterapéuticos que se sabe que son eficaces para el tratamiento de cánceres positivos para MUC1. El tipo de agente quimioterapéutico también depende del cáncer que se va a tratar. El compañero de combinación se puede seleccionar del grupo que consiste en taxanos tal como paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere) y SB-T-1214; ciclofosfamida; imatinib; pazopanib; capecitabina;

5 citarabina; vinorelbina; gemcitabina; antraciclinas tales como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina y mitoxantrona; inhibidores de la aromatasas tales como aminoglucetimidina, testolactona (Teslac), anastrozol (Arimidex), letrozol (Femara), exemestano (Aromasin), vorozol (Rivizor), formestano (Lentaron), fadrozol (Afema), 4-hidroxiandrostenediona, 1,4,6-androstatrieno-3,17-diona (ATD) y 4-androsteno-3,6,17-triona (6-OXO); inhibidores de topoisomerasa tales como irinotecán, topotecán, camptotecina, lamellarina D, etopósido (VP-16), tenipósido, doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, amsacrina, elipticinas, ácido aurintricarboxílico y HU-331; agentes quimioterapéuticos a base de platino tales como cis-diaminodicloroplatino(II) (cisplatino), cis-diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platino(II) (carboplatino) y [(1R,2R)-ciclohexano-1,2-diamina](etanodioato-O,O')platino(II) (oxaliplatino); inhibidores de PARP tales como olaparib, rucaparib y niraparib; agonistas de TLR tales como imiquimod y resiquimod; y antimetabolitos, en particular antifolatos tales como metotrexato, pemetrexed, raltitrexed y pralatrexato, análogos de pirimidina tales como fluoruracilo, gemcitabina, floxuridina, 5-fluorouracilo y tegafur-uracilo, y análogos de purina, moduladores selectivos del receptor de estrógeno y reguladores a la baja del receptor de estrógeno.

15 Además, también se pueden utilizar anticuerpos terapéuticos como compañero de combinación adicional. Puede ser cualquier anticuerpo que sea útil en la terapia del cáncer que sea diferente del anticuerpo anti-MUC1. En particular, el anticuerpo adicional está aprobado para el tratamiento del cáncer por una administración tal como la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, anteriormente EMEA) y el Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Ejemplos de anticuerpos adicionales que se pueden utilizar para el tratamiento en combinación son anticuerpos anti-EGFR tales como Cetuximab, Tomuzotumumab, Panitumumab, Zalutumumab, Nimotuzumab, Matuzumab y Necitumumab; anticuerpos anti-HER2 tales como Trastuzumab, Timigutuzumab y Pertuzumab; anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab (Avastin); anticuerpos anti-CD52 como alemtuzumab (Campath); anticuerpos anti-CD30 tales como brentuximab (Adcetris); anticuerpos anti-CD33 como gemtuzumab (Mylotarg); y anticuerpos anti-CD20 tales como rituximab (Rituxan, Mabthera), tositumomab (Bexxar) e ibritumomab (Zevalin). Ejemplos de anticuerpos adecuados para la combinación con la terapia del cáncer descrita en el presente documento incluyen anticuerpos contra antígenos seleccionados del grupo que consiste en antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF α , TF β), Tn, Lewis Y, CD44, receptor de folato α , gangliósido NeuGc-GM3, DLL-3, RANKL, PTK7, Notch-3, Ephrin A4, receptor 1 del factor de crecimiento similar a insulina, quinasa 1 similar al receptor de activina, claudina-6, disialogangliósido GD2, endogлина, glicoproteína transmembrana NMB, CD56, transductor de señal de calcio asociado al tumor 2, factor de tejido, ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3, CD70, P-cadherina, mesotelina, antígeno epitelial de transmembrana de la próstata 1 seis (STEAP1), molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5 (CEACAM5), nectina 4, guanilil ciclasa C, miembro 4 de la familia de portadores de solutos 44 (SLC44A4), antígeno de membrana específico a próstata (PSMA), transportador de zinc ZIP6 (LIV1 (ZIP6)), proteína similar a SLIT y NTRK 6 (SLITRK6), glicoproteína trofoblástica (TPBG; 5T4), Fyn3, anhidrasa carbónica 9, NaPi2b, extradominio B de fibronectina, receptor de endotelina ETB, VEGFR2 (CD309), tenascina c, colágeno IV y periostina.

35 El anticuerpo anti-MUC1 se puede combinar además con anticuerpos de punto de control, es decir, anticuerpos que bloquean o activan dianas inmunomoduladoras. De este modo, las señales inhibitoras de una respuesta inmunitaria se pueden bloquear y/o pueden desencadenar señales de activación. Los ejemplos de objetivos respectivos incluyen CD40, CD3, CD137 (4-1BB), OX40, GITR, CD27, CD278 (ICOS), CD154 (ligando CD40), CD270 (HVEM) y CD258 (LIGHT) como objetivos activadores, CTLA4, PD1, CD80, CD244, A2AR, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA, IDO, KIR, LAG3, TIM-3, VISTA y fosfatidilserina tales como dianas inhibitoras, y sus respectivos ligandos tales como PDL1.

40 En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-MUC1 se puede combinar con el tratamiento con compuestos inmunomoduladores tales como quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y vacunas. Las citocinas adecuadas a este respecto incluyen interferones tales como interferón- α , interferón- β e interferón- γ e interleucinas. Los factores de crecimiento adecuados incluyen G-CSF y GM-CSF.

45 El anticuerpo anti-MUC1 se utiliza preferiblemente para el tratamiento de un tumor primario, un tumor recurrente y/o metástasis de dichos tumores, y en particular se utiliza para el tratamiento antes, durante o después de la cirugía y para la prevención o el tratamiento de metástasis. El anticuerpo anti-MUC1 en particular es para el tratamiento de un paciente como terapia adyuvante. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-MUC1 es para el tratamiento de un paciente como terapia neoadyuvante o en una terapia neoadyuvante-adyuvante combinada. Además, el anticuerpo anti-MUC1 es para el tratamiento de un paciente como terapia paliativa.

La terapia del cáncer con el anticuerpo anti-MUC1 preferiblemente da como resultado la inhibición del crecimiento del tumor y en particular la reducción del tamaño del tumor. Además, se previene la ocurrencia de más metástasis y/o se reduce su número mediante el tratamiento. El tratamiento preferiblemente da como resultado un aumento en la supervivencia libre de progresión; y/o un aumento de la esperanza de vida y, por tanto, de la supervivencia global.

55 Además se describen métodos de terapia, diagnóstico, pronóstico, detección y/o monitorización de una enfermedad utilizando el anticuerpo de acuerdo con la invención. Las realizaciones y ejemplos del uso del anticuerpo en medicina también se aplican a los métodos médicos. En particular, se describe un método para tratar una enfermedad en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

Por ejemplo, se describe un método para tratar el cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto con cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con la invención. En las realizaciones específicas, el cáncer se caracteriza al expresar TA-MUC1. El cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de sangre, cáncer endometrial, cáncer de tiroides, leucemia, seminomas, melanomas, carcinomas, teratomas, linfomas, sarcomas, mesoteliomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer rectal, cáncer suprarrenal, cáncer de piel, cáncer del cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer intestinal, cáncer del intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglio linfático, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de útero y las metástasis de los mismos.

Además, se describe un método para diagnosticar, detectar o monitorizar el cáncer, que comprende la etapa de poner en contacto una muestra de prueba con un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Métodos para aumentar la afinidad de unión a MUC1

Se describe además un método para aumentar la afinidad de unión a MUC1 de un anticuerpo que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y la CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y

(ii) una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6,

el método comprende la etapa de sustituir el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 con cualquier residuo de aminoácido excepto asparagina, lo que resulta en CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 va a aumentar en particular es un anticuerpo capaz de unirse a MUC1 como se describe en el presente documento, excepto que comprende una asparagina en la posición 8 de la secuencia de CDR-H2.

En ciertas realizaciones, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 va a aumentar comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. Especialmente, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, en particular al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En estas realizaciones, la región variable de la cadena pesada aún comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 8 y 3. Por lo tanto, cualesquier desviaciones de secuencia a la SEQ ID NO: 11 se ubican en las regiones marco, pero no en las CDR. En particular, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En ciertas realizaciones, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 va a aumentar comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. Especialmente, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, en particular al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En estas realizaciones, la región variable de la cadena ligera aún comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo tanto, cualesquier desviaciones de secuencia a la SEQ ID NO: 12 se ubican en las regiones marco, pero no en las CDR. En particular, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

En las realizaciones específicas, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 se va a aumentar tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 8 y 3, y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En particular, la región variable de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 8 y 3, y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, en la que las CDR aún tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

Por ejemplo, el anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 que se va a aumentar es un anticuerpo anti-MUC1 como se divulga en los documentos WO 2004/065423 A2 o WO 2011/012309 A1. En particular, el anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 se va a aumentar es gatipotuzumab o PankoMab.

5 El anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 se aumenta en particular es un anticuerpo capaz de unirse a MUC1 como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la unión de MUC1 es como se describe en el presente documento. El aumento de la afinidad de unión de MUC1 o TA-MUC1 en particular se refiere a un aumento de al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 33 % o al menos el 50 %. En las realizaciones preferidas, la afinidad de unión a MUC1 aumenta en al menos un 50 %. La afinidad de unión de MUC1 se puede determinar como se describe en los ejemplos, especialmente utilizando análisis de resonancia de plasmón de superficie o Tecnología switchSENSE® (DRX2 Biosensor, fabricado por Dynamic Biosensors GmbH), como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 4a y b.

