

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 468**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2019 PCT/EP2019/062758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2019 WO19219891**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2019 E 19724824 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3794042**

54 Título: **Conjugado de anticuerpo-fármaco anti-MUC1-exatecán**

30 Prioridad:

18.05.2018 EP 18173253

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

01.10.2024

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO CO., LTD. (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi-honcho, Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 980 468 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

Conjugado de anticuerpo-fármaco anti-MUC1-exatecán

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de los conjugados de anticuerpo-fármaco ("antibody drug conjugates", ADC). El ADC de la presente invención comprende un anticuerpo anti-MUC1 o un anticuerpo anti-MUC1 mutado. Se proporciona un ADC con un anticuerpo anti-MUC1 mutado con mayor afinidad de unión al antígeno. En concreto, la asparagina 57 de la región variable de cadena pesada se sustituye por otro aminoácido en la versión mutada del anticuerpo humanizado PankoMab. De este modo, se elimina el sitio de glucosilación en la región CDR2 y aumenta la afinidad de unión al antígeno. El ADC presentó una eficacia antitumoral significativa. En realizaciones específicas, la presente invención se dirige al uso terapéutico y de diagnóstico de estos conjugados de anticuerpo-fármaco y a procedimientos de producción de dichos conjugados de anticuerpo-fármaco.

Antecedentes de la invención

15 Los anticuerpos contra antígenos asociados a tumores son productos terapéuticos ampliamente utilizadas contra el cáncer. En la actualidad, muchos anticuerpos contra el cáncer están aprobados para la terapia humana. Algunos de estos anticuerpos actúan bloqueando determinadas vías de transducción de señales que son cruciales para la supervivencia o la proliferación de células cancerosas específicas. Otros anticuerpos contra el cáncer activan la respuesta inmunitaria del paciente contra las células cancerosas diana, por ejemplo, iniciando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("antibody-dependent cellular cytotoxicity", ADCC) a través de las células asesinas naturales. Este mecanismo es inducido por la unión de la parte Fc del anticuerpo a los receptores de Fc de las células inmunitarias.

20 Un grupo interesante e importante de anticuerpos son los dirigidos contra las proteínas mucinas. Las mucinas son una familia de proteínas de alto peso molecular y fuertemente glucosiladas producidas por muchos tejidos epiteliales de vertebrados. Pueden subdividirse en proteínas mucinas, que están unidas a la membrana debido a la presencia de un dominio hidrófobo de 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 las proteínas mucinas humanas está formada por muchos miembros, entre ellos la MUC1, unida a la membrana.

25 El aumento de la producción de mucinas se produce en muchos adenocarcinomas, tales como el cáncer de páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, etc. Las mucinas también se sobreexpresan en enfermedades pulmonares, tales como el asma, la bronquitis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la 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. Además, también se está investigando el potencial de las mucinas como marcadores de diagnóstico. En la técnica, se conocen varios anticuerpos dirigidos contra proteínas de mucina (Clin. Cancer Res., 1 de noviembre de 2011, 17(21):6822-6830; PLoS One, 14 de enero de 2011, 6(1):e15921), en concreto MUC1. Por ejemplo, el documento WO 2011/012309 se refiere a anticuerpos antimucina que presentan una unión y/o reconocimiento del antígeno mejorados, así como a un procedimiento para mejorar la unión y/o el reconocimiento del antígeno de un anticuerpo antimucina. Sin embargo, su eficacia terapéutica aún podría mejorarse.

30 En vista de ello, existe la necesidad en la técnica de proporcionar anticuerpos terapéuticos anti-MUC1 con propiedades mejoradas.

35 Los ADC constan de tres componentes diferentes (anticuerpo, conector y fármaco/carga activa) que son responsables del transporte de la carga activa específicamente a las células diana. Hasta la fecha, se han introducido en el mercado cuatro ADC (gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), inotuzumab ozogamicina (Besponsa®), brentuximab vedotina (Adcetris®), trastuzumab emtansina (T-DM1; Kadcyla®)). Además, se están desarrollando más de 60 ADC para combatir una amplia gama de cánceres de la sangre y tumores sólidos. Los ADC han creado un nuevo paradigma para la quimioterapia contra el cáncer. Con la especificidad de un anticuerpo monoclonal y la capacidad citotóxica de los fármacos de molécula pequeña, los ADC prometen ser una parte importante del futuro de la medicina de precisión, así como de los tratamientos combinados. Por lo tanto, existe una necesidad constante de disponer de más ADC y de medios, procedimientos y usos relacionados con el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades.

40 Como ADC, se conocen los ADC en los que el exatecán está conjugado con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2) mediante un conector (documentos WO2014/057687, WO2015/115091). Sin embargo, no se conocen ADC en los que el exatecán esté conjugado con un anticuerpo anti-MUC1.

Sumario de la invención

45 Los presentes inventores han descubierto que la delección del sitio de glucosilación en la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-MUC1 PankoMab no suprime la unión al antígeno, sino que aumenta inesperadamente la afinidad por el antígeno del anticuerpo. Esto resultó especialmente sorprendente, ya que el sitio de glucosilación se encuentra en la segunda región determinante de la complementariedad de la región variable de cadena pesada (CDR-H2). Las CDR son las regiones de un anticuerpo que intervienen directamente en la unión al antígeno y proporcionan

el contacto con el epítipo. Por lo tanto, generalmente se espera que la modificación de los aminoácidos de una CDR sea perjudicial para la afinidad de unión al antígeno. El anticuerpo humanizado PankoMab comprende además un sitio de glucosilación en CDR-H2, que porta una estructura grande de carbohidrato. Esta estructura de carbohidratos está presente directamente en la interfase de unión al antígeno y, por lo tanto, se consideró que estaba implicada en la unión al antígeno. Sin embargo, tal como se demuestra en los ejemplos, la variante de PankoMab (PM-N54Q) en la que se deleciona el sitio de glucosilación sustituyendo el aminoácido portador de la estructura de carbohidrato presenta una mayor afinidad de unión al antígeno. Además, los presentes inventores han descubierto que un conjugado o un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende el PankoMab o la variante del PankoMab (PM-N54Q) presenta una eficacia antitumoral significativa contra tumores positivos a MUC1 y que el PM-N54Q-ADC presenta una eficacia antitumoral significativa en comparación con el PankoMab-ADC.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se dirige a un conjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, en el que el anticuerpo es capaz de unirse a MUC1 y comprende:

(i) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y

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

En un segundo aspecto, la presente invención se dirige a una composición que comprende el conjugado según la invención.

Según un tercer aspecto, la invención proporciona la composición o el conjugado según la invención para su uso en medicina, en especial en el tratamiento, la prevención o el diagnóstico del cáncer.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona kits o dispositivos que comprenden el conjugado según la invención y procedimientos asociados que son útiles en el diagnóstico, la detección o el seguimiento de trastornos asociados a MUC1, tales como el cáncer.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse, sin embargo, que la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los ejemplos específicos, que indican realizaciones preferidas de la solicitud, se ofrecen únicamente a título ilustrativo.

Definiciones

Tal como se utilizan en el presente documento, las siguientes expresiones y términos tienen preferentemente el significado que se indica a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario.

El término "comprende", tal como se utiliza en el presente documento, además de su significado literal, también incluye y se refiere específicamente a las expresiones "consiste fundamentalmente en" y "consiste en". Por lo tanto, el término "comprende" se refiere a realizaciones en las que la materia que "comprende" elementos específicamente enumerados no comprende otros elementos, así como a realizaciones en las que la materia que "comprende" elementos específicamente enumerados puede y/o de hecho comprende otros elementos. Asimismo, el término "tiene" debe entenderse como el término "comprende", que también incluye y se refiere específicamente a las expresiones "consiste fundamentalmente en" y "consiste en". La expresión "consiste fundamentalmente en", cuando sea posible su utilización, se refiere en concreto a realizaciones en las que la materia comprende un 20 % o menos, en concreto un 15 % o menos, un 10 % o menos o especialmente un 5 % o menos de elementos adicionales además de los elementos específicamente enumerados de los que consiste fundamentalmente la materia.

El término "anticuerpo" se refiere en concreto a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). La región constante de 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 los 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 cadena ligera consiste únicamente en un dominio constante. Las regiones variables pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad ("complementarity determining regions", CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco ("framework regions", 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, tales como cadenas pesadas de tipo γ , δ , α , μ o ϵ . Preferentemente, la cadena pesada del anticuerpo es una cadena γ .

Además, la región constante de cadena ligera también puede ser de cualquier tipo, tal como cadenas ligeras de tipo κ o λ . Preferentemente, la cadena ligera del anticuerpo es una cadena κ . Las expresiones "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 la región constante derivadas de secuencias de aminoácidos de la región constante de cadenas pesadas o ligeras naturales, especialmente secuencias de aminoácidos de la región constante de cadenas pesadas o ligeras humanas. En concreto, 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 humano (especialmente $\gamma 1$ humana). Además, la secuencia de aminoácidos del dominio constante de una cadena ligera de tipo κ es, en especial, al menos un 95 %, especialmente al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena ligera κ de un anticuerpo humano. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humanizado, humano o quimérico.

La porción de unión al antígeno de un anticuerpo suele referirse a la longitud completa o a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser desempeñada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Algunos 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, unidos 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 solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb, que consiste en un dominio V_H .

La "parte Fab" de un anticuerpo se refiere, en concreto, a una parte del anticuerpo que comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera (V_H y V_L) y los primeros dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera (C_{H1} y C_L). En los casos en que el anticuerpo no comprenda todas estas regiones, la expresión "parte Fab" sólo se refiere a aquellas de las regiones V_H , V_L , C_{H1} y C_L que estén presentes en el anticuerpo. Preferentemente, la "parte Fab" se refiere a la parte de un anticuerpo correspondiente al fragmento obtenido por digestión de un anticuerpo natural con papaína que contiene la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. En concreto, la parte Fab de un anticuerpo abarca el sitio de unión al antígeno o la capacidad de unión al antígeno del mismo. Preferentemente, la parte Fab comprende al menos la región V_H del anticuerpo.

La "parte Fc" de un anticuerpo se refiere en concreto a una parte del anticuerpo que comprende las regiones constantes de cadena pesada 2, 3 y, en su caso, 4 (C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}). En concreto, la parte Fc comprende dos de cada una de estas regiones. En los casos en que el anticuerpo no comprenda todas estas regiones, entonces la expresión "parte Fc" sólo se refiere a aquellas de las regiones C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} que estén presentes en el anticuerpo. Preferentemente, la parte Fc comprende al menos la región C_{H2} del anticuerpo. Preferentemente, la "parte Fc" se refiere a la parte de un anticuerpo correspondiente al fragmento obtenido por digestión de un anticuerpo natural con papaína que no contiene la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. En concreto, la parte Fc de un anticuerpo es capaz de unirse al receptor de Fc y, por lo tanto, por ejemplo, comprende un sitio de unión al receptor de Fc o una capacidad de unión al receptor de Fc.

El término "anticuerpo" y la expresión "construcción de anticuerpo", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren, en determinadas realizaciones, a una población de anticuerpos o de construcciones de anticuerpo, respectivamente, del mismo tipo. En concreto, todos los anticuerpos o las construcciones de anticuerpo de la población presentan las características utilizadas para definir el anticuerpo o la construcción de anticuerpo. En determinadas realizaciones, todos los anticuerpos o las construcciones de anticuerpo de la población tienen la misma secuencia de aminoácidos. La referencia a un tipo específico de anticuerpo, tal como un anticuerpo capaz de unirse específicamente a MUC1, se refiere en concreto a una población de este tipo de anticuerpo.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, también incluye fragmentos y derivados de dicho anticuerpo. Un "fragmento o derivado" de un anticuerpo, en concreto, es una proteína o glucoproteína que se deriva de dicho anticuerpo y que es capaz de unirse al mismo antígeno, en concreto al mismo epítipo, que el anticuerpo. Por lo tanto, un fragmento o derivado de un anticuerpo se refiere generalmente a un fragmento o derivado funcional. En realizaciones especialmente preferidas, el fragmento o derivado de un anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser desempeñada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa o derivados del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de un anticuerpo se incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada una de las cadenas pesada y ligera; (ii) fragmentos $F(ab)_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos 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 cadena pesada y de cadena ligera de un único brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una cadena polipeptídica única; (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 cadena pesada y una región variable de cadena ligera unidas covalentemente de tal manera que la

asociación de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera sólo pueda producirse de forma intermolecular, pero no intramolecular. Los derivados de un anticuerpo en concreto incluyen anticuerpos que se unen o compiten por el mismo antígeno que el anticuerpo original, pero que tienen una secuencia de aminoácidos diferente a la del anticuerpo original del que se derivan. Estos fragmentos de anticuerpos y derivados se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

Una secuencia de aminoácidos diana se "deriva" 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 preferentemente 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 cadena pesada (FRH1) de un anticuerpo diana corresponde a la región marco 1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de referencia. En determinadas realizaciones, una secuencia de aminoácidos diana "derivada" o "correspondiente" a una secuencia de aminoácidos de referencia es un 100 % homóloga o, en especial, un 100 % idéntica en toda su longitud a una parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de referencia. La "homología" o "identidad" de una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos se determina preferentemente según 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 cuya homología o identidad se define. 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 región variable específicas, en concreto es un anticuerpo que tiene secuencias de aminoácidos, tales como secuencias de CDR o secuencias de región variable, que son al menos el 75 %, preferentemente 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 secuencias de aminoácidos respectivas del anticuerpo original. En determinadas realizaciones, el anticuerpo derivado de un anticuerpo original (es decir, un derivado del mismo) comprende las mismas secuencias de CDR que el anticuerpo original, pero difiere en las secuencias restantes de las regiones variables.

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

La "unión específica" significa preferentemente que un agente, tal como un anticuerpo, se une más fuertemente a una diana, tal como un epítipo, para la que es específico en comparación con la unión a otra diana. Algunos ejemplos de criterios para determinar si la unión es específica o no pueden incluir una constante de disociación (en lo sucesivo denominada "KD"). Un agente se une más fuertemente a una primera diana en comparación con una segunda diana si se une a la primera diana con una constante de disociación (K_d) inferior a la constante de disociación de la segunda diana. Preferentemente, la constante de disociación para la diana a la que el agente se une específicamente es más de 100 veces, 200 veces, 500 veces o más de 1000 veces menor que la constante de disociación para la diana a la que el agente no se une específicamente. Además, la expresión "unión específica" indica en concreto una afinidad de unión entre los compañeros de unión con una constante de afinidad K_a de al menos 10^6 M^{-1} , preferentemente de al menos 10^7 M^{-1} , más preferentemente de al menos 10^8 M^{-1} . Un anticuerpo específico para un determinado antígeno en concreto se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a dicho antígeno con una afinidad que presenta una K_a de al menos 10^6 M^{-1} , preferentemente al menos 10^7 M^{-1} , más preferentemente al menos 10^8 M^{-1} . Por ejemplo, la expresión "anticuerpo anti-MUC1" en concreto se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a MUC1 y preferentemente es capaz de unirse a MUC1 con una afinidad que presenta una K_a de al menos 10^6 M^{-1} , preferentemente al menos 10^7 M^{-1} , más preferentemente al menos 10^8 M^{-1} .

El término "MUC1" se refiere a la proteína MUC1, también conocida como mucina-1, mucina epitelial polimórfica ("polymorphic epithelial mucin", PEM) o antígeno del cáncer 15-3, en concreto a la MUC1 humana (n.º de registro P15941). La MUC1 pertenece a la familia de las mucinas y codifica una fosfoproteína glucosilada unida a la membrana. La MUC1 tiene una masa de proteína central de 120-225 kDa que aumenta a 250-500 kDa con la glucosilación. 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 20 aminoácidos de número variable de repeticiones en tándem ("variable number tandem repeat", VNTR), con un número de repeticiones que varía de 20 a 120 en diferentes individuos. Estas repeticiones son ricas en residuos de serina, treonina y prolina, lo que permite una fuerte O-glucosilación. En determinadas realizaciones, el término "MUC1" se refiere a la MUC1 asociada a tumores ("tumor-associated MUC1", TA-MUC1). La TA-MUC1 es la MUC1 presente en las células cancerosas. Esta MUC1 difiere de la MUC1 presente en las células no cancerosas en su nivel de expresión mucho mayor, su ubicación y su glucosilación. En concreto, la TA-MUC1 está presente apolarmente sobre toda la superficie celular de 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, la TA-MUC1 tiene una O-glucosilación aberrante, que expone nuevos epítipos peptídicos en el esqueleto de la proteína MUC1, y nuevos antígenos tumorales de carbohidratos, tales como el antígeno alfa de Thomsen-Friedenreich (TFa).

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

5 La expresión "ácido siálico" se refiere en concreto a cualquier derivado N- u O-sustituido del ácido neuramínico. Puede referirse tanto al ácido 5-N-acetilneuramínico como al ácido 5-N-glucolilneuramínico, pero preferentemente sólo se refiere al ácido 5-N-acetilneuramínico. El ácido siálico, en concreto el ácido 5-N-acetilneuramínico, se une preferentemente a una cadena de carbohidrato mediante un enlace 2,3 o 2,6. Preferentemente, en los anticuerpos descritos en el presente documento están presentes tanto los ácidos siálicos acoplados en 2,3 como en 2,6.

10 Una "cantidad relativa de glucanos" según la invención se refiere a un porcentaje específico o a un intervalo de porcentajes de los glucanos unidos a los anticuerpos de un preparado de anticuerpos o de una composición que comprende anticuerpos, respectivamente. En concreto, la cantidad relativa de glucanos se refiere a un porcentaje o intervalo porcentual específico de todos los glucanos comprendidos en los anticuerpos y, por tanto, unidos a las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos en un preparado de anticuerpos o en una composición que comprende anticuerpos. El 100 % de los glucanos se refiere a todos los glucanos unidos a los anticuerpos del preparado de anticuerpos o de una composición que comprende anticuerpos, respectivamente. Por ejemplo, una cantidad relativa de glucanos portadores de GlcNAc bisecante del 10 % se refiere a una composición que comprende anticuerpos en la que el 10 % de todos los glucanos comprendidos en los anticuerpos y, por tanto, unidos a las cadenas polipeptídicas de anticuerpos en dicha composición, comprenden un residuo de GlcNAc bisecante, mientras que el 90 % de todos los glucanos comprendidos en los anticuerpos y, por tanto, unidos a las cadenas polipeptídicas de anticuerpos en dicha composición, no comprenden un residuo de GlcNAc bisecante. La cantidad de referencia correspondiente de glucanos que representa el 100 % puede ser todas las estructuras de glucanos unidas a los anticuerpos de la composición, o todos los N-glucanos, es decir, todas las estructuras de glucanos unidas a un residuo de asparagina de los anticuerpos de la composición, o todos los glucanos de tipo complejo. El grupo de referencia de las estructuras de los glucanos generalmente se indica explícitamente o el experto puede deducirlo directamente de las circunstancias.

15 La expresión "N-glucosilación" se refiere a todos los glucanos unidos a residuos de asparagina de la cadena polipeptídica de una proteína. Estos residuos de asparagina generalmente forman parte de sitios de N-glucosilación que tienen la secuencia de aminoácidos Asn-Xaa-Ser/Thr, en la que Xaa puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina. Asimismo, los "N-glucanos" son glucanos unidos a residuos de asparagina de una cadena polipeptídica. Los términos y expresiones "glucano", "estructura de glucano", "carbohidrato", "cadena de carbohidrato" y "estructura de carbohidrato" se utilizan generalmente como sinónimos en el presente documento. Los N-glucanos suelen tener una estructura central común formada por dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y tres residuos de manosa, con la estructura Man α 1,6-(Man α 1,3-)Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc β 1-Asn, siendo Asn el residuo de asparagina de la cadena polipeptídica. Los N-glucanos se subdividen en tres tipos diferentes, a saber, glucanos de tipo complejo, glucanos de tipo híbrido y glucanos con alto contenido en manosa.

20 Las cifras indicadas en el presente documento, en concreto las cantidades relativas de una propiedad de glucosilación específica, deben entenderse preferentemente como cifras aproximadas. En concreto, las cifras pueden ser preferentemente hasta un 10 % superiores y/o inferiores, en concreto hasta un 9 %, un 8 %, un 7 %, un 6 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 % o un 1 % superiores y/o inferiores.

25 La expresión "conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC)" o el término "conjugado", tal como se utiliza en el presente documento en general, se refiere a la conexión de un anticuerpo, o de un fragmento de unión al antígeno del mismo, con otro agente, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina, un agente inmunoterapéutico, una sonda de obtención de imágenes y similares. La conexión puede realizarse a través de enlaces covalentes o a través de interacciones no covalentes, tales como las fuerzas electrostáticas. Para formar el conjugado de anticuerpo-fármaco pueden emplearse diversos conectores, conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Además, el conjugado de anticuerpo-fármaco puede proporcionarse en forma de una proteína de fusión que puede expresarse a partir de un polinucleótido que codifica el conjugado inmunitario. Tal como se utiliza en el presente documento, una "proteína de fusión" se refiere a proteínas creadas mediante la unión de dos o más genes o fragmentos de genes que originariamente codificaban proteínas distintas (incluidos péptidos y polipéptidos). La traducción del gen de fusión da lugar a una única proteína con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.

30 En un "conjugado" se unen dos o más compuestos. En determinadas realizaciones, al menos algunas de las propiedades de cada compuesto se conservan en el conjugado. La conexión puede lograrse mediante un enlace covalente o no covalente. Preferentemente, los compuestos del conjugado están conectados mediante un enlace covalente. Los diferentes compuestos de un conjugado pueden estar directamente unidos entre sí a través de uno o más enlaces covalentes entre los átomos de los compuestos. Como alternativa, los compuestos pueden estar unidos entre sí a través de un resto químico, tal como una molécula conectora, en la que el conector está unido covalentemente a los átomos de los compuestos. Si el conjugado está formado por más de dos compuestos, éstos pueden, por ejemplo, estar unidos en una conformación de cadena, un compuesto unido al siguiente compuesto, o varios compuestos unidos cada uno a un compuesto central.

La expresión "ácido nucleico" incluye los ácidos nucleicos monocatenarios y bicatenarios y los ácidos ribonucleicos, así como los ácidos desoxirribonucleicos. Pueden contener nucleótidos naturales o sintéticos y pueden estar modificados de modo natural o sintético, por ejemplo, por metilación o por bloqueo terminal en 5' y/o 3'.

5 La expresión "casete de expresión" se refiere en concreto a una construcción de ácido nucleico capaz de permitir y regular la expresión de una secuencia de ácido nucleico codificante introducida en él. 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 del tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5'-no transcritas y 5'- y 3'-no traducidas que intervienen en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como la caja TATA, la
10 secuencia de bloqueo terminal, la secuencia CAAT y similares. Más específicamente, las secuencias de control de expresión 5'-no transcritas 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 cadena arriba.

15 Según la invención, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico situada cadena arriba (5') de la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar y que controla la expresión de la secuencia proporcionando un sitio de reconocimiento y unión para ARN-polimerasas. El "promotor" puede incluir otros sitios de reconocimiento y unión para otros factores que intervienen en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procarionta o eucariota. 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
20 un agente inductor. Un gen que está bajo el control de un promotor inducible no se expresa o sólo se expresa en pequeña medida si falta un agente inductor. En presencia del agente inductor, el gen se activa o el nivel de transcripción aumenta. En general, esto se produce por la unión de un factor de transcripción específico.

25 El término "vector" se utiliza en el presente documento en su acepción más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permita, por ejemplo, introducir dicho ácido nucleico en células procariontas y/o eucariotas y, en su caso, integrarlo en un genoma. Los vectores de este tipo se replican y/o expresan preferentemente en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales. El término "plásmido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere por lo general a una construcción de material genético extracromosómico, normalmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

30 Según la invención, la expresión "célula hospedadora" se refiere a cualquier célula que pueda transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. La expresión "células hospedadoras" comprende, según la invención, células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, en especial células humanas, células de levadura y células de insecto). Se da especial preferencia a las células de mamíferos, tales como las células de seres humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras o primates. Las células pueden derivarse de una multiplicidad
35 de tipos de tejidos y comprender células primarias y líneas celulares. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula hospedadora en forma de una sola copia o de dos o más copias y, en una realización, se expresa en la célula hospedadora.

40 El término "paciente" significa, según la invención, un ser humano, un primate no humano u otro animal, en especial un mamífero, tal como una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato o un roedor, tal como un ratón y una rata. En una realización especialmente preferida, el paciente es un ser humano.

45 El término "cáncer" según la invención comprende en concreto leucemias, seminomas, melanomas, carcinomas, teratomas, linfomas, sarcomas, mesoteliomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer de recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer de sangre, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer de cuello de útero, cáncer de intestino, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ORL), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y sus metástasis. El término cáncer según la invención también comprende las metástasis del cáncer.

50 El término "tumor" se refiere a un grupo de células o tejido que se forma por una proliferación celular mal regulada. Los tumores pueden presentar una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal y suelen formar una masa de tejido distinta, que puede ser benigna o maligna.

Los términos "tumor" y "cáncer" se utilizan indistintamente.

55 El término "metástasis" se refiere a la propagación de células cancerosas desde su lugar 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 entran en la circulación corporal y se asientan para crecer dentro de tejidos normales en otras partes del cuerpo. Cuando las células tumorales hacen metástasis, el nuevo tumor se denomina secundario o metastásico, y sus células normalmente se parecen a las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que, si el cáncer de mama hace metástasis en los pulmones, el tumor secundario está formado por células anómalas

de mama, no por células anómalas de pulmón. El tumor en el pulmón se denomina entonces cáncer de mama metastásico, no cáncer de pulmón.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere en concreto a una composición adecuada para ser administrada a un ser humano o animal, es decir, una composición que contiene componentes farmacéuticamente aceptables.