10 En ciertas realizaciones, la etapa de sustituir el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 se logra al introducir una mutación en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, en la que la mutación se introduce en el codón que codifica dicho residuo de aminoácido. La introducción de la mutación se puede realizar por cualquier método. En la técnica se conocen varios métodos adecuados y el experto en la técnica es capaz de realizar las tareas necesarias para introducir la mutación. El anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1 se puede obtener luego al expresar el ácido nucleico mutado, por ejemplo, en una célula huésped. Los ácidos nucleicos, las células huésped y los métodos para producir el anticuerpo se describen en el presente documento y se pueden utilizar para el método para aumentar la afinidad de unión a MUC1.

15 En las realizaciones específicas, el método para aumentar la afinidad de unión a MUC1 de un anticuerpo comprende las etapas de

- (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 se va a aumentar
- (b) introducir una mutación en dicho ácido nucleico para producir un ácido nucleico mutado, en el que la mutación se introduce en el codón que codifica el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 de tal manera que dicho codón codifica cualquier residuo de aminoácido excepto asparagina; y
- (c) expresar el ácido nucleico mutado para producir un anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1.

La presente invención proporciona además un método para producir un anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1, que comprende

- (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende
 - 30 (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y la CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y
 - (ii) una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;
- (b) introducir una mutación en dicho ácido nucleico para producir un ácido nucleico mutado, en el que la mutación se introduce en el codón que codifica el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 de tal manera que dicho codón codifica glutamina; y
- (c) producir el anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1 al expresar el ácido nucleico mutado en una célula huésped.

Las realizaciones, características y ejemplos descritos en el presente documento para los otros aspectos, especialmente para el método de aumentar la afinidad de unión a MUC1 de un anticuerpo, también se aplican al método para producir un anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1.

45 En ciertas realizaciones, el método para producir un anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1 comprende además una etapa (d) para procesar el anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1.

Por ejemplo, el procesamiento del anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1 puede incluir el aislar el anticuerpo del cultivo celular. El aislamiento del anticuerpo en particular se refiere a la separación del anticuerpo de los componentes restantes del cultivo celular. La separación del anticuerpo del medio de cultivo celular se puede realizar, por ejemplo, mediante métodos cromatográficos. Los métodos y medios adecuados para aislar anticuerpos se conocen en la técnica y aquellos expertos pueden aplicarlos fácilmente.

El anticuerpo obtenido puede estar sujeto opcionalmente a etapas de procesamiento adicionales, como, por ejemplo, etapas de modificación, tales como el acoplamiento químico o enzimático de otro agente al anticuerpo, y/o etapas de formulación para producir el anticuerpo en la calidad y composición deseadas. Dichas etapas y métodos de procesamiento adicionales son generalmente conocidos en la técnica.

- 5 En realizaciones adicionales, la etapa (d) comprende adicionalmente la etapa de proporcionar una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo. Proporcionar una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo o formular el anticuerpo como una composición farmacéutica en particular comprende intercambiar la solución tampón o los componentes de la solución tampón de la composición que comprende el anticuerpo. Además, esta etapa puede incluir la liofilización del anticuerpo. En particular, el anticuerpo se transfiere a una composición que solo comprende ingredientes farmacéuticamente aceptables.

Figuras

- 15 La Figura 1 muestra las curvas de unión de ELISA de los anticuerpos anti-MUC1 a diferentes péptidos MUC1. (A) muestra la unión al antígeno de PankoMab N54Q (PM-N54Q) que carece de glicosilación de Fab y PankoMab que comprende glicosilación de Fab (PM) al péptido MUC1 que comprende la secuencia del epítipo PDTR. La treonina del péptido MUC1 está glicosilada con Tn, sTn, TF o sTF. (B) muestra la unión de PankoMab y PankoMab N54Q al péptido MUC1 que comprende la variante de la secuencia del epítipo PESR. La serina del péptido MUC1 está glicosilada con Tn. (C) muestra la unión de PankoMab N54Q al péptido MUC1 que comprende la secuencia del epítipo PDTR. La treonina del péptido MUC1 está glicosilada con Tn o no glicosilada. (D) muestra la unión de varias variantes de N54X al péptido Tn-PDTR MUC1 en comparación con PankoMab que comprende la glicosilación de Fab diluido del sobrenadante de cultivo celular de células transfectadas transitoriamente. (E) muestra las curvas de unión de tres variantes de N54X purificadas sin glicosilación de Fab en comparación con PankoMab con glicosilación de Fab sobre el péptido Tn-PDTR, TF-PDTR y PDTR MUC1 no glicosilado. (F) muestra la unión de dos variantes marco de PM-N54Q al péptido Tn-PDTR MUC1 en comparación con PankoMab con glicosilación de Fab. Para la variante de estructura mf-a, nueve aminoácidos están mutados en la estructura VH y tres en la estructura VL, para mf-b también están mutados nueve aminoácidos en la estructura VH y cuatro en la estructura VL.

La Figura 2 muestra la unión por resonancia de plasmón de superficie (Biacore) de los anticuerpos anti-MUC1 PM y PM-N54Q a un péptido PDTR-MUC1 Tn-glicosilado. La señal de unión máxima de diferentes concentraciones de PankoMab N54Q y PankoMab se grafica frente a la concentración de anticuerpos.

- 30 La Figura 3 muestra los resultados de la Detección de Proximidad por Fluorescencia sobre el instrumento DRX. Se muestran las curvas de asociación y disociación. (A) PM con glicosilación de Fab en comparación con (B) PM-N54Q sin glicosilación de Fab.

- 35 La Figura 4 muestra un gel de acrilamida SDS de una separación electroforética de PankoMab N54Q y PankoMab bajo condiciones no reductoras (izquierda) y reductoras (derecha). Carril 1: PankoMab N54Q después de la etapa de captura; carril 2: PankoMab N54Q después de la etapa de pulido; carril 3: PankoMab después de la etapa de captura; carril 4: PankoMab después de la etapa de pulido; carril 5: marcador de peso molecular.

La Figura 5 muestra el gel teñido con azul de Coomassie de un ensayo de enfoque isoeléctrico con PankoMab N54Q que carece de glicosilación de Fab y PankoMab glicosilado con Fab. Carril 1: PankoMab con glicosilación de Fab; carril 2: PankoMab N54Q sin glicosilación de Fab.

- 40 La Figura 6 muestra la unión del anticuerpo anti-MUC1 al receptor Fcγ IIIa. Las concentraciones crecientes del anticuerpo PankoMab N54Q o PankoMab desplazan las perlasceptoras acopladas anti-ratón de conejo de las perlas donantes cargadas con FcγRIIIa, lo que reduce la quimioluminiscencia detectada. En la Figura 6A, se aplicaron al ensayo anticuerpos poco fucosilados y en la Figura 6B anticuerpos altamente fucosilados.

La Figura 7 muestra la unión de los anticuerpos anti-MUC1 PM-N54Q, PM-N54D y PM con glicosilación de Fab a las estirpes celulares tumorales (A) CaOV-3 y (B) HSC-4 que se analizan por citometría de flujo.

- 45 La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado PankoMab N54Q (SEQ ID No: 15, en la que el aminoácido en la posición 57 es Gln, a saber SEQ ID No: 22).

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo humanizado PankoMab N54Q (SEQ ID No: 16).

- 50 La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado PankoMab (SEQ ID No: 19).

La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo quimérico PankoMab N54Q (SEQ ID No: 20, en donde el aminoácido en la posición 76 es Gln, a saber SEQ ID No: 23).

La Figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo quimérico PankoMab N54Q (SEQ ID No: 21).

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos anti-MUC1.

La secuencia de ácidos nucleicos de la cadena pesada del anticuerpo PankoMab humanizado (véase, por ejemplo, el documento WO 2011/012309) se modificó al mutar el codón para Asn54 de acuerdo con el sistema de numeración Kabat/EU (posición de aminoácido 57 en la SEQ ID NO: 11) en el codón de cualquier aminoácido excepto Asn, especialmente para Gln.

1) Producción de los anticuerpos anti-MUC1 en una estirpe celular derivada de leucemia mieloide humana

Los vectores que comprenden las secuencias codificantes de la cadena pesada de tipo γ 1 y la cadena ligera de tipo κ de los anticuerpos mutados se transfectaron en la estirpe celular derivada de la leucemia mieloide humana NM-H9D8 (DSM ACC2806). Los diferentes anticuerpos α MUC1 que comprenden la mutación N54X (PankoMab N54X/PM-N54X en la cual X es cualquier aminoácido excepto N/Asn) o mutaciones de aminoácidos en las secuencias marco de VH y VL se expresaron en los clones obtenidos, produciendo las construcciones con un patrón de glicosilación humano. La concentración de los anticuerpos α MUC1 en el sobrenadante se determinó mediante la medición de octetos utilizando agujas recubiertas con proteína A o se cuantificó mediante absorbancia UV280 después de la purificación mediante cromatografía de proteína A. Las características de unión de los diferentes anticuerpos α MUC1 se determinaron mediante Antígeno-ELISA (véase ejemplo 2), y los anticuerpos purificados seleccionados también se analizaron mediante análisis de Scatchard (véase ejemplo 3), por Biacore (véase ejemplo 4a), por tecnología DRX² switchSENSE[®] (véase ejemplo 4b), o por citometría de flujo (ejemplo 7).