5 Preferentemente, una composición farmacéutica comprende un compuesto activo o una sal o profármaco del mismo junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico, tal como un tampón, un conservante y un modificador de la tonicidad. Los intervalos numéricos descritos en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo. Los epígrafes que figuran en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta invención que pueden leerse por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Según una
10 realización, la materia descrita en el presente documento como que comprende determinadas etapas en el caso de los procedimientos o como que comprende determinados ingredientes en el caso de las composiciones se refiere a la materia que consiste en las respectivas etapas o ingredientes. Se prefiere seleccionar y combinar los aspectos preferidos y las realizaciones descritas en el presente documento, y la materia específica derivada de una combinación respectiva de realizaciones preferidas también pertenece a la presente divulgación.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de una variante del anticuerpo humanizado anti-MUC1 PankoMab en la que se elimina el sitio de glucosilación en la CDR-H2 (PM-N54Q). La delección del sitio de glucosilación se consiguió
20 sustituyendo el aminoácido Asn (asparagina) 57 de la región variable de cadena pesada (a saber, el aminoácido n.º 57 de SEQ ID NO:11) por otro aminoácido, en especial Gln (glutamina). Asn 57 es el residuo de aminoácido aceptor del sitio de glucosilación al que se une la estructura de carbohidrato. La sustitución de este residuo de asparagina por otro suprime la glucosilación, ya que la estructura del carbohidrato sólo puede ser transferida a un residuo de asparagina por las enzimas de la célula hospedadora. Sorprendentemente, se descubrió que la delección del sitio de glucosilación en la CDR-H2 de PankoMab aumentaba la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo.

En vista de estos resultados, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, en el que el anticuerpo es capaz de unirse a MUC1 y comprende:

- (i) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,
y
- 30 (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, CDR-L2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Unión a MUC1

El anticuerpo se une específicamente a un epítipo de MUC1. El epítipo se encuentra en las repeticiones extracelulares en tándem de MUC1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une a MUC1 de forma dependiente de la glucosilación. En concreto, el anticuerpo se une más fuertemente si dichas repeticiones en tándem están glucosiladas en un residuo de treonina con N-acetilgalactosamina (Tn), sialil α -2-6 N-acetilgalactosamina (sTn), galactosa β -1-3 N-acetilgalactosamina (TF) o galactosa β -1-3 (sialil α -2-6) N-acetilgalactosamina (sTF), preferentemente con Tn o TF. Preferentemente, el resto de carbohidrato está unido al residuo de treonina por un enlace α -O-glucosídico.
40 El epítipo en el dominio de repetición en tándem de MUC1 en concreto comprende la secuencia de aminoácidos PDTR (SEQ ID NO: 13) o PESR (SEQ ID NO: 14). La unión a este epítipo es preferentemente dependiente de la glucosilación, como se ha descrito anteriormente, en la que, en concreto, la unión aumenta si el resto de carbohidrato descrito anteriormente se une al residuo de treonina de la secuencia PDTR o PESR (SEQ ID NO: 13 y 14), respectivamente.

El epítipo es un epítipo de MUC1 asociado a tumor ("tumor-associated MUC1 epitope", TA-MUC1). Un epítipo TA-MUC1 en concreto se refiere a un epítipo de MUC1 que está presente en células tumorales, pero no en células normales y/o que sólo es accesible por anticuerpos en la circulación del hospedador cuando está presente en células tumorales, pero no cuando está presente en células normales. En determinadas realizaciones, la unión del anticuerpo a células que expresan el epítipo TA-MUC1 es más fuerte que la unión a células que expresan MUC1 normal, no tumoral. Preferentemente, dicha unión es al menos 1,5 veces más fuerte, preferentemente 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 a TA-MUC1, el anticuerpo se une preferentemente de forma específica al epítipo tumoral MUC1 glucosilado de tal forma que la fuerza de la unión se incrementa al menos en un factor 2, preferentemente en un factor 4 o en un factor 10, más preferentemente en un factor 20 en comparación con la unión al péptido no glucosilado de idéntica longitud e idéntica secuencia peptídica. Dicha unión puede ensayarse o determinarse mediante ELISA, RIA, análisis de resonancia de plasmón de superficie (en lo sucesivo, "SPR", "surface plasmon resonance") o similares. Algunos ejemplos de equipos utilizados en el análisis SPR pueden ser 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 en la superficie celular puede ensayarse por citometría de flujo o similar.

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

El anticuerpo anti-MUC1

20 Un anticuerpo capaz de unirse a MUC1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-L1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, CDR-L2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

25 En determinadas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Especialmente, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en especial al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En estas realizaciones, la región variable de cadena pesada todavía comprende CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Por lo tanto, cualquier desviación de la secuencia respecto a SEQ ID NO: 9 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En determinadas realizaciones, CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 2 se selecciona del grupo que consiste en glutamina, alanina, valina, histidina, triptófano, tirosina, lisina y arginina; especialmente glutamina, histidina, triptófano, tirosina, lisina y arginina.

35 Preferentemente, el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 2 es glutamina, histidina, triptófano, lisina o arginina, en especial glutamina. En concreto, CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En determinadas realizaciones, CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

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

45 En realizaciones específicas, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Especialmente, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en especial al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En estas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, cualquier desviación de la secuencia respecto a SEQ ID NO: 11 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

55 En determinadas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En especial, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en concreto al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En estas realizaciones, la región variable de cadena ligera todavía comprende CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo tanto, cualquier desviación

de la secuencia respecto a SEQ ID NO: 12 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

5 En realizaciones específicas, la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En concreto, la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

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

25 En realizaciones específicas, la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 8 y 3, y la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En concreto, la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 8 y 3, y la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

35 En realizaciones específicas, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 20 a 136 de SEQ ID NO: 20. Especialmente, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en concreto al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 20 a 136 de la SEQ ID NO: 20. En estas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, cualquier desviación de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 20 a 136 de SEQ ID NO: 20 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 20 a 136 de la SEQ ID NO: 20. En determinadas realizaciones, el aminoácido en la posición 76 de SEQ ID NO: 20 se selecciona del grupo que consiste en glutamina, alanina, valina, histidina, triptófano, tirosina, lisina y arginina; especialmente glutamina, histidina, triptófano, tirosina, lisina y arginina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 76 de SEQ ID NO: 20 es glutamina, histidina, triptófano, lisina o arginina, en especial glutamina. En concreto, CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y/o la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 20 a 136 de SEQ ID NO: 23.

50 En realizaciones específicas, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 21 a 133 de SEQ ID NO: 21. Especialmente, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en concreto al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 21 a 133 de la SEQ ID NO: 21. En estas realizaciones, la región variable de cadena ligera todavía comprende CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo tanto, cualquier desviación de la secuencia respecto a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 21 a 133 de SEQ ID NO: 21 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 21 a 133 de SEQ ID NO: 21.

60 En realizaciones específicas, la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 20 a 136 de SEQ ID NO: 20, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 7 y 3, y la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 90 % a la secuencia de

aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 21 a 133 de SEQ ID NO: 21, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En concreto, la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 20 a 136 de SEQ ID NO: 20, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 7 y 3, y la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 21 a 133 de SEQ ID NO: 21, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

En realizaciones específicas, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. Especialmente, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en concreto al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En estas realizaciones, la cadena pesada comprende la CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, cualquier desviación de la secuencia respecto a SEQ ID NO: 15 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En determinadas realizaciones, el aminoácido en la posición 57 de SEQ ID NO: 15 se selecciona del grupo que consiste en glutamina, alanina, valina, histidina, triptófano, tirosina, lisina y arginina; especialmente glutamina, histidina, triptófano, tirosina, lisina y arginina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 57 de SEQ ID NO: 15 es glutamina, histidina, triptófano, lisina o arginina, en especial glutamina. En concreto, CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y/o la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 20 a 136 de SEQ ID NO: 22.

En realizaciones específicas, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. Especialmente, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en concreto al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En estas realizaciones, la cadena pesada comprende la CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, cualquier desviación de la secuencia respecto a SEQ ID NO: 19 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En realizaciones específicas, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. Especialmente, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en concreto al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En estas realizaciones, la cadena ligera aún comprende CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo tanto, cualquier desviación de la secuencia respecto a SEQ ID NO: 16 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

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

En realizaciones específicas, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 8 y 3, y la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En concreto, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 8 y 3, y la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, en la que las CDR siguen teniendo las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

El anticuerpo incluye y abarca formas modificadas del mismo. Por forma modificada del anticuerpo se entiende un anticuerpo provisto de una modificación química o biológica. La forma químicamente modificada incluye una forma que tiene un esqueleto de aminoácido conjugado con un resto químico, una forma que tiene una cadena de carbohidratos N-enlazada u O-enlazada químicamente modificada y similares. Dicho resto o forma químico puede ser tóxica o citotóxica. La forma biológicamente modificada incluye una forma que ha sufrido una modificación postraduccional (por ejemplo, glucosilación N-enlazada u O-enlazada, un procesamiento N-terminal o C-terminal, una desamidación, la isomerización del ácido aspártico o la oxidación de la metionina), una forma que contiene un residuo de metionina añadido al N-terminal mediante expresión utilizando células hospedadoras procariontas y similares. Dicha

forma modificada también incluye una forma marcada para permitir la detección o el aislamiento del anticuerpo o del antígeno, por ejemplo, una forma marcada enzimáticamente, una forma marcada fluorescentemente o una forma marcada por afinidad. Dicha forma modificada del anticuerpo es útil para mejorar la estabilidad o la retención en sangre del anticuerpo original, reducir la antigenicidad, detectar o aislar el anticuerpo o el antígeno, etc.

5 En concreto, el anticuerpo puede comprender una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en defucosilación, fucosa reducida, glucosilación N-enlazada, glucosilación O-enlazada, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización del ácido aspártico, oxidación de la metionina, sustitución de dos residuos de leucina (L) por alanina (A) en las posiciones 234 y 235 (según el índice EU) de la cadena pesada (LALA), amidación de un residuo de prolina y delección o ausencia de uno, dos o tres aminoácidos en el carboxilo terminal. En realizaciones específicas, el anticuerpo carece de uno, dos o tres aminoácidos carboxilo-terminales en una o ambas cadenas pesadas, o carece de dos aminoácidos carboxilo-terminales y los residuos de prolina carboxilo-terminales están amidados en una o ambas cadenas pesadas.

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

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

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

En determinadas realizaciones, dos cadenas pesadas del anticuerpo pueden estar compuestas de cualquier tipo de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las cadenas pesadas de longitud completa y las cadenas pesadas del mutante de delección o pueden estar compuestas de la combinación de cualquiera de dos tipos seleccionados de las mismas. La proporción cuantitativa de las cadenas pesadas de las variantes de delección depende del tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo y de las condiciones de cultivo de las células.

En realizaciones específicas, el anticuerpo puede incluir dos cadenas pesadas, ambas de las cuales carecen de un residuo de aminoácido carboxilo-terminal.

En realizaciones específicas, el anticuerpo comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 1 a 446 de SEQ ID NO: 15 o 22 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 1 a 219 de SEQ ID NO: 16. En determinadas realizaciones, el aminoácido en la posición 57 de SEQ ID NO: 15 se selecciona del grupo que consiste en glutamina, alanina, valina, histidina, triptófano, tirosina, lisina y arginina; especialmente glutamina, histidina, triptófano, tirosina, lisina y arginina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 57 de SEQ ID NO: 15 es glutamina, histidina, triptófano, lisina o arginina, en especial glutamina.

En realizaciones específicas, el anticuerpo comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 1 a 446 de SEQ ID NO: 19, y la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos n.º 1 a 219 de SEC ID NO: 16.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo compete por la unión a TA-MUC1 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo tiene las siguientes propiedades: (a) se une específicamente a MUC1, y/o (b) tiene la actividad de ser internalizado en células que expresan MUC1 a través de la unión a MUC1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende al menos una cadena pesada de anticuerpo. Especialmente, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo. En concreto, las cadenas pesadas de anticuerpo comprenden un dominio VH, un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas otras realizaciones, las cadenas pesadas de anticuerpo comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3, pero no comprenden un dominio CH1. En otras realizaciones, uno o más dominios constantes de las cadenas pesadas pueden sustituirse por otros dominios, en concreto dominios similares, tales como, por ejemplo, la albúmina. Las cadenas pesadas de anticuerpo pueden ser de cualquier tipo, incluidas las cadenas γ , α , ϵ , δ y μ , y preferentemente son cadenas

y, incluidas las cadenas $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$, especialmente las cadenas $\gamma 1$. Por lo tanto, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo de tipo IgG, tal como un anticuerpo de tipo IgG1, IgG3 o IgG4, en concreto un anticuerpo de tipo IgG1.

5 En concreto, el anticuerpo comprende además al menos una cadena ligera de anticuerpo, especialmente dos cadenas ligeras de anticuerpo. En concreto, las cadenas ligeras de anticuerpo comprenden un dominio VL y un dominio CL. La cadena ligera del anticuerpo puede ser una cadena κ o una cadena λ y especialmente una cadena κ .

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo. En concreto, 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.

10 En realizaciones alternativas, el anticuerpo no comprende una cadena ligera de anticuerpo. En estas realizaciones, la región variable de cadena ligera puede fusionarse al extremo N-terminal de la región variable de cadena pesada o insertarse en el extremo C-terminal de la región variable de cadena pesada. Puede haber conectores peptídicos para conectar la región variable de cadena ligera con las partes restantes de la cadena pesada.

15 En realizaciones preferidas, el anticuerpo comprende una región Fc. El anticuerpo puede ser en especial un anticuerpo entero, que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una los dominios VH, CH1, una región bisagra, CH2 y CH3, y dos cadenas ligeras que comprenden cada una los dominios VL y CL. El anticuerpo en concreto es capaz de unirse a uno o más receptores de Fcy humanos, especialmente al receptor de Fcy IIIA humano. En realizaciones alternativas, el anticuerpo no se une o no se une significativamente al receptor de Fcy IIIA humano, y especialmente no se une o no se une significativamente a ningún receptor de Fcy humano. En estas realizaciones, el anticuerpo en concreto no comprende un sitio de glucosilación en el dominio CH2.

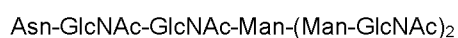
20 En realizaciones alternativas, el anticuerpo no comprende una región Fc. En estas realizaciones, el anticuerpo en concreto es un fragmento de región variable monocatenario (scFv) u otro fragmento de anticuerpo que no comprende una región Fc.

Glucosilación del anticuerpo anti-MUC1

25 El anticuerpo anti-MUC1 puede comprender un dominio CH2 en una o más cadenas pesadas del anticuerpo. Los anticuerpos humanos naturales de tipo IgG incluyen un sitio de N-glucosilación en el dominio CH2. Los dominios CH2 presentes en el anticuerpo pueden o no comprender un sitio de N-glucosilación. En determinadas realizaciones, el anticuerpo no comprende un sitio de glucosilación en el dominio CH2. En concreto, el anticuerpo no comprende un residuo de asparagina en la posición de la cadena pesada correspondiente a la posición 297 según el sistema de numeración IMGT/Eu. Por ejemplo, el anticuerpo puede incluir una mutación Ala297 en la cadena pesada. En estas realizaciones, el anticuerpo preferentemente tiene una capacidad fuertemente reducida o carece completamente de la capacidad de inducir, a través de la unión a receptores de Fcy, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos ("antibody-dependent cellular phagocytosis", ADPCP) y/o citotoxicidad dependiente del complemento ("complement-dependent cytotoxicity", CDC). La capacidad fuertemente reducida a este respecto se refiere en concreto a una reducción del 10 % o menos, especialmente del 3 % o menos, del 1 % o menos o del 0,1 % o menos de actividad en comparación con el mismo anticuerpo que comprende un sitio de N-glucosilación en sus dominios CH2 y que tiene un patrón de glucosilación de mamífero habitual, como los que se obtienen por producción en líneas celulares humanas o en líneas celulares CHO, por ejemplo, un patrón de glucosilación como el descrito en el presente documento. En estas realizaciones, el anticuerpo en concreto es un anticuerpo de tipo IgG1.

35 En realizaciones alternativas, los dominios CH2 presentes en el anticuerpo comprenden un sitio de N-glucosilación. Este sitio de glucosilación en concreto está en una posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 297 de la cadena pesada según el sistema de numeración IMGT/Eu y tiene el motivo de secuencia de aminoácidos Asn Xaa Ser/Thr, en el que Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. La glucosilación N-enlazada en Asn297 se conserva en las IgG de mamíferos, así como en regiones homólogas de otros isotipos de anticuerpos. Debido a aminoácidos adicionales opcionales que pueden estar presentes en la región variable u otras modificaciones de la secuencia, la posición real de este sitio de glucosilación conservado puede variar en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Preferentemente, los glucanos unidos al anticuerpo son estructuras de carbohidratos N-enlazadas de tipo complejo biantenarico, que preferentemente comprenden al menos la siguiente estructura:

50



55 en la que Asn es el residuo de asparagina de la porción polipeptídica del anticuerpo; GlcNAc es N-acetilglucosamina y Man es manosa. Los residuos terminales GlcNAc pueden portar además un residuo de galactosa, que opcionalmente puede portar un residuo de ácido siálico. Otro residuo de GlcNAc (denominado GlcNAc bisecante) puede unirse al

Man más cercano al polipéptido. Una fucosa puede estar unida al GlcNAc unido al Asn. En estas realizaciones, el anticuerpo en concreto es un anticuerpo de tipo IgG1.

5 En realizaciones preferidas, el anticuerpo no comprende ácidos N-glucolíneuramínicos (NeuGc) o cantidades detectables de NeuGc. Además, el anticuerpo preferentemente tampoco comprende epítomos Galili (estructuras Gal α 1,3-Gal) o cantidades detectables del epítopo Galili. En concreto, la cantidad relativa de glucanos que portan estructuras NeuGc y/o Gal α 1,3-Gal es inferior al 0,1 % o incluso inferior al 0,02 % de la cantidad total de glucanos unidos a los dominios CH2 de los anticuerpos en la población de anticuerpos.

10 En concreto, el anticuerpo tiene un patrón de glucosilación humano. Debido a estas propiedades de glucosilación, las estructuras extrañas inmunogénicas no humanas que inducen efectos secundarios están ausentes, lo que significa que se evitan los efectos secundarios no deseados o las desventajas conocidas por ser causadas por determinadas estructuras de azúcar extrañas, tales como los ácidos siálicos inmunogénicos no humanos (NeuGc) o el epítopo Galili (estructuras Gal-Gal), ambos conocidos para los sistemas de producción de roedores, u otras estructuras, tales como las estructuras inmunogénicas de alto contenido en manosa conocidas, por ejemplo, de los sistemas de levadura.

15 En realizaciones específicas, el anticuerpo comprende un patrón de glucosilación que tiene una cantidad detectable de glucanos que portan un residuo GlcNAc bisecante. En concreto, la cantidad relativa de glucanos que portan un residuo GlcNAc bisecante es de al menos el 0,5 %, especialmente de al menos el 1 % de la cantidad total de glucanos unidos a los sitios de glucosilación del anticuerpo en una composición. Además, en determinadas realizaciones, el patrón de glucosilación comprende una cantidad relativa de glucanos que portan al menos un residuo de galactosa de al menos el 25 % de la cantidad total de glucanos unidos al anticuerpo en una composición. En concreto, la cantidad
20 relativa de glucanos que contienen 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 glucanos unidos al anticuerpo en una composición. En realizaciones específicas, el patrón de glucosilación comprende una cantidad relativa de glucanos que contienen al menos un residuo de ácido siálico de al menos el 1 % de la cantidad total de glucanos unidos al anticuerpo en una composición. En concreto, la cantidad relativa de glucanos que contienen al menos un residuo de ácido siálico es de al menos el
25 1,5 %, especialmente al menos el 2 % de la cantidad total de glucanos unidos al anticuerpo en una composición.

30 El anticuerpo puede tener un patrón de glucosilación con una cantidad alta de fucosa central o una cantidad baja de fucosa central. Una cantidad reducida de fucosilación aumenta la capacidad del anticuerpo para inducir ADCC. En determinadas realizaciones, la cantidad relativa de glucanos que portan un residuo de fucosa en el núcleo es del 40 % o menos, especialmente el 30 % o menos o del 20 % o menos de la cantidad total de glucanos unidos al anticuerpo en una composición. En realizaciones alternativas, la cantidad relativa de glucanos que portan un residuo de fucosa en el núcleo es al menos el 60 %, especialmente al menos el 65 % o al menos el 70 % de la cantidad total de glucanos unidos al anticuerpo en una composición.

35 Por medio de la presencia o ausencia del sitio de glucosilación en el dominio CH2 del anticuerpo anti-MUC1 y la presencia o ausencia de fucosa en las estructuras de los glucanos en dicho sitio de glucosilación, se puede controlar la capacidad del anticuerpo para inducir ADCC y la fuerza de dicha inducción de ADCC. La actividad ADCC se incrementa mediante la glucosilación de la parte Fc del anticuerpo y, además, reduciendo la cantidad de fucosilación en dicha glucosilación. En determinadas aplicaciones, es importante el ajuste fino de la actividad ADCC. Por lo tanto, en determinadas situaciones, el anticuerpo sin un sitio de glucosilación en el dominio CH2, el anticuerpo con un sitio de glucosilación en el dominio CH2 y con una alta cantidad de fucosilación, o el anticuerpo con un sitio de glucosilación
40 en el dominio CH2 y con una baja cantidad de fucosilación pueden ser los más ventajosos.

Producción del anticuerpo anti-MUC1

45 El anticuerpo se produce preferentemente de forma recombinante en una célula hospedadora. La célula hospedadora utilizada para la producción del anticuerpo puede ser cualquier célula hospedadora que pueda utilizarse para la producción de anticuerpos. Las células hospedadoras adecuadas son, en concreto, células hospedadoras eucariotas, especialmente células hospedadoras de mamífero. Algunos ejemplos de células hospedadoras incluyen células de levadura, tales como las líneas celulares de *Pichia pastoris*, células de insecto, tales como las líneas celulares SF9 y SF21, células vegetales, células de ave, tales como las líneas celulares de pato EB66, células de roedor, tales como las líneas celulares CHO, NS0, SP2/0 e YB2/0, y células humanas, tales como las líneas celulares HEK293, PER.C6, CAP, CAP-T, AGE1.HN, Mutz-3 y KG1.

50 En determinadas realizaciones, el anticuerpo se produce recombinantemente en una línea celular sanguínea humana, en concreto en una línea celular de leucemia mieloide humana. Las líneas celulares humanas preferidas que pueden utilizarse 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 línea celular de leucemia mieloide humana seleccionada del grupo que consiste en NM-H9D8, NM-H9D8-E6 y NM-H9D8-E6Q12 y líneas celulares derivadas de las mismas. Estas líneas celulares se depositaron con los números de registro
55 DSM ACC2806 (NM-H9D8; depositada el 15 de septiembre de 2006), DSM ACC2807 (NM-H9D8-E6; depositada el 5 de octubre de 2006) y DSM ACC2856 (NM-H9D8-E6Q12; depositada el 8 de agosto de 2007) con arreglo a los requisitos del Tratado de Budapest en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín (DE). Las

5 células NM-H9D8 proporcionan un patrón de glucosilación con un alto grado de sialilación, un alto grado de GlycNAc bisecante, un alto grado de galactosilación y un alto grado de fucosilación. Las células NM-H9D8-E6 y NM-H9D8-E6Q12 proporcionan un patrón de glucosilación similar al de las células NM-H9D8, salvo que el grado de fucosilación es muy bajo. Otras líneas celulares adecuadas son K562, una línea celular de leucemia mieloide humana presente en la American Type Culture Collection (ATCC CCL-243), así como líneas celulares derivadas de las anteriores.

En otras realizaciones, el anticuerpo se produce de forma recombinante en células CHO. Especialmente, el anticuerpo puede producirse de forma recombinante en una línea celular CHO dhfr-, tal como la línea celular de ATCC n.º CRL-9096.

Conjugados del anticuerpo anti-MUC1

10 Según la presente invención, el anticuerpo se conjuga con uno o más agentes citotóxicos. El agente citotóxico puede ser cualquier agente citotóxico adecuado para conjugarse con el anticuerpo. Si hay más de un agente citotóxico presente en el anticuerpo, estos agentes citotóxicos pueden ser idénticos o diferentes, y en concreto son todos idénticos. La conjugación del agente citotóxico con el anticuerpo puede lograrse utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. El agente citotóxico puede estar unido al anticuerpo de forma covalente, en concreto por fusión o acoplamiento químico, o no covalente. En determinadas realizaciones, el agente citotóxico está unido covalentemente al anticuerpo, especialmente a través de un resto de enlace. El resto conector puede ser cualquier entidad química adecuada para unir el agente citotóxico al anticuerpo.

Además del agente citotóxico, el conjugado según la invención puede comprender además otro agente conjugado al mismo. Preferentemente, el agente adicional es útil en la terapia, el diagnóstico, el pronóstico y/o el seguimiento de una enfermedad, en concreto el cáncer. Por ejemplo, el agente adicional puede seleccionarse del grupo formado por radionúclidos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, en especial los que tienen una especificidad diferente a la del anticuerpo anti-MUC1, por ejemplo, anticuerpos de punto de control que bloquean o activan dianas inmunomoduladoras, enzimas, dominios de interacción, marcadores detectables, toxinas, componentes citolíticos, inmunomoduladores, inmunofectores, antígenos MHC de clase I o clase II, y liposomas.