Además, el PM-N54Q y PankoMab no mutado con glicosilación Fab también se expresaron en la estirpe celular derivada de leucemia mieloide humana NM-H9D8-E6Q12 (DSM ACC2856) que expresa anticuerpo con fucosa reducida. Junto con los mismos anticuerpos expresados en NM-H9D8, estos anticuerpos se purificaron y analizaron en el ejemplo 6 por su comportamiento de unión al receptor Fc gamma III A.

2) Producción del anticuerpo anti-MUC 1 en la estirpe celular CHO

Las secuencias codificantes de PM-N54Q (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de PM-N54Q representada por la SEQ ID NO: 17 y secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de PM-N54Q representada por la SEQ ID NO: 18) que se sintetizaron por GeneArt[™] de ThermoFisher Scientific se clonaron en vectores de expresión y los plásmidos resultantes se electrotransfectaron en células CHO. Las células agrupadas cultivadas bajo presión de selección se aplicaron para fabricar el anticuerpo mutante PM-N54Q con procedimientos generales.

Ejemplo 2: ELISA de antígeno

Las características de unión al antígeno de PankoMab N54X, en las que el sitio de N-glicosilación en la parte Fab está inactivado, se compararon con PankoMab que tiene un sitio de N-glicosilación en su parte Fab.

Las características de unión de la versión Fab-desglicosilada del anticuerpo específico a MUC1 PankoMab (PM-N54Q) en comparación con PankoMab-GEX[®] (glicosilado) se analizaron utilizando péptidos de repetición en tándem derivados de MUC1 glicosilados y no glicosilados de manera diferente en estudios ELISA. En principio, ambos anticuerpos muestran la misma gradación por medio de la unión a péptidos PDTR glicosilados (APPAHGVTSA PD-T(X)-RPAPGSTAPPAHGVTS) con diferentes glicosilaciones en T: Se observó la unión más fuerte al péptido PDTR que lleva un Gal β 1-3GalNAc_{alfa} (TF) seguido de TF sialilado y O-glicosilación de GalNAc_{alfa} (Tn). La unión a O-glicosilación de GalNAc_{alfa} sialilado (sTn) fue significativamente menor. Como PankoMab-GEX[®], PM-N54Q mostró solo una pequeña actividad de unión al péptido MUC1 PDTR no glicosilado, lo que indica una especificidad tumoral adecuada (Figura 1C).

Sin embargo, en comparación con PankoMab-GEX[®], se encontró una unión cuatro veces mayor para PM-N54Q en el ELISA de antígeno TA-MUC1 utilizando el glicopéptido biotinilado que lleva un GalNAc_{alfa} (Tn) O-glicano. PM-N54Q se une aproximadamente siete veces mejor al mismo péptido MUC1 cuando se glicosila con GalNAc_{alfa} sialilado (sTn). La unión a Gal β 1-3GalNAc_{alfa} (TF) y TF sialilado (sTF) en la treonina de la secuencia PDTR (Figura 1A) fue dos veces mejor para PM-N54Q.

Ambos anticuerpos muestran una unión fuertemente disminuida a la variante del péptido MUC1 APPAHGVTSAPES(Tn)-RPAPGSTAPPAHGVTS con glicosilación de Tn en la serina en comparación con la del péptido PDT(Tn)R. Sin embargo, también en el presente documento el PM-N54Q desglicosilado con Fab se une significativamente más fuerte que PankoMab-GEX[®] (Figura 1B).

Se compararon otras variantes de PM-N54X desglicosiladas con Fab con PankoMab que tiene una N-glicosilación en su parte Fab. Primero, todas las variantes se compararon directamente a partir del sobrenadante, sin purificación. La concentración se determinó por Octet. Todas las variantes de PM-N54X se unieron mejor que las PM glicosiladas con Fab. Además, era visible una clara tendencia que dependía de las propiedades químicas de la cadena lateral del aminoácido. Los grupos de ácido carboxílico en la cadena lateral mostraron la potenciación de unión más baja. La

mejor unión se observó para los aminoácidos con uno o dos nitrógenos (como aminas primarias o secundarias) (Figura 1D).

Además, las variantes desglicosiladas con Fab seleccionadas (PM-N54H, -W y -Q) se purificaron mediante cromatografía de proteína A y se analizaron en ELISA (Figura 1E). La mejora de la unión al péptido TF-MUC1 es de aproximadamente 5 a 8 veces y al péptido Tn-MUC1 de aproximadamente 2 a 3 veces en comparación con PankoMab con glicosilación Fab, respectivamente.

Además, se analizaron dos variantes marco diferentes de PM-N54Q para la unión al péptido PDTR-MUC1 glicosilado con Tn en ELISA (véase Figura 1F). La variante del marco mf-a lleva nueve mutaciones de aminoácidos en el marco VH y tres en el marco VL; la variante mf-b lleva también nueve mutaciones de aminoácidos en el marco VH y cuatro en el marco VL. Ambas variantes mutadas muestran una unión similar en comparación con el anticuerpo PM-N54Q.

Ejemplo 3: Análisis de unión de saturación de anticuerpos anti-MUC1 a células MCF-7 y ZR-75-1

Dos factores son especialmente críticos para la idoneidad terapéutica de un anticuerpo: la afinidad y el número de sitios de unión de un anticuerpo sobre las células tumorales.

La unión de la versión desglicosilada con Fab del anticuerpo específico de MUC1 PankoMab (PM-N54Q) sobre estirpes celulares tumorales humanas positivas para TA-MUC-1 se evaluó utilizando anticuerpos radiomarcados mediante análisis de unión saturada sobre las estirpes celulares de carcinoma de mama humano ZR-75-1 y MCF-7 en comparación con PankoMab-GEX[®] glicosilado con Fab. Los anticuerpos se quelaron con un exceso molar de 12 veces de p-SCN-Bencil-DTPA en carbonato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.7, durante 2 h a 37 °C, seguido de una noche de incubación a 2-8 °C. El quelante libre se eliminó sobre columnas de desalinización y filtración de flujo directo (valor de corte 50 kDa, intercambio de tampón 6x a PBS). Los anticuerpos quelados se marcaron radiactivamente con ¹¹¹In (2 µCi/µg de anticuerpo) durante 1 h a 37 °C en fosfato 6 mM, KCl 1.6 mM, NaCl 80 mM, acetato de sodio 0.2 M, HCl 0.1 M. Las preparaciones se neutralizaron mediante la adición de 8-9 veces el volumen de PBS concentrado 10x. Se agregaron aproximadamente 1/50 del volumen de suero bovino fetal a la preparación de anticuerpos marcados neutralizados. En el enfoque de unión por célula se utilizaron 1*10⁶ células. Se agregaron varias concentraciones de anticuerpos marcados a las células sedimentadas (30-1000 ng/200 µl en BSA/PBS al 1 %). Las mezclas de células y anticuerpos resuspendidas se midieron en un contador gamma y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Las células con anticuerpos unidos se separaron por centrifugación y se lavaron con BSA/PBS al 1 % durante otra hora a 4 °C. A continuación, se midió el sedimento celular para determinar el anticuerpo marcado con ¹¹¹In en un contador gamma. La evaluación se realizó mediante “ka específico de un sitio” en GraphPad Prism. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 1. Los datos muestran la alta afinidad y el muy alto número de sitios de unión de PM-N54Q sobre estas células tumorales. La unión fue más de 2.5 veces mayor que la de PankoMab-GEX[®] y también aumentó ligeramente el número de sitios de unión.

Tabla 1: Asociación constante y sitios de unión a antígeno sobre MUC1⁺ células tumorales

K _{asoc.} [1/M]	ZR-75-1	MCF-7
PM con glic. de Fab	1.2 x 10 ⁷	3 x 10 ⁷
PM N54Q sin glic. de Fab	3.4 x 10 ⁷	7.8 x 10 ⁷
Sitios de unión	ZR-75-1	MCF-7
PM con glic. de Fab	20 x 10 ⁵	0.6 x 10 ⁵
PM N54Q sin glic. de Fab	30 x 10 ⁵	0.9 x 10 ⁵

Ejemplo 4a: Análisis de resonancia de plasmón de superficie (BiaCore)

La unión de la versión desglicosilada con Fab del anticuerpo específico de MUC1 PankoMab (PM-N54Q) sobre el péptido glicosilado derivado de TA-MUC-1 se evaluó mediante análisis de resonancia de plasmón de superficie (Biacore). Se recubrió un chip sensor de estreptavidina con el péptido TA-MUC1 biotinilado (Tn glicosilado o no glicosilado). PankoMab y PM-N54Q se diluyeron secuencialmente 1:3 desde 3,600 hasta 4.9 nM en HPS-EP. Las diluciones se inyectaron a 50 µl/min. La unión máxima de cada concentración se determinó como unidades de respuesta (RU), respectivamente, y se evaluó con GraphPad Prism utilizando “unión específica de un sitio”. La Figura 2 muestra las curvas de unión obtenidas con PM-N54Q en comparación con PankoMab-GEX[®]. Las afinidades (K_D) de 388 nM y 652 nM para PM-N54Q y PankoMab-GEX[®], respectivamente. Por lo tanto, en este entorno experimental fue detectable un aumento de casi el doble en la afinidad.