25 Un agente citotóxico preferido en especial es un radionúclido o un agente citotóxico capaz de matar células cancerosas, tal como un agente quimioterapéutico. En determinadas realizaciones preferidas, un agente quimioterapéutico se une al anticuerpo anti-MUC1 formando un conjugado. El agente quimioterapéutico no presenta limitaciones concretas, siempre que el compuesto tenga un efecto antitumoral y tenga un sustituyente o una estructura parcial que pueda conectarse a una estructura conectora. Al escindirse una parte o la totalidad del conector en las células tumorales, se libera el agente quimioterapéutico o el resto de compuesto antitumoral, de modo que el agente quimioterapéutico produce un efecto antitumoral. Al escindirse el conector en una posición de conexión con el agente, el agente quimioterapéutico se libera en su estructura original para ejercer su efecto antitumoral original.

Algunos ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos que pueden conjugarse como agente citotóxico incluyen agentes alquilantes, tales como el cisplatino, antimetabolitos, alcaloides y terpenoides vegetales, alcaloides de la vinca, podofilotoxina, taxanos, tales como el taxol, inhibidores de la topoisomerasa, tales como el irinotecán y el topotecán, antineoplásicos, tales como la doxorubicina o inhibidores microtubulares, tales como la maitansina/maitansinoides.

El agente quimioterapéutico puede seleccionarse en especial 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 dolastatina, una maitansina, un maitansinoide, una amatoxina, una metionina aminopeptidasa, un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor DPPIV, inhibidores del proteasoma, inhibidores de las reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis proteica, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de la quinesina, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de la topoisomerasa I, un agente que daña el ADN, un agente alquilante del ADN, un intercalador del ADN, un ligante del surco menor del ADN, un inhibidor de la DHFR, un inhibidor de la formación de microtúbulos, un estabilizador de microtúbulos, un estabilizador de la actina, un inhibidor de la topoisomerasa II, un compuesto de platino, un inhibidor de ribosomas, un inhibidor de la ARN polimerasa II y una toxina bacteriana. En realizaciones específicas, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de microtúbulos, tal como maitansinoide, un inhibidor de la topoisomerasa I, un agente que daña el ADN, un agente alquilante del ADN y un ligante del surco menor del ADN.

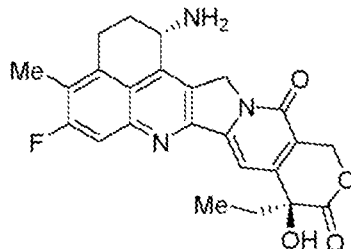
En algunas realizaciones del agente quimioterapéutico, este es una maitansina o maitansinoide. Algunos ejemplos específicos de maitansinoides útiles para la conjugación incluyen maitansinol, N^2 -desacetil- N^2 -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1), N^2 -desacetil- N^2 -(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM3), y N^2 -desacetil- N^2 -(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4). En concreto, DM1 o DM4 se une al anticuerpo anti-MUC1. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un ligante del surco menor del ADN, en concreto pirrolobenzodiazepina (PBD), dímero de pirrolobenzodiazepina (dímero PBD), duocarmicina, duocarmicina-hidroxibenzamida-azaindol (DUBA), seco-duocarmicina-hidroxibenzamida-azaindol (seco-DUBA) o doxorubicina. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un agente alquilante del ADN,

en concreto indolinobenzodiazepina u oxazolidinobenzodiazepina. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un agente que daña el ADN, en concreto caliqueamicina. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de la topoisomerasa I, en concreto camptotecina y sus derivados, tales como 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38), (S)-9-dimetilaminometil-10-hidroxicamptotecina (topotecán), (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-1,2,3,9,12,15-hexahidro-9-hidroxi-4-metil-10H,13H-benzo[de]pirano [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13-diona (exatecán (DX-8951)) y N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]-2-hidroxiacetamida (DXd). En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de la formación de microtúbulos, en concreto una tubulisina, una ansamitocina, una podofilotoxina o una vinblastina. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un estabilizador de microtúbulos, en concreto un paclitaxel o una epotilona. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un estabilizador de la actina, en concreto una falotoxina. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de la topoisomerasa II, en concreto un tenipósido, un XK469, un razoxano, una amsacrina, una idarubicina o una mebarona. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un compuesto de platino, en concreto un cisplatino, un carboplatino, un oxaliplatino, un nedaplatino, un tetranitrato de triplatino, un fenantriplatino, un picoplatino o un satraplatino. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de ribosomas, en concreto una ricina, una saporina, una abrina, una toxina diftérica o una exotoxina A. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es un inhibidor de la ARN polimerasa II, en concreto una amatoxina, tal como, por ejemplo, una amanitina. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico unido al anticuerpo anti-MUC1 es una toxina bacteriana, en concreto una toxina del ántrax. También se describen conjugados de anticuerpo-fármaco adecuados en los documentos EP 16 151 774.3 y LU 92659, a los que se remite explícitamente en el presente documento.

En realizaciones preferidas, el agente quimioterapéutico es (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-1,2,3,9,12,15-hexahidro-9-hidroxi-4-metil-10H,13H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13-diona (exatecán (DX-8951)) o DXd.

El exatecán (DX-8951) es un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:

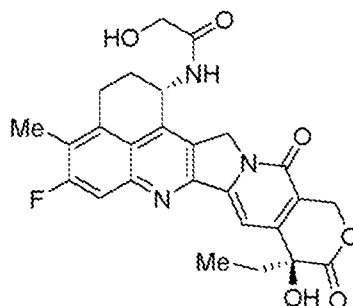
[Fórmula 1]



Los compuestos pueden obtenerse con facilidad mediante, por ejemplo, un procedimiento descrito en la publicación de patente de Estados Unidos n.º US2016/0297890 u otros procedimientos conocidos, y el grupo amino en la posición 1 puede utilizarse preferentemente como posición de conexión a la estructura de enlace. Además, el exatecán puede liberarse en las células tumorales mientras una parte del conector sigue unida él. Sin embargo, el compuesto ejerce un excelente efecto antitumoral incluso en ese estado.

DXd es un compuesto representado por la fórmula siguiente:

[Fórmula 2]



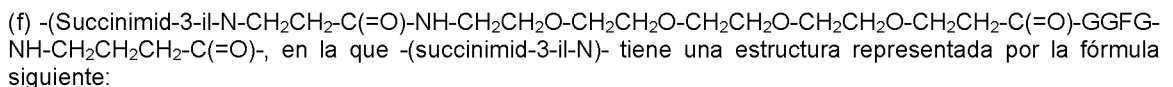
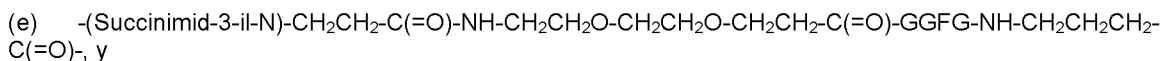
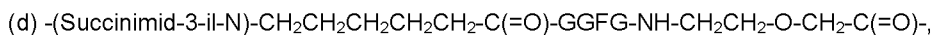
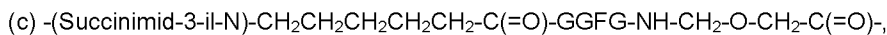
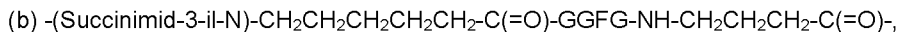
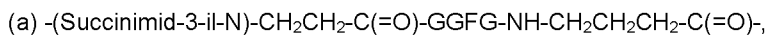
Dado que el exatecán o DXd tiene una estructura de camptotecina, se sabe que el equilibrio se desplaza hacia una estructura con un anillo de lactona formado (anillo cerrado) en un medio acuoso ácido (por ejemplo, del orden de pH 3), mientras que el equilibrio se desplaza hacia una estructura con un anillo de lactona abierto (anillo abierto) en un

medio acuoso básico (por ejemplo, del orden de pH 10). También se espera que un conjugado de fármaco en el que se hayan introducido residuos de exatecán correspondientes a dicha estructura de anillo cerrado y estructura de anillo abierto tenga un efecto antitumoral equivalente, y huelga decir que cualquiera de dichos conjugados de fármaco está incluido en el ámbito de la presente invención. En determinadas realizaciones, el agente adicional es un polipéptido o una proteína. Este polipéptido o proteína puede, en concreto, fusionarse a una cadena polipeptídica del anticuerpo. En determinadas realizaciones, el agente adicional que es un polipéptido o una proteína se fusiona al extremo C-terminal de una cadena ligera del anticuerpo. En las realizaciones en las que el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, se puede fusionar un agente adicional que sea un polipéptido o una proteína al extremo C-terminal de cada una de las dos cadenas ligeras de anticuerpo. En otras realizaciones, el agente adicional que es un polipéptido o una proteína se fusiona al extremo C-terminal de una cadena pesada del anticuerpo. En las realizaciones en las que el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, se puede fusionar un agente adicional que sea un polipéptido o una proteína al extremo C-terminal de cada una de las dos cadenas pesadas de anticuerpo. Los agentes adicionales pueden ser idénticos o diferentes y, en concreto, tener la misma secuencia de aminoácidos. Algunos ejemplos adecuados de tales agentes adicionales que son un polipéptido o una proteína pueden seleccionarse del grupo que consiste en citocinas, quimiocinas, anticuerpos, fragmentos de unión a antígenos, enzimas y dominios de interacción.

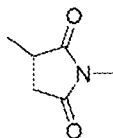
En determinadas realizaciones, el agente adicional que es un polipéptido o una proteína es un anticuerpo de punto de control que bloquea y/o desencadena señales activadoras. Algunos ejemplos de dianas respectivas son CD40, CD3, CD137 (4-1BB), OX40, GITR, CD27, CD278 (ICOS), CD154 (ligando CD40), CD270 (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 inhibitoras, 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 el que un fragmento scFv que se une específicamente a CD3 se fusiona al extremo C-terminal de cada cadena pesada; o en el que un fragmento scFv que se une específicamente a PDL1 se fusiona al extremo C-terminal de cada cadena ligera.

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

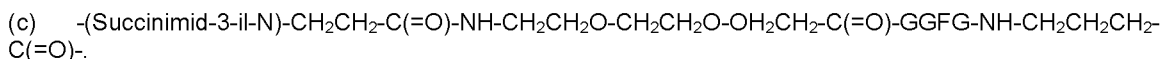
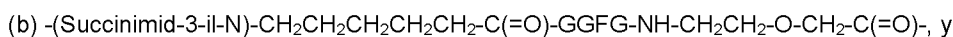
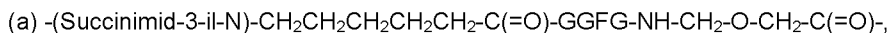
Algunos ejemplos específicos de conectores incluyen las estructuras representadas por cualquiera de las siguientes fórmulas (a) a (f):



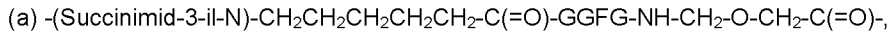
[Fórmula 3]



En realizaciones específicas, los conectores comprenden las estructuras representadas por cualquiera de las siguientes fórmulas (a) a (c):

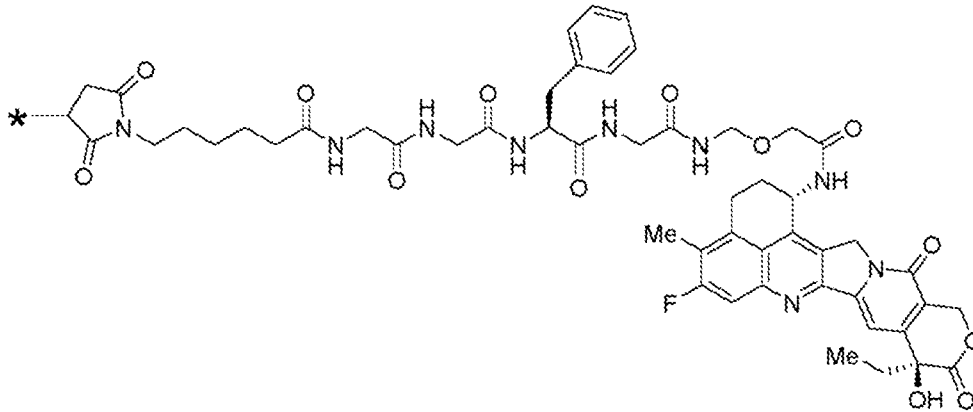


En realizaciones preferidas, los conectores comprenden la estructura representada por cualquiera de las siguientes fórmulas (a):



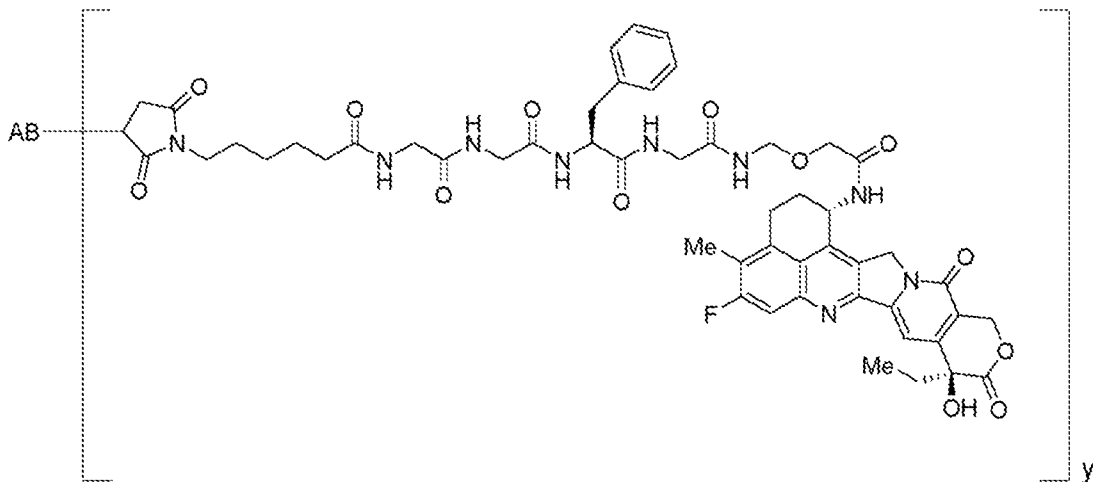
5 En una realización alternativa, el conjugado tiene una estructura de fármaco-conector representada por la siguiente fórmula, en la que el anticuerpo se conjuga con una estructura de fármaco-conector representada por la siguiente fórmula mediante un enlace tioéter. El asterisco* representa el punto de conexión con el anticuerpo:

[Fórmula 4]



10 En una realización preferida, el conjugado tiene una estructura de fármaco-conector representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 5]



15 en la que AB representa el anticuerpo, y y representa un número promedio de unidades de la estructura de fármaco-conector conjugada con el anticuerpo por anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con una estructura de fármaco-conector representada por la fórmula anterior mediante un enlace tioéter, y el anticuerpo representa el anticuerpo anti-MUC1 antes mencionado, siendo preferentemente el anticuerpo cualquiera de las siguientes combinaciones a) a d) de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, o cadena pesada y cadena ligera:

(a) la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12,

20 (b) la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12,

(c) la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16, y

25 (d) la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, y la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16.

En los conjugados mencionados, el número de moléculas de fármaco conjugadas (o agente citotóxico) por molécula de anticuerpo es un factor clave que influye en la eficacia y seguridad del mismo. La producción del conjugado de anticuerpo-fármaco (o de los conjugados) se lleva a cabo especificando las condiciones de reacción, tales como las cantidades de materiales de partida y de reactivos utilizados para la reacción, con el fin de obtener un número constante de moléculas de fármaco conjugadas. A diferencia de la reacción química de un compuesto de bajo peso molecular, suele obtenerse una mezcla que contiene diferentes números de moléculas de fármacos conjugados. El número de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo se define e indica como un valor promedio, es decir, el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas. A menos que se especifique lo contrario, es decir, excepto en el caso de representar un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene un número específico de moléculas de fármaco conjugadas que se incluye en una mezcla de conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene diferentes números de moléculas de fármaco conjugadas, el número de moléculas de fármaco conjugadas según la presente invención también significa un valor promedio como norma. El número de moléculas de exatecán o DXd conjugadas a una molécula de anticuerpo es controlable, y como número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo, pueden conjugarse aproximadamente de 1 a 10 moléculas de exatecán o de 1 a 10 de DXd. El número de moléculas de exatecán o DXd es preferentemente de 2 a 8, más preferentemente de 4 a 8, aún más preferentemente de 7 a 8, y aún más preferentemente de 8. Cabe señalar que un experto en la materia puede diseñar una reacción para conjugar un número requerido de moléculas de fármaco con una molécula de anticuerpo basándose en la descripción de los ejemplos de la presente solicitud, y puede obtener un conjugado de anticuerpo-fármaco con un número controlado de moléculas de exatecán conjugadas.

En la realización preferida anterior, después de que los conjugados son transferidos al interior de las células tumorales, el resto conector es escindido, y entonces el DXd es liberado para ejercer el efecto antitumoral (Clinical Cancer Research, 2016, 15 de octubre; 22(20):5097-5108, Epub 29 de marzo de 2016).

El conjugado marcado con diversos isótopos radiactivos o no radiactivos también se incluye en la presente invención. Uno o más átomos que constituyen el conjugado de la presente invención pueden contener un isótopo atómico en proporción no natural. Algunos ejemplos de isótopos atómicos incluyen deuterio (^2H), tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) y carbono-14 (^{14}C). Además, el conjugado puede estar marcado radiactivamente con un isótopo radiactivo, tal como tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I), carbono-14 (^{14}C), cobre 64 (^{64}Cu), circonio-89 (^{89}Zr), yodo-124 (^{124}I), flúor-18 (^{18}F), indio-111 (^{111}In), carbono-11 (^{11}C) y yodo-131 (^{131}I). El conjugado marcado como un isótopo radiactivo es útil como agente terapéutico o profiláctico, como reactivo de investigación, por ejemplo, como reactivo de ensayo, y como agente de diagnóstico, por ejemplo, como agente de obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo*. Sin estar relacionado con la radiactividad, cualquier tipo de variante isotópica del conjugado está dentro del alcance de la presente invención.

El ácido nucleico, el casete de expresión, el vector, la línea celular y la composición

La parte de anticuerpo del conjugado según la invención puede estar codificada por un ácido nucleico. La secuencia de ácido nucleico de dicho ácido nucleico puede tener cualquier secuencia de nucleótidos adecuada para codificar el anticuerpo. Sin embargo, es preferible que la secuencia del ácido nucleico se adapte, al menos parcialmente, al uso específico de codones de la célula u organismo hospedador en el que se va a expresar el ácido nucleico, en concreto al uso de codones humanos. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN bicatenario o monocatenario, preferentemente ADN bicatenario, tal como ADNc, o ARN monocatenario, tal como ARNm. Puede ser una molécula de ácido nucleico consecutiva o estar compuesta por varias moléculas de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica una parte diferente del anticuerpo. La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de la variante de PankoMab (PM-N54Q) puede estar representada por SEQ ID NO: 17 y la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de la variante de PankoMab (PM-N54Q) puede estar representada por SEQ ID NO: 18.

Si el anticuerpo comprende 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 contenga varias regiones codificantes, y cada una de las cuales codifica una de las cadenas de aminoácidos del anticuerpo, preferentemente separadas por elementos reguladores, tales como elementos IRES, con el fin de 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, y cada una de las cuales codifica una de las cadenas de aminoácidos del anticuerpo. Además de las regiones codificantes que codifican el anticuerpo, el ácido nucleico también puede comprender otras secuencias de ácido nucleico u otras modificaciones que, por ejemplo, pueden codificar otras proteínas, pueden influir en la transcripción y/o traducción de la región o regiones codificantes, pueden influir en la estabilidad u otras propiedades físicas o químicas del ácido nucleico, o pueden no tener ninguna función.

Un casete de expresión o vector puede comprender dicho ácido nucleico y un promotor operativamente conectado con dicho ácido nucleico. Además, el casete de expresión o vector puede comprender otros elementos, en concreto, elementos capaces de influir y/o regular la transcripción y/o traducción del ácido nucleico, la amplificación y/o reproducción del casete de expresión o vector, la integración del casete de expresión o vector en el genoma de una célula hospedadora, y/o el número de copias del casete de expresión o vector en una célula hospedadora. Los casetes de expresión adecuados y los vectores que comprenden los respectivos casetes de expresión para expresar anticuerpos son bien conocidos en la técnica anterior y, por lo tanto, no es necesario describirlos en el presente documento.

Una célula hospedadora puede comprender el ácido nucleico o el casete de expresión o vector. La célula hospedadora puede ser cualquier célula hospedadora. Puede tratarse de una célula aislada o de una célula comprendida en un tejido. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula cultivada, en concreto una célula primaria o una célula de una línea celular establecida, preferentemente una célula derivada de un tumor. Preferentemente, se trata de una célula bacteriana, tal como *E. coli*, una célula de levadura, tal como una célula de *Saccharomyces*, en concreto *S. cerevisiae*, una célula de insecto, tal como una célula Sf9, o una célula de mamífero, en concreto 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, la célula hospedadora se deriva de células de leucemia mieloide humana. Preferentemente, se selecciona entre las siguientes células o líneas celulares: K562, KG1, MUTZ-3 o una célula o línea celular derivada de las mismas, o una mezcla de células o líneas celulares que comprenda al menos una de las células mencionadas. La célula hospedadora se selecciona preferentemente del grupo formado por NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, y una célula o línea celular derivada de cualquiera de dichas células hospedadoras. Estas líneas celulares y sus propiedades se describen detalladamente en la solicitud PCT WO 2008/028686 A2. En otras realizaciones, la célula hospedadora es de una línea celular CHO dhfr, como la línea celular del ATCC n.º CRL-9096. En realizaciones preferidas, la célula hospedadora está optimizada para la expresión de glicoproteínas, en concreto anticuerpos, que tienen un patrón de glucosilación específico. Preferentemente, el uso de codones en la región codificante del ácido nucleico y/o el promotor y los elementos adicionales del casete de expresión o vector son compatibles con el tipo de célula hospedadora utilizada y, más preferentemente, están optimizados para ella. Preferentemente, el anticuerpo es producido por una célula hospedadora o línea celular como se ha descrito anteriormente.

Un procedimiento de producción del anticuerpo puede utilizar células hospedadoras como se describe en el presente documento. El procedimiento en concreto comprende las etapas de proporcionar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y obtener el anticuerpo expresado por la célula hospedadora. El anticuerpo descrito en el presente documento puede obtenerse o se obtiene mediante dicho procedimiento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el conjugado según la invención. Además, la composición puede comprender uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en disolventes, diluyentes y excipientes. Preferentemente, la composición es una composición farmacéutica. En esta realización, los componentes de la composición son preferentemente todos farmacéuticamente aceptables. La composición puede ser sólida o fluida, en concreto una solución, emulsión o suspensión (preferentemente acuosa) o un polvo liofilizado.

Uso en medicina

El conjugado en concreto es útil en medicina, en concreto en terapia, diagnóstico, pronóstico, detección y/o seguimiento de una enfermedad, en concreto una enfermedad como la descrita en el presente documento, preferentemente cáncer, infecciones, enfermedades inflamatorias, enfermedad de injerto contra hospedador e inmunodeficiencias.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona el conjugado o la composición para su uso en medicina. Preferentemente, el uso en medicina es un uso en el tratamiento, pronóstico, diagnóstico, detección y/o seguimiento de una enfermedad tal como, por ejemplo, enfermedades asociadas con un crecimiento celular anómalo, tal como el cáncer, infecciones, tales como infecciones bacterianas, víricas, fúngicas o parasitarias, enfermedades inflamatorias, tales como enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias intestinales, y enfermedades asociadas con una actividad inmunitaria reducida, tales como inmunodeficiencias. En una realización preferida, la enfermedad es el cáncer.

Preferentemente, el cáncer tiene una expresión detectable de MUC1 (TA-MUC1), preferentemente detectable por inmunohistoquímica, ELISA, RIA, ensayo de inmuoabsorción enzimática (ELISPOT), inmunotransferencia por puntos, prueba de Ouchterlony o contraímmunoelectroforesis (CIE), o hibridación *in situ*. Incluye especialmente células que tienen una expresión de MUC1 (TA-MUC1) detectable por inmunohistoquímica o hibridación *in situ*. Antes de la administración del anticuerpo anti-MUC1, puede analizarse el nivel de MUC1 (TA-MUC1) en el cáncer.

La presente invención proporciona además kits y dispositivos que comprenden el conjugado según la invención, y procedimientos asociados que son útiles en el diagnóstico, detección o seguimiento de trastornos asociados a MUC1, tales como el cáncer. En algunas realizaciones, se proporciona un kit ELISA de tipo sándwich para pruebas o diagnóstico que comprende el conjugado de la presente invención. Este kit puede comprender además uno o más de una solución de patrones de proteína MUC1 (TA-MUC1), un reactivo colorante, una solución tampón para la dilución, un anticuerpo para la fase sólida, un anticuerpo para la detección, y una solución de lavado y similares. Preferentemente, la cantidad del conjugado unido al antígeno puede medirse mediante la aplicación de un procedimiento, tal como un procedimiento de absorbancia, fluorescencia, luminiscencia o radioisótopos (RI). Preferentemente, se utiliza en la medición 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.

El anticuerpo puede utilizarse para el análisis inmunohistoquímico (IHC).

La inmunohistoquímica no presenta limitaciones concretas, siempre que este enfoque implique hacer reaccionar una sección de tejido con un anticuerpo de unión a antígeno (anticuerpo primario) y detectar el anticuerpo primario unido con el antígeno.