Ejemplo 4b: Detección de proximidad de fluorescencia (por DRX², Dynamic Biosensors)

Un nuevo método para determinar las constantes de unión y la afinidad es la detección de proximidad por fluorescencia utilizando ADN de hebra sencilla (96mer) impreso sobre un chip y ADN complementario acoplado a un ligando. En el presente estudio, se utilizó estreptavidina como ligando para capturar péptidos TA-MUC1 biotinilados. La unión de PankoMab a los péptidos dio como resultado un cambio de fluorescencia. Las tasas de activación y desactivación se pueden calcular durante la asociación y disociación. Debido a una mayor sensibilidad, se pueden monitorizar las interacciones más rápidas en comparación con la resonancia de plasmón de superficie. Esto da como resultado una cinética de unión diferente de SPR pero más comparable al método "estándar de oro" KinExA, medido en un sistema líquido.

PankoMab y PM-N54Q se diluyeron a partir de 300 nM en etapas de 1:9 a 3.67 nM en tampón PE140 y se aplicaron a los péptidos unidos al chip. Las curvas de unión se evaluaron mediante ajuste global monoexponencial (software del instrumento). Las curvas de unión de PM y PM-N54Q se muestran a modo de ejemplo en la Figura 3A y B. Las afinidades calculadas de las variantes de PankoMab se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2: Constantes de disociación de variantes de PankoMab para el péptido antigénico

variante PankoMab	k_D
PM con glicosilación de Fab	4.1 nm
PM-N54D	1.9 nm
PM-N54Q	1.6 nm
PM-N54H	0.6 nm

15 Ejemplo 5: Caracterización bioquímica

La SDS-PAGE reductora y no reductora se utiliza para analizar la pureza y la identidad de un anticuerpo. El patrón de bandas en los geles no reductores muestra la banda principal a aproximadamente 160 kDa y artefactos metódicos de cadenas ligeras y pesadas y combinaciones de las mismas (~25, 50-55, 75, 110, 135 kDa). Los geles reductores muestran distintas bandas de cadena ligera y pesada a 25 y 50-55 kDa. Debido a la falta de glicosilación de Fab, PM-N54Q tiene una cadena pesada más pequeña, como se esperaba (véase la Figura 4, a la derecha).

El perfil de carga es claramente diferente, como lo muestra el enfoque isoeléctrico (IEF; véase la Figura 5). La glicosilación de Fab está considerablemente sialilada, mientras que la glicosilación Fc está sólo mínimamente sialilada. Por lo tanto, PankoMab-GEX[®] tiene más isoformas cargadas que PM-N54Q, lo que refleja su mayor nivel de ácidos siálicos cargados negativamente en la parte Fab.

25 Ejemplo 6: Unión al receptor Fcγ

Los ensayos de unión de FcγR para FcγRIIIa (CD16a) se basan en la tecnología AlphaScreen[®] de PerkinElmer. La plataforma AlphaScreen[®] se basa en la tecnología simple basada en perlas de PerkinElmer y es una alternativa más eficiente al ELISA tradicional, ya que no se necesitan etapas de lavado.

Para los ensayos de unión al receptor, FcγRIIIa etiquetado con His (Glycotope GmbH) es capturado por perlas donantes de quelato de Ni. Los anticuerpos anti-MUC1 y las perlasceptoras acopladas de anti-ratón de conejo compiten por unirse a FcγR. En caso de interacción de FcγR con perlasceptoras unidas a anti-ratón de conejo, las perlas donadoras yceptoras se acercan mucho, lo que conduce, tras la excitación del láser a 680 nm, a la emisión de luz. Se logra una señal máxima (señal_{máx}) sin un competidor. En caso de competencia, donde un anticuerpo de prueba se une a FcγR, la señal_{máx} se reduce de manera dependiente de la concentración. La quimioluminiscencia se cuantificó por medición a 520-620 nm (método AlphaScreen[®]) utilizando un lector de etiquetas múltiples EnSpire 2300 (PerkinElmer). Todos los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar de muestras duplicadas. Los datos se evaluaron y calcularon utilizando un ajuste de curva no lineal (pendiente variable de dosis-respuesta sigmoidal) con el software GraphPad Prism 5. Como resultado, se obtuvo una curva sigmoidea dependiente de la concentración, que está definida por meseta superior, meseta inferior, pendiente y EC₅₀.

Como se muestra en la Figura 6A y B, la afinidad de unión de FcγRIIIa fue comparable para PankoMab N54Q y PankoMab, por lo que en la Figura A se aplicaron anticuerpos poco fucosilados y en la Figura B anticuerpos altamente fucosilados en el ensayo. Por lo tanto, la eliminación de la glicosilación de Fab no afectó a la interacción del receptor del anticuerpo.

Ejemplo 7: Unión a TA-MUC1 celular

Se expresaron transitoriamente N54Q y N54D y se purificaron mediante cromatografía de proteína A. La unión de las dos variantes a TA-MUC1 de superficie celular se comparó con PM con glicosilación de Fab utilizando dos estirpes celulares de carcinoma diferentes. La estirpe de carcinoma de células epidermoides de lengua HSC-4 expresa TA-

MUC1 en un grado medio y la estirpe celular de carcinoma de ovario CaOV-3 a un alto grado. Las células tumorales se incubaron con anticuerpos en diluciones en serie y los anticuerpos unidos se detectaron utilizando un anticuerpo IgG anti-humano de cabra conjugado con ficoeritrina (cadena pesada y ligera). Se incluyó un control de IgG humana para controlar la tinción de fondo. La unión se analizó por citometría de flujo.

- 5 Las construcciones PM, PM-N54Q y PM-N54D analizados muestran una unión fuerte y específica a las células HSC-4 y CaOV-3 que expresan TA-MUC1 en comparación con un control de IgG1 humana (Figura 7). La unión de PM-N54D a células CaOV-3 con TA-MUC1^{alto} fueron comparables a PM con glicosilación de Fab, mientras que PM-N54Q mostró una unión ligeramente mejor (Figura 7A). Utilizando células de carcinoma HSC-4 que expresan TA-MUC1 a un nivel intermedio, la variante PM-N54Q fue claramente superior en la unión a TA-MUC1 celular en comparación con PM, mientras que PM-N54D mostró una unión inferior en comparación con PM con glicosilación Fab (Figura 7B).

Identificación del material biológico depositado

Las estirpes celulares DSM ACC 2806, DSM ACC 2807 y DSM ACC 2856 se depositaron en DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (DE) en las fechas indicadas en la siguiente tabla.

Nombre de la estirpe celular	Número de acceso	Depositante	Fecha de depósito
NM-H9D8	DSM ACC 2806	Glycotope GMBH	15 de septiembre de 2006
NM-H9D8-E6	DSM ACC 2807	Glycotope GMBH	5 de octubre de 2006
NM-H9D8-E6Q12	DSM ACC 2856	Glycotope GmbH	8 de agosto de 2007

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo capaz de unirse a MUC1, que comprende
 - (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y la CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y
 - (ii) una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y/o la región variable de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.
4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende una región Fc y preferiblemente es un anticuerpo de tipo IgG1, IgG2 o IgG4; más preferiblemente en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo se puede obtener mediante la producción en una célula de mamífero, tal como una estirpe celular humana seleccionada del grupo que consiste en NM-H9D8 (DSM ACC 2806), NM-H9D8-E6 (DSM ACC 2807), NM-H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856) y estirpes celulares derivadas de las mismas, o una estirpe celular de CHO o una estirpe celular derivada de la misma.
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo compite para la unión a TA-MUC1 con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.
7. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un casete o vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 y un promotor conectado operativamente con dicho ácido nucleico.
9. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 o el casete o vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Un conjugado que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 conjugado a un agente adicional, en el que el agente adicional es un polipéptido o proteína, tal como una citocina, un compuesto inmunomodulador, un anticuerpo específico de tumor o un anticuerpo que bloquea o que activa el punto de control inmunitario.
11. Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, el casete o vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 9, o el conjugado de acuerdo con la reivindicación 10.
12. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el conjugado de acuerdo con la reivindicación 10, o la composición de acuerdo con la reivindicación 11 para uso en medicina.
13. El anticuerpo, el conjugado, o la composición para uso en medicina de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de cáncer, una infección, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno de inmunodeficiencia.
14. El anticuerpo, el conjugado o la composición para uso en medicina de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en el diagnóstico, detección y/o monitorización del cáncer, una infección, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno de inmunodeficiencia.

15. El anticuerpo, el conjugado o la composición para uso en medicina de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en el que el cáncer se caracteriza porque expresa TA-MUC1; y/o en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de sangre, cáncer endometrial, cáncer de tiroides, leucemias, seminomas, melanomas, carcinomas, teratomas, linfomas, sarcomas, mesoteliomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer rectal, cáncer suprarrenal, cáncer de piel, cáncer del cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer intestinal, cáncer del intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglio linfático, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de útero y las metástasis de los mismos.
- 5
- 10 16. El anticuerpo, el conjugado o la composición para uso en medicina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el anticuerpo se utiliza en combinación con un agente adicional.
17. Un método para producir un anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1, que comprende
- (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende
- 15 (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y la CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y
- (ii) una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;
- 20 (b) introducir una mutación en dicho ácido nucleico para producir un ácido nucleico mutado, en el que la mutación se introduce en el codón que codifica el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 de tal manera que dicho codón codifica glutamina; y
- (c) producir el anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1 al expresar el ácido nucleico mutado en una célula huésped.
- 25 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende adicionalmente la etapa de
- (d) procesar el anticuerpo con aumento de la afinidad de unión a MUC1.