5 Diferentes formas de cáncer, incluida la metástasis, pueden ser tratadas con el conjugado según la invención. En concreto, el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, tal como el cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides y cáncer urotelial. Además, el cáncer puede seleccionarse en concreto entre el cáncer de estómago, el cáncer de hígado, el
10 cáncer de vejiga, el cáncer de piel, el cáncer de próstata y el cáncer de sangre. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer metastásico. El cáncer puede incluir cualquier tipo de metástasis, tales como metástasis cutáneas, metástasis en ganglios linfáticos, metástasis pulmonares, metástasis hepáticas, metástasis peritoneales, metástasis pleurales y/o metástasis cerebrales. En determinadas realizaciones, el cáncer tiene un fenotipo inflamatorio. En estas realizaciones, cualquiera de los tipos de cáncer descritos anteriormente puede ser un cáncer inflamatorio.

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

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

Los agentes anticancerosos que pueden usarse en combinación con el conjugado pueden seleccionarse de entre cualquier agente quimioterapéutico, en concreto agentes quimioterapéuticos conocidos por ser eficaces para el
35 tratamiento de cánceres positivos a MUC1. El tipo de agente quimioterapéutico también depende del cáncer que se vaya a tratar. El compañero de combinación puede seleccionarse del grupo que consiste en taxanos, tales como paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere) y SB-T-1214; ciclofosfamida; imatinib; pazopanib; capecitabina; citarabina; vinorelbina; gemcitabina; antraciclinas, tales como daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina y mitoxantrona; inhibidores de la aromatasas, tales como aminoglutetimida, testolactona (Teslac), anastrozol (Arimidex), letrozol (Femara), exemestano (Aromasin), vorozol (Rivizor), formestano (Lentaron), fadrozol (Afema), 4-
40 hidroxandrostendiona, 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD) y 4-androsten-3,6,17-triona (6-OXO); inhibidores de topoisomerasas, tales como irinotecán, topotecán, camptotecina, lamelarina D, etopósido (VP-16), tenipósido, doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, amsacrina, elipticinas, ácido aurintricarboxílico y HU-331; agentes quimioterapéuticos a base de platino, tales como cis-diaminodicloroplatino(II) (cisplatino), cis-diamina(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platino(II) (carboplatino) y [(1R,2R)-ciclohexan-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 concreto 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 de los receptores de estrógeno y reductores de los receptores de estrógeno.

Además, también se pueden utilizar anticuerpos terapéuticos como otro compañero de combinación. Puede ser
50 cualquier anticuerpo útil en la terapia del cáncer que sea diferente del anticuerpo anti-MUC1. En concreto, el anticuerpo adicional está aprobado para el tratamiento del cáncer por una administración, tal como la Food and Drug Administration (FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos) de EE. UU., la Agencia Europea del Medicamento (EMA, antes EMEA) y el Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Otros ejemplos del anticuerpo adicional que puede utilizarse para el tratamiento combinado son anticuerpos anti-EGFR, tales como cetuximab,
55 tomuzotuximab, 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, tales como alemtuzumab (Campath); anticuerpos anti-CD30, tales como brentuximab (Adcetris); anticuerpos anti-CD33, tales como gemtuzumab (Mylotarg); y anticuerpos anti-CD20, tales como rituximab (Rituxan, Mabthera), tositumomab (Bexxar) e ibritumomab (Zevalin). Otros ejemplos de anticuerpos adecuados para la combinación con la terapia contra el cáncer descrita en el presente documento incluyen anticuerpos contra
60 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, efrina A4, receptor del factor de

5 crecimiento similar a la insulina 1, cinasa 1 similar al receptor de activina, claudina-6, disialogangliósido GD2, endoglina, glicoproteína transmembrana NMB, CD56, transductor de señales de calcio 2 asociado a tumores, factor tisular, ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3, CD70, P-cadherina, mesotelina, antígeno epitelial de próstata 1 de seis dominios transmembrana (STEAP1), molécula de adhesión celular 5 relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM5), nectina 4, guanilil ciclasa C, miembro 4 de la familia de transportadores de solutos 44 (SLC44A4), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), transportador de cinc ZIP6 (LIV1 (ZIP6)), proteína 6 similar a SLIT y NTRK (SLITRK6), glicoproteína de trofoblastos (TPBG; 5T4), Fyn3, anhidrasa carbónica 9, NaPi2b, extradominio B de fibronectina, receptor de endotelina ETB, VEGFR2 (CD309), tenascina c, colágeno IV y periostina.

10 El conjugado puede combinarse además con anticuerpos de punto de control, es decir, anticuerpos que bloquean o activan dianas inmunomoduladoras. De este modo, pueden bloquearse las señales inhibitoras de una respuesta inmunitaria y/o activarse las señales activadoras. Algunos ejemplos de dianas respectivas son 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 inhibitoras, y sus respectivos ligandos, tales como PDL1.

15 En otras realizaciones, el conjugado puede combinarse 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 el interferón- α , el interferón- β y el interferón- γ , e interleucinas. Entre los factores de crecimiento adecuados se encuentran el G-CSF y el GM-CSF.

20 El conjugado se utiliza preferentemente para el tratamiento de un tumor primario, un tumor recurrente y/o metástasis de dichos tumores, y en concreto se utiliza para el tratamiento antes, durante o después de la cirugía y para la prevención o el tratamiento de metástasis. El conjugado en concreto es para el tratamiento de un paciente como terapia adyuvante. En determinadas realizaciones, el conjugado es para el tratamiento de un paciente como terapia neoadyuvante o en una terapia combinada neoadyuvante-adyuvante. Además, el conjugado es para el tratamiento de un paciente como terapia paliativa.

25 La terapia contra el cáncer con el conjugado da lugar preferentemente a la inhibición del crecimiento tumoral y, en concreto, a la reducción del tamaño del tumor. Además, el tratamiento previene la aparición de nuevas metástasis y/o reduce su número. El tratamiento da lugar preferentemente a un aumento de la supervivencia sin progresión y/o a un aumento de la esperanza de vida y, por tanto, de la supervivencia global.

30 En realizaciones específicas, el cáncer se caracteriza por expresar TA-MUC1. El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de sangre, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, leucemia, seminomas, melanomas, carcinomas, teratomas, linfomas, sarcomas, mesoteliomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer de recto, cáncer suprarrenal, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de oído, nariz y garganta (ORL), cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de útero y sus metástasis.

35 Además, la invención proporciona un procedimiento para diagnosticar, detectar o seguir el cáncer, que comprende la etapa de poner en contacto una muestra de ensayo con un conjugado según la invención.

40 *Procedimientos para aumentar la afinidad de unión a MUC1*

Un procedimiento para aumentar la afinidad de unión a MUC1 de un anticuerpo puede comprender

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

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

50 comprendiendo el procedimiento la etapa de sustituir el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 por cualquier residuo de aminoácido excepto asparagina, dando como resultado una CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 debe aumentarse en concreto 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 determinadas realizaciones, la región variable de cadena pesada del anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 se desea aumentar comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Especialmente, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en especial al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En estas realizaciones, la región variable de cadena pesada todavía comprende CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 8 y 3. Por lo tanto, cualquier desviación de la secuencia respecto a SEQ ID NO: 11 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En determinadas realizaciones, la región variable de cadena ligera del anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 se desea aumentar comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En especial, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, en concreto al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En estas realizaciones, la región variable de cadena ligera todavía comprende CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo tanto, cualquier desviación de la secuencia respecto a SEQ ID NO: 12 se encuentra en las regiones marco, pero no en las CDR. En concreto, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

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

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

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

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

En determinadas realizaciones, la etapa de sustituir el residuo de aminoácido en la posición 8 de CDR-H2 se consigue introduciendo 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 puede hacerse por cualquier procedimiento. Se conocen varios procedimientos adecuados en la técnica y el experto es capaz de realizar las tareas necesarias para introducir la mutación. El anticuerpo con mayor afinidad de unión a MUC1 puede obtenerse expresando el ácido nucleico mutado, por ejemplo, en una célula hospedadora. Los ácidos nucleicos, las células hospedadoras y los procedimientos para producir el anticuerpo se describen en el presente documento y pueden utilizarse para el procedimiento de aumento de la afinidad de unión a MUC1.

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

- (a) proporcionar un ácido nucleico que codifique el anticuerpo cuya afinidad de unión a MUC1 se desea 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 modo que dicho codón codifique cualquier residuo de aminoácido excepto asparagina; y
- (c) expresar el ácido nucleico mutado para producir un anticuerpo con mayor afinidad de unión a MUC1.

Un procedimiento para producir un anticuerpo con mayor afinidad de unión a MUC1 puede comprender:

- (a) proporcionar un ácido nucleico que codifique un anticuerpo que comprenda:

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

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

10 (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 modo que dicho codón codifique cualquier residuo de aminoácido excepto asparagina; y

(c) producir el anticuerpo con mayor afinidad de unión a MUC1 expresando el ácido nucleico mutado en una célula hospedadora.

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

En determinadas realizaciones, el procedimiento de producción de un anticuerpo con mayor afinidad de unión a MUC1 comprende además una etapa (d) de procesamiento del anticuerpo con mayor afinidad de unión a MUC1.

20 Por ejemplo, el procesamiento del anticuerpo con mayor afinidad de unión a MUC1 puede incluir aislar el anticuerpo del cultivo celular. El aislamiento del anticuerpo se refiere en concreto a la separación del anticuerpo de los restantes componentes del cultivo celular. La separación del anticuerpo del medio de cultivo celular puede realizarse, por ejemplo, por procedimientos cromatográficos. Los procedimientos y medios adecuados para aislar anticuerpos son conocidos en la técnica y pueden ser aplicados fácilmente por el experto.

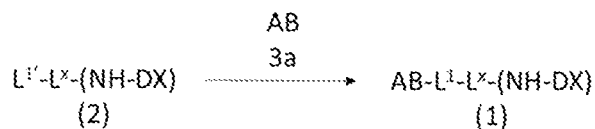
25 El anticuerpo obtenido puede someterse opcionalmente a otras etapas de procesamiento tales como, por ejemplo, etapas de modificación, tales como el acoplamiento químico o enzimático de un agente adicional al anticuerpo y/o etapas de formulación para producir el anticuerpo en la calidad y con la composición deseadas. Estas etapas y procedimientos de procesamiento posterior son generalmente conocidos en la técnica.

30 En otras realizaciones, la etapa (d) comprende además la etapa de proporcionar una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo. Proporcionar una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo o formular el anticuerpo en forma de una composición farmacéutica en concreto 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 concreto, el anticuerpo se transfiere a una composición que sólo comprende ingredientes farmacéuticamente aceptables.

Procedimiento de producción 1

35 El conjugado de anticuerpo-fármaco representado por la fórmula (1) dada a continuación, en el que el anticuerpo está conectado a la estructura conectora a través de un tioéter, puede producirse haciendo reaccionar un anticuerpo que tiene un grupo sulfhidrilo convertido a partir de un enlace disulfuro por la reducción del anticuerpo, con el compuesto (2) que puede obtenerse por un procedimiento conocido (por ejemplo, puede obtenerse por un procedimiento descrito en la bibliografía de publicación de patentes, documento US2016/297890 (por ejemplo, un procedimiento descrito en los párrafos [0336] a [0374]). Este conjugado de anticuerpo-fármaco puede producirse, por ejemplo, por el procedimiento siguiente:

[Fórmula 6]

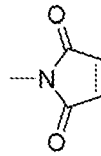


en el que AB representa un anticuerpo con un grupo sulfhidrilo (3a), en el que:

45 L1 tiene una estructura representada por -(succinimid-3-il-N)-, y

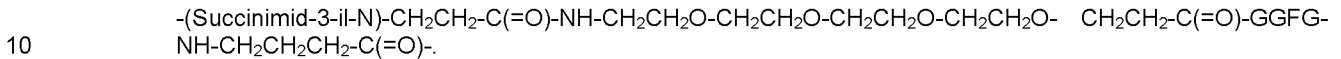
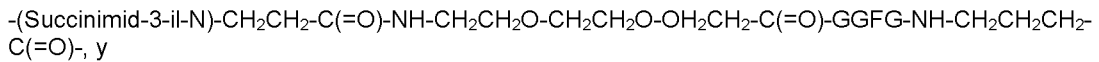
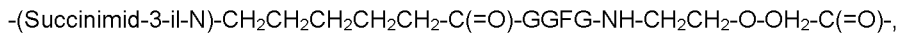
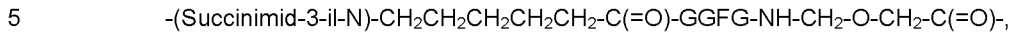
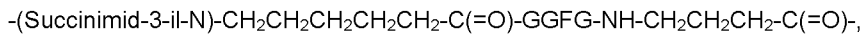
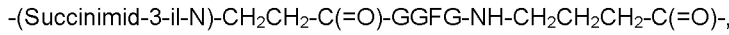
L1' representa un grupo maleimidilo representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 7]