Figura 1

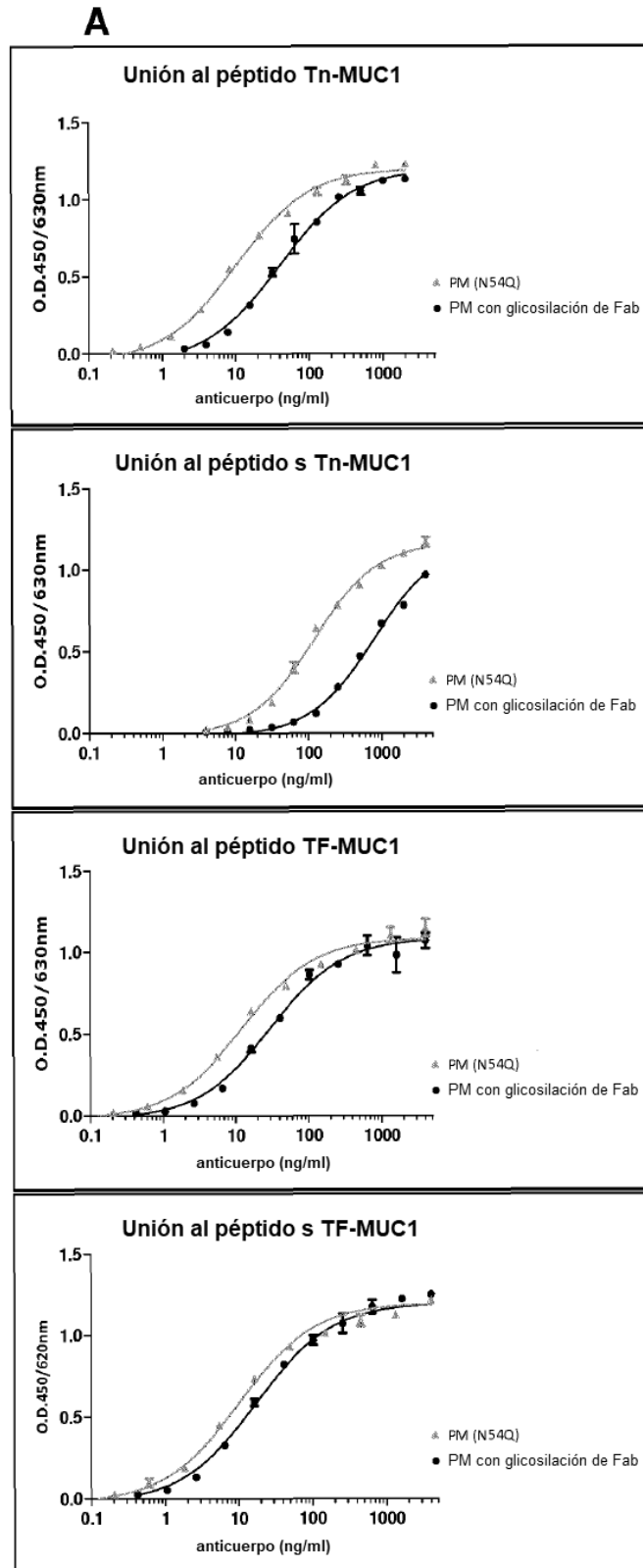


Figura 1 - continuación

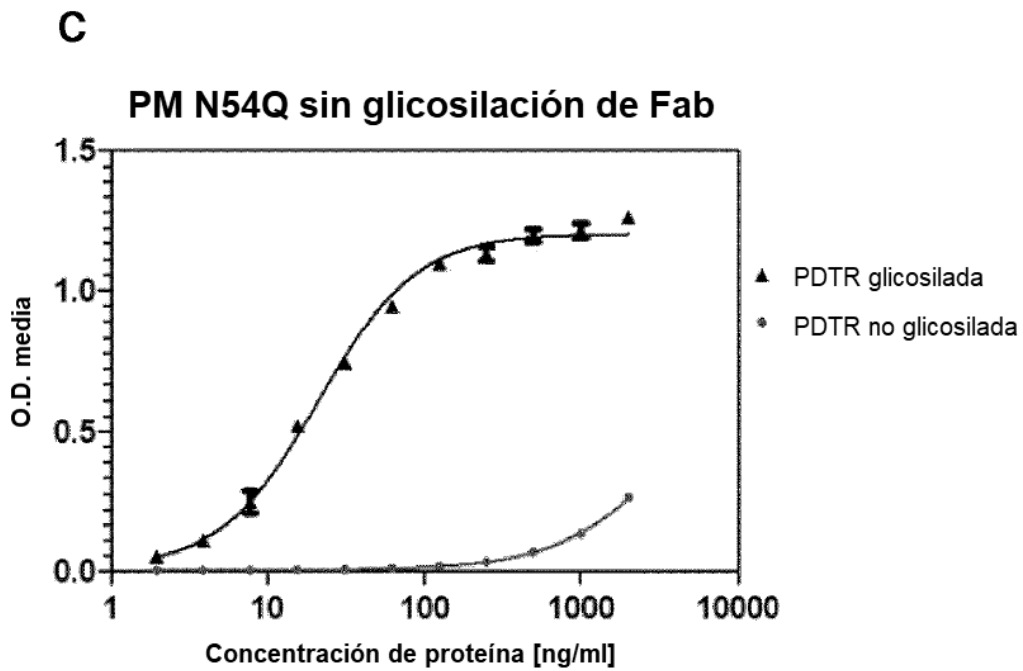
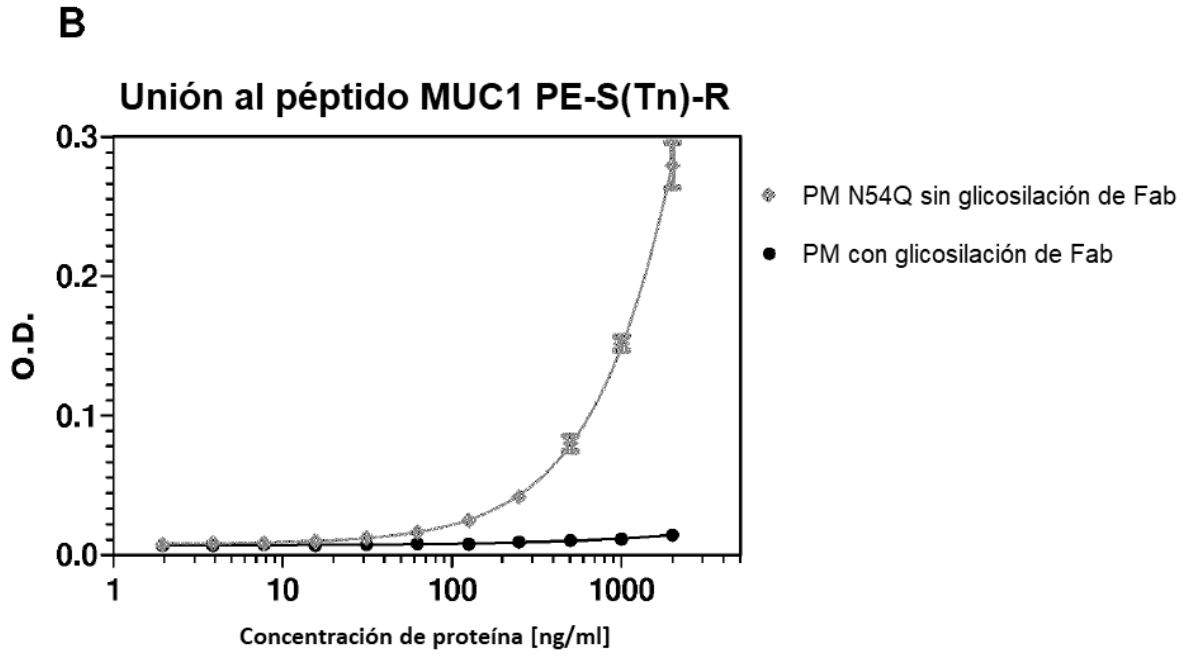


Figura 1 - continuación

D

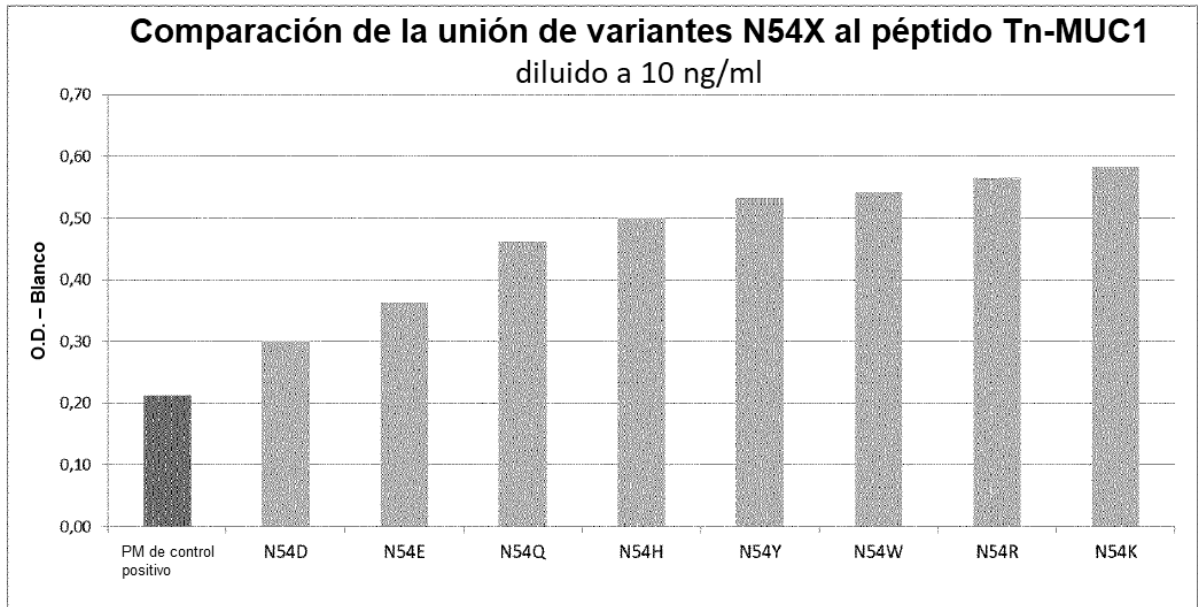


Figura 1 - continuación

E

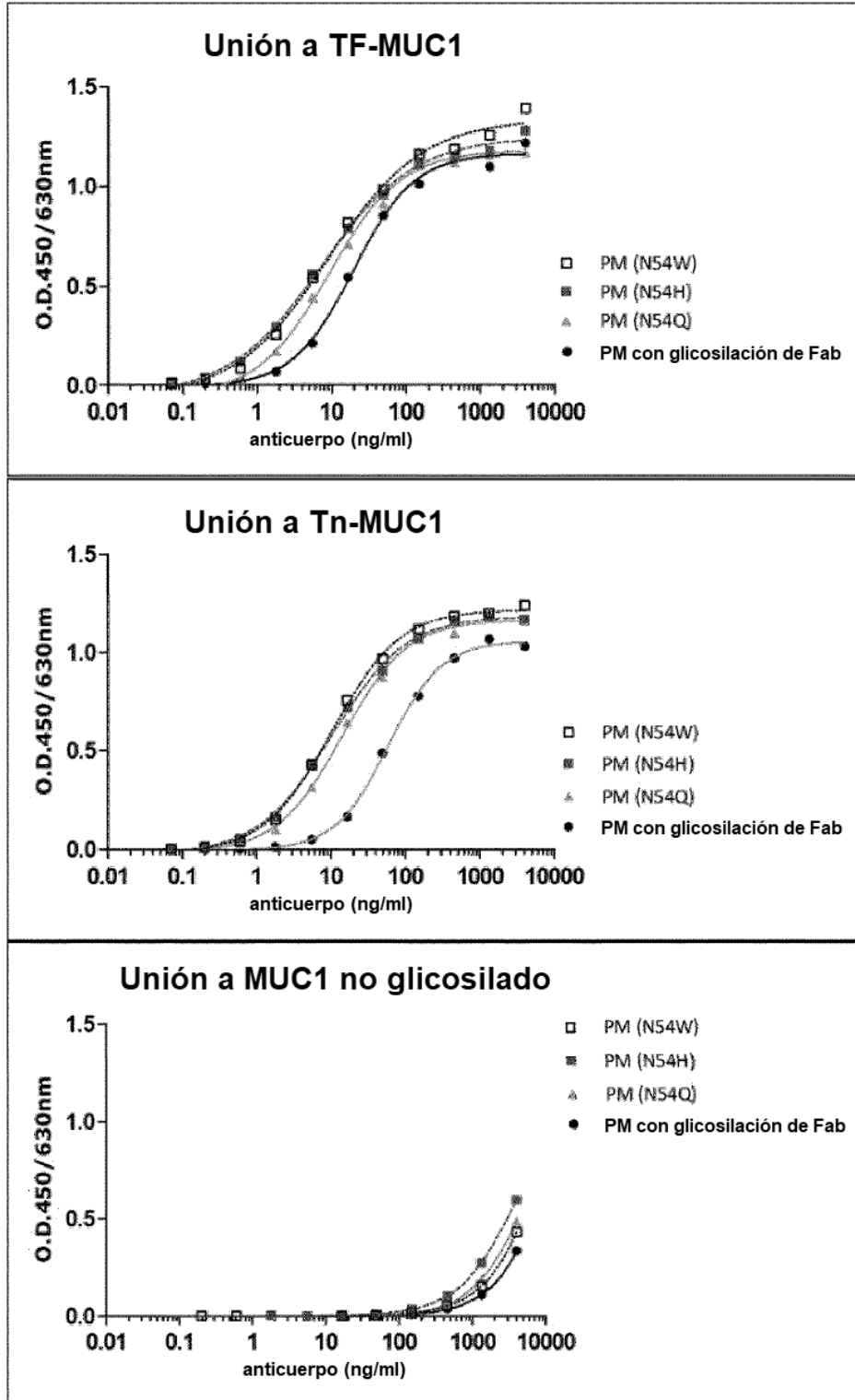


Figura 1 - continuación

F

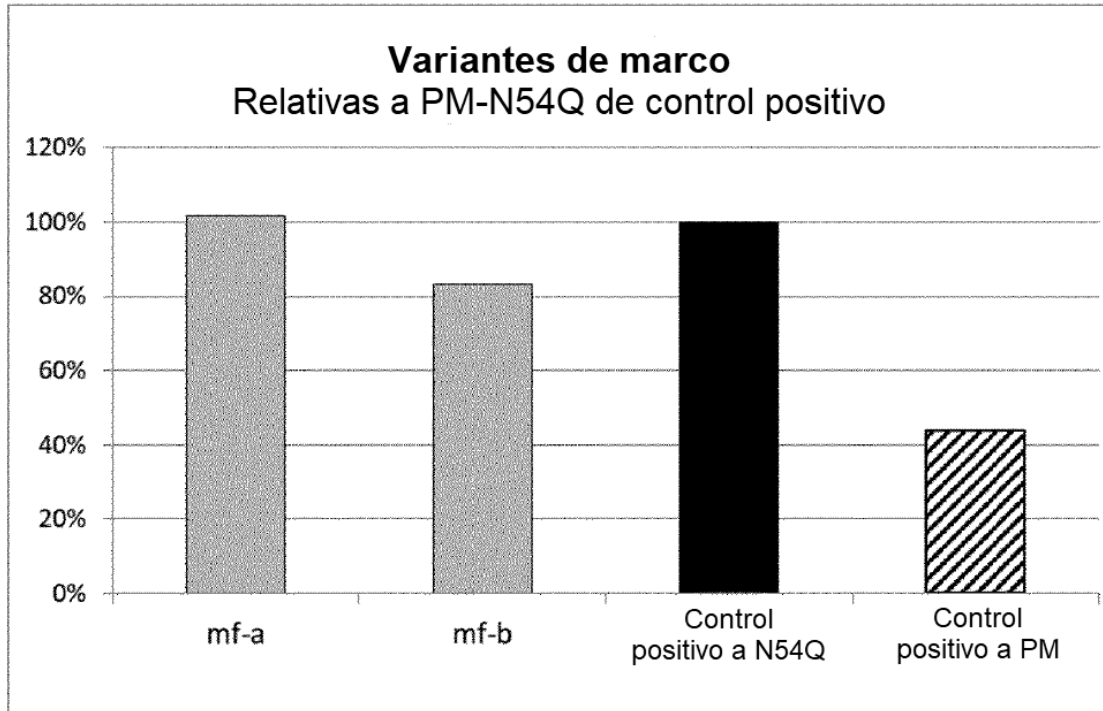


Figura 2

Resonancia de plasmón de superficie (Biacore)

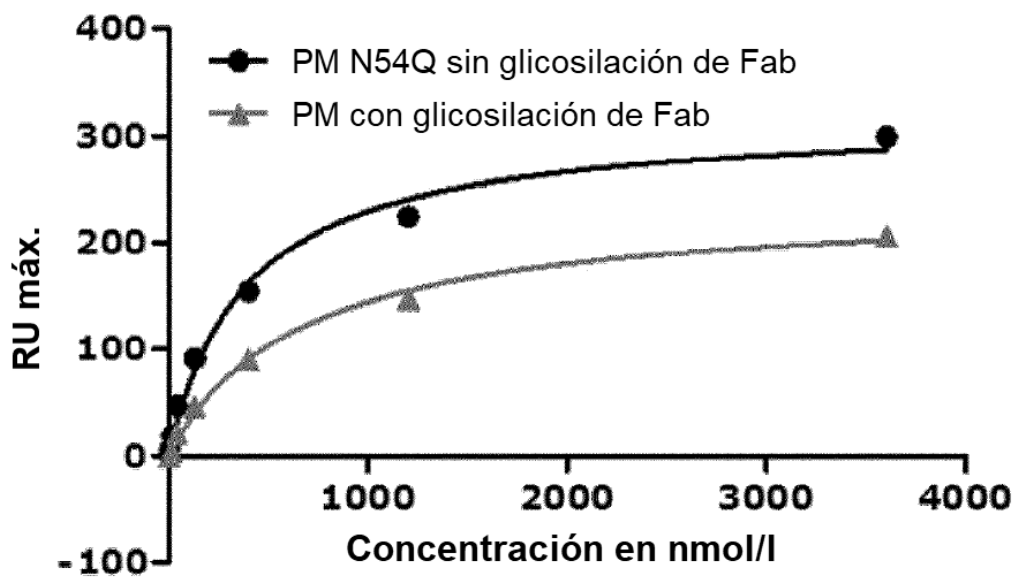


Figura 3

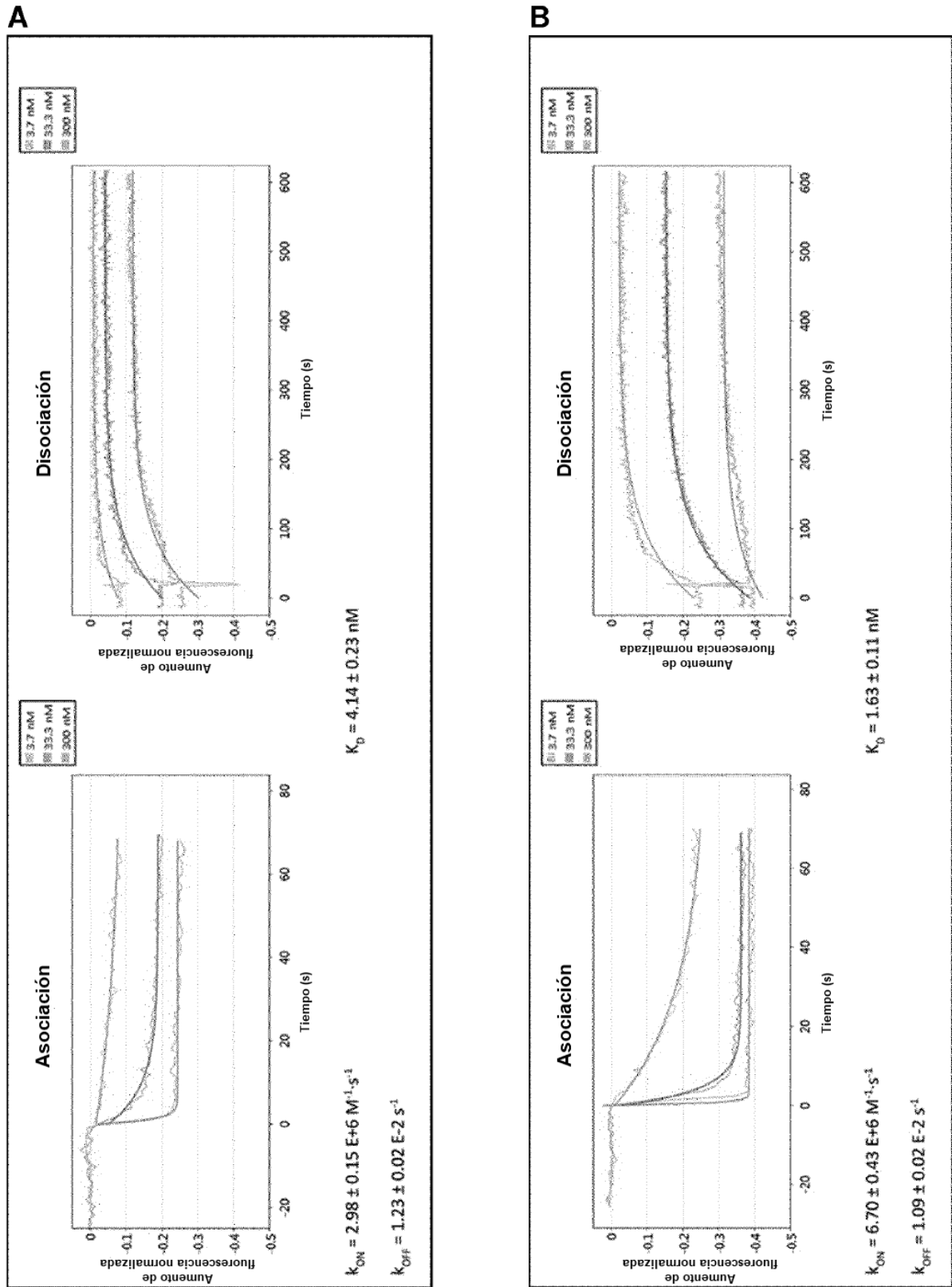


Figura 4

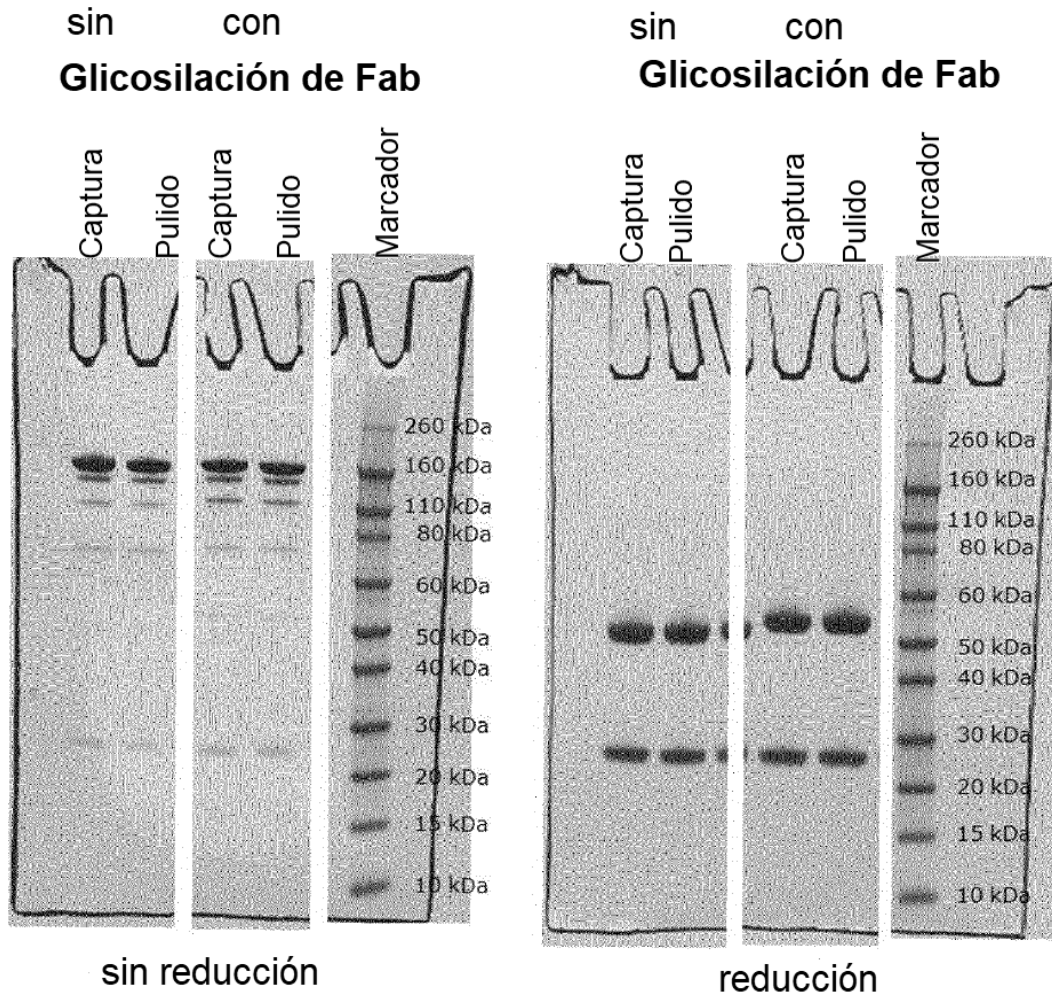


Figura 5

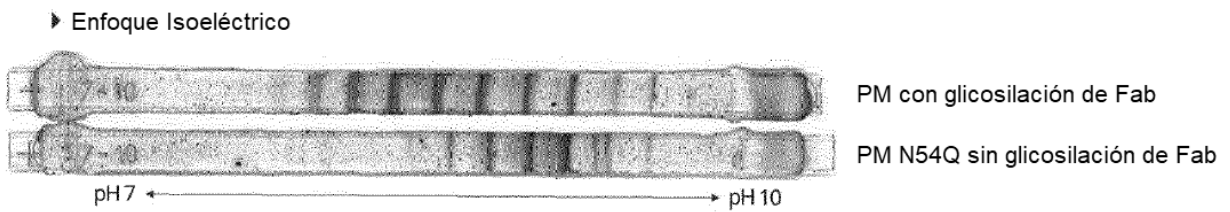


Figura 6

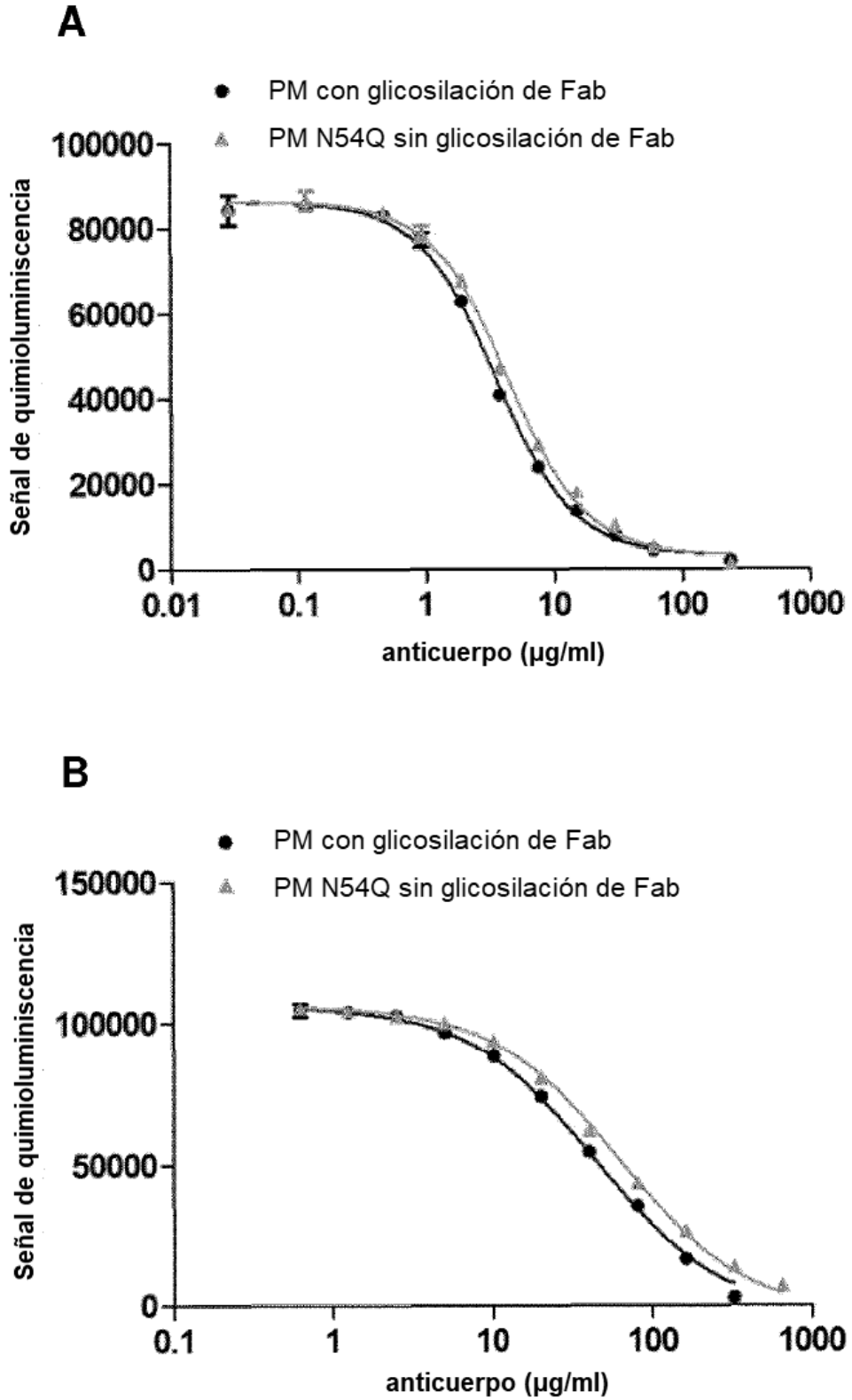
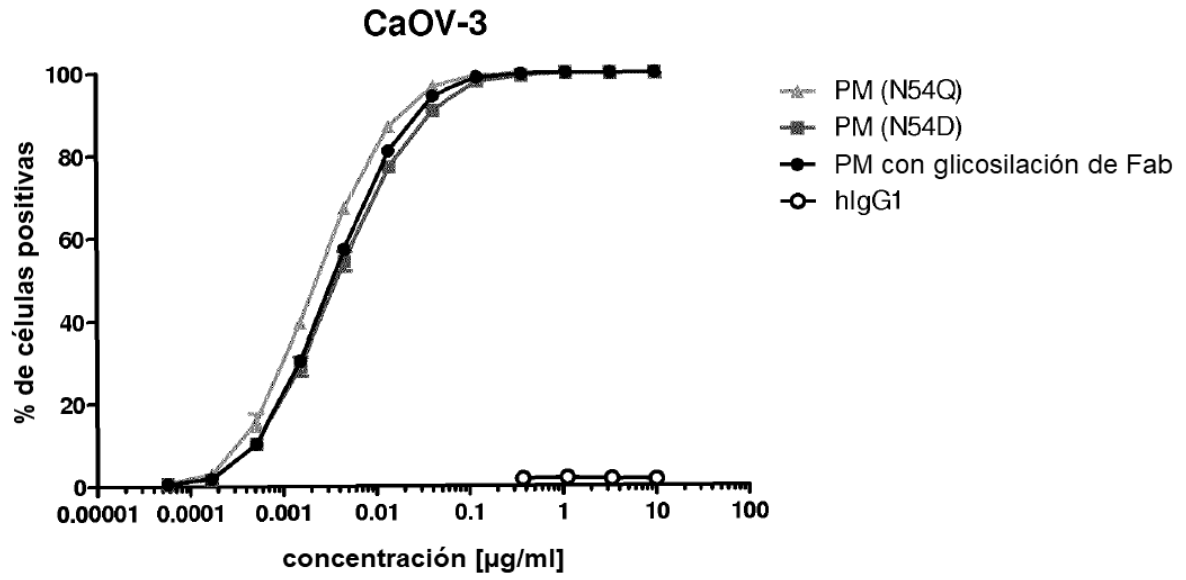


Figura 7

A



B

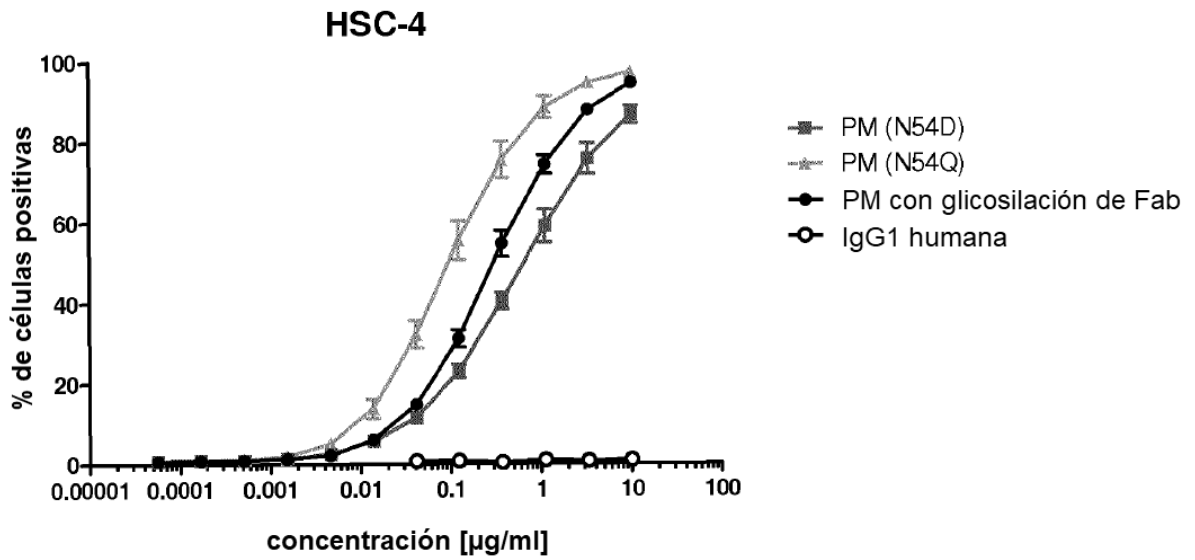


Figura 8

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado N54Q (SED ID No: 22)

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFPPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGEIRLKSNNQYTTTHY
AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHYFDYWGQGLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEGLHN
HYTQKSLSLSPGK

región variable: aa 1-117, región constante: aa 118-447

Figura 9

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de los anticuerpos humanizados N54Q y PankoMab (SED ID No: 16)

DIVMTQSPVSNPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLSAG
VPDRFSGSGSGTDFTLRI SRVEAEDVGVYYCAQMLELPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

región variable: aa 1-113, región constante: aa 114-219

Figura 10

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado PankoMab (SED ID No: 19)

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFPPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGEIRLKSNNYTTTHY
AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHYFDYWGQGLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEGLHN
HYTQKSLSLSPGK

región variable: aa 1-117, región constante: aa 118-447

Figura 11

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo quimérico PM N54Q (SED ID No: 23)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFPPFSNYWMNWVRQAPGK
GLEWVGEIRLKSQYTTTHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHYFD
YWGQGLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV
HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVP
EVSSVFIFFPKPKDVLTIITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQIN
STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMA
KDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGN
TFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

secuencia de señal secretora: aa 1-19, región variable: aa 20-136, región constante: aa 137-460

Figura 12

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo quimérico PM N54Q (SED ID No: 21)

MVLQQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSNPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYFFWYL
QKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLLELPPTFG
QGTEVEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINKWKIDGSERQNGVLN
SWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

secuencia de señal secretora: aa 1-20, región variable: aa 21-133, región constante: aa 134-239