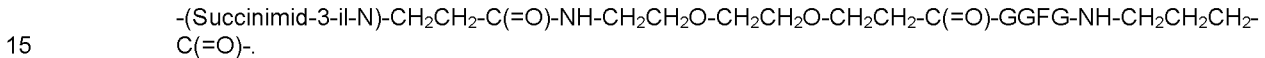
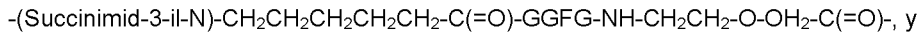
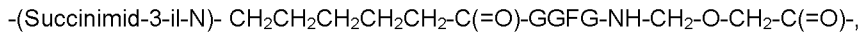


(3)

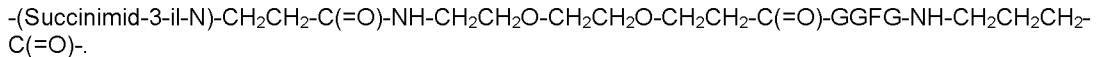
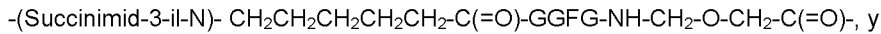
-L1-LX tiene una estructura representada por cualquiera de las siguientes fórmulas:



Entre ellas, las más preferidas son los siguientes:

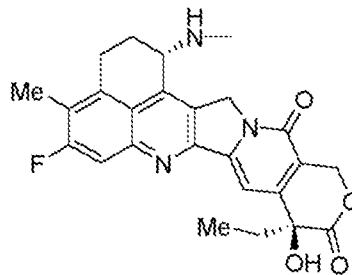


Se prefieren además las siguientes fórmulas:



20 (NH-DX) tiene una estructura representada por la fórmula siguiente:

[Fórmula 8]



25 y representa un grupo derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno del grupo amino en la posición 1 del exatecán. En el esquema de reacción descrito anteriormente (fórmula 8), puede interpretarse que el compuesto de fórmula (1) tiene una estructura en la que un resto estructural del fármaco al extremo terminal del conector está conectada a un anticuerpo. Sin embargo, esta descripción se hace por comodidad, y en realidad hay muchos casos en los que una pluralidad de los restos estructurales antes mencionados están conectados a una molécula de anticuerpo. Lo mismo ocurre con la explicación del procedimiento de producción que se describe a continuación.

30 Específicamente, el conjugado de anticuerpo-fármaco (1) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto (2) que puede obtenerse por un procedimiento conocido (por ejemplo, puede obtenerse por un procedimiento descrito en la bibliografía de publicación de patentes, documento US2016/297890 (por ejemplo, un procedimiento descrito en los párrafos [0336] a [0374])), con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo.

El suministro del grupo sulfhidrilo al anticuerpo (3a) puede realizarse mediante un procedimiento bien conocido por un experto en la materia (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, págs. 56-136, págs. 456-493, Academic Press (1996)). Algunos ejemplos del procedimiento pueden incluir, entre otros: Se hace reaccionar el reactivo de Traut con el grupo amino del anticuerpo; se hacen reaccionar los S-acetiltoalcanoatos de N-succinimidilo con el grupo amino del anticuerpo, seguido de una reacción con hidroxilamina; se hace reaccionar el 3-(piridilditio)propionato de N-succinimidilo con el anticuerpo, seguido de una reacción con un agente reductor; el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor, tal como el ditioneitol, el 2-mercaptoetanol o el clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), para reducir el enlace disulfuro intercatenario en el anticuerpo, a fin de formar un grupo sulfhidrilo.

Específicamente, un anticuerpo con enlaces disulfuro intercatenarios parcial o completamente reducidos puede obtenerse utilizando 0,3 a 3 equivalentes molares de TCEP como agente reductor por enlace disulfuro intercatenario en el anticuerpo, y haciendo reaccionar el agente reductor con el anticuerpo en una solución tampón que contenga un agente quelante. Algunos ejemplos del agente quelante pueden ser el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). El agente quelante se puede utilizar en una concentración de 1 mM a 20 mM. Como solución tampón puede utilizarse una solución de fosfato de sodio, borato de sodio, acetato de sodio o similar. Como ejemplo específico, el anticuerpo (3a) que tiene grupos sulfhidrilo parcial o completamente reducidos puede obtenerse haciendo reaccionar el anticuerpo con TCEP de 4 °C a 37 °C durante 1 a 4 horas.

Cabe señalar que, al llevar a cabo una reacción de adición de un grupo sulfhidrilo a un resto de fármaco-conector, el resto de fármaco-conector puede conjugarse mediante un enlace tioéter.

A continuación, utilizando de 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2) por anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo, se puede producir el conjugado de anticuerpo-fármaco (1) en el que se conjugan de 2 a 8 moléculas de fármaco por anticuerpo. Específicamente, una solución que contiene el compuesto (2) disuelto en ella puede añadirse a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. En este contexto, se puede utilizar como solución tampón una solución de acetato de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio o similares. El pH para la reacción es de 5 a 9, y más preferentemente, la reacción se puede realizar cerca del pH 7. Como disolvente para disolver el compuesto (2) puede utilizarse un disolvente orgánico, tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) o N-metil-2-pirrolidona (NMP). La reacción puede realizarse añadiendo la solución que contiene el compuesto (2) disuelto en el disolvente orgánico del 1 al 20 % v/v a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo. La temperatura de reacción es de 0 a 37 °C, más preferentemente de 10 a 25 °C, y el tiempo de reacción es de 0,5 a 2 horas. La reacción se puede terminar al desactivar la reactividad del compuesto (2) sin reaccionar con un reactivo que contenga un grupo tiol. El reactivo que contiene tiol es, por ejemplo, cisteína o N-acetil-L-cisteína (NAC). Más concretamente, la reacción puede terminarse añadiendo de 1 a 2 equivalentes molares de NAC al compuesto (2) utilizado, e incubando la mezcla obtenida a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.

Identificación del conjugado de anticuerpo-fármaco

El conjugado de anticuerpo-fármaco producido (por ejemplo, el conjugado de anticuerpo-fármaco (1)) puede someterse a concentración, intercambio tampón, purificación y medición de la concentración de anticuerpo y de un número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo según los procedimientos habituales descritos a continuación, para identificar el conjugado de anticuerpo-fármaco (1).

1. Procedimiento habitual A: Concentración de la solución acuosa de anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco.

A un recipiente Amicon Ultra (50.000 MWCO, Millipore Corporation) se le añadió una solución de un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo-fármaco, y la solución del anticuerpo o el conjugado de anticuerpo-fármaco se concentró por centrifugación (centrifugación a 2000 G a 4000 G durante 5 a 30 minutos) utilizando una centrifugadora (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

2. Procedimiento habitual B: Medición de la concentración de anticuerpo

Mediante el uso de detector de UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), se llevó a cabo la medición de la concentración del anticuerpo de acuerdo con el procedimiento definido por el fabricante. A este respecto, se utilizó un coeficiente de absorción a 280 nm que difería entre los anticuerpos (1,3 mlmg⁻¹cm⁻¹ a 1,8 mlmg⁻¹cm⁻¹).

3. Procedimiento habitual C: Intercambio de tampón para anticuerpos

Una columna NAP-25 (n.º de catálogo 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) con el soporte Sephadex G-25 se equilibró con un tampón fosfato (50 mM, pH 6,0) (denominado PBS6,0/EDTA en la presente descripción) que contenía cloruro de sodio (50 mM) y EDTA (2 mM) según el procedimiento definido por el fabricante. Se aplicó una solución acuosa del anticuerpo en una cantidad de 2,5 ml por columna NAP-25 y, a continuación, se recogió una fracción (3,5 ml) eluida con 3,5 ml de PBS6,0/EDTA. Esta fracción se concentró mediante el procedimiento habitual A. Tras medir la concentración del anticuerpo mediante el procedimiento habitual B, la concentración del anticuerpo se ajustó a 20 mg/ml utilizando PBS6,0/EDTA.

4. Procedimiento habitual D: Purificación del conjugado de anticuerpo-fármaco

Se equilibró una columna NAP-25 con cualquier solución tampón disponible en el mercado, tal como una solución tampón acetato con sorbitol (al 5%) (10 mM, pH 5,5; denominada ABS en la presente descripción). Se aplicó una solución de reacción acuosa del conjugado de anticuerpo-fármaco (aproximadamente 2,5 ml) a la columna NAP-25 y, a continuación, se llevó a cabo la elución con la solución tampón en una cantidad definida por el fabricante, a fin de recoger una fracción de anticuerpo. Se repitió un total de 2 o 3 veces un proceso de purificación por filtración en gel, en el que la fracción recogida se aplicó de nuevo a la columna NAP-25, y la elución se llevó a cabo con la solución tampón, para obtener el conjugado de anticuerpo-fármaco excluyendo el fármaco-conector no conjugado y los compuestos de bajo peso molecular (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), N-acetil-L-cisteína (NAC) y dimetilsulfóxido).

5. Procedimiento habitual E: Medición de la concentración de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo

La concentración de fármaco conjugado en el conjugado de anticuerpo-fármaco puede calcularse midiendo la absorbancia de UV de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo-fármaco a dos longitudes de onda de 280 nm y 370 nm, y realizando a continuación el cálculo que se muestra a continuación.

La absorbancia total a cualquier longitud de onda determinada es igual a la suma de la absorbancia de todas las especies químicas absorbentes de luz que están presentes en un sistema [aditividad de la absorbancia]. Por lo tanto, partiendo de la hipótesis de que los coeficientes de absorción molar del anticuerpo y del fármaco no varían antes y después de la conjugación entre el anticuerpo y el fármaco, la concentración de anticuerpo y la concentración de fármaco en el conjugado de anticuerpo-fármaco se representan mediante las siguientes ecuaciones:

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad \text{Ecuación (2)}$$

En las expresiones anteriores, A_{280} representa la absorbancia de una solución acuosa de conjugado de anticuerpo-fármaco a 280 nm, A_{370} representa la absorbancia de una solución acuosa de conjugado de anticuerpo-fármaco a 370 nm, $A_{A,280}$ representa la absorbancia de un anticuerpo a 280 nm, $A_{A,370}$ representa la absorbancia de un anticuerpo a 370 nm, $A_{D,280}$ representa la absorbancia de un precursor de conjugado a 280 nm, $A_{D,370}$ representa la absorbancia de un precursor de conjugado a 370 nm, $\epsilon_{A,280}$ representa el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 280 nm, $\epsilon_{A,370}$ representa el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 370 nm, $\epsilon_{D,280}$ representa el coeficiente de absorción molar de un precursor de conjugado a 280 nm, $\epsilon_{D,370}$ representa el coeficiente de absorción molar de un precursor de conjugado a 370 nm, C_A representa la concentración de anticuerpo en una composición de conjugado de anticuerpo-fármaco, y C_D representa la concentración de fármaco en una composición de conjugado de anticuerpo-fármaco.

En este contexto, con respecto a $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,370}$, se utilizan valores previamente preparados (valores estimados basados en el cálculo o valores medidos obtenidos por la medición de UV de un compuesto). Por ejemplo, $\epsilon_{A,280}$ puede calcularse a partir de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mediante un procedimiento de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\epsilon_{A,370}$ suele ser cero. $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,370}$ pueden obtenerse según la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = Concentración molar \times Coeficiente de absorción molar \times Longitud de la ruta celular) midiendo la absorbancia de una solución en la que el precursor del conjugado utilizado está disuelto a una determinada concentración molar. C_A y C_D pueden determinarse midiendo A_{280} y A_{370} de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo-fármaco, y resolviendo después las ecuaciones simultáneas (1) y (2) por sustitución de estos valores. Además, dividiendo C_D por C_A se puede determinar el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo.

6. Procedimiento habitual F: Medición del número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco - (2)

El número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco también puede determinarse mediante un análisis de cromatografía líquida de alta resolución ("high-performance liquid chromatography", HPLC) utilizando el procedimiento siguiente, además del procedimiento "5" antes mencionado. Procedimiento habitual E". A continuación, se describirá el procedimiento para medir el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas mediante HPLC cuando el anticuerpo está conjugado con el fármaco-conector mediante un enlace disulfuro. Un experto en la materia es capaz de medir adecuadamente el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por HPLC, en función del patrón de conexión entre el anticuerpo y el fármaco-conector, con referencia a este procedimiento.

F-1. Preparación de la muestra utilizada en el análisis por HPLC (reducción del conjugado de anticuerpo-fármaco)

Se mezcla una solución de conjugado de anticuerpo-fármaco (aproximadamente 1 mg/ml, 60 μ l) con una solución acuosa de ditioneitol (DTT) (100 mM, 15 μ l). Al incubar la mezcla a 37 $^{\circ}$ C durante 30 minutos, se rompe el enlace disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada del conjugado de anticuerpo-fármaco. La muestra resultante se utilizó en un análisis por HPLC.

F-2. Análisis HPLC

Se lleva a cabo un análisis por HPLC en las siguientes condiciones de medición.

Sistema HPLC: Sistema HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies)

Detector: Espectrómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm)

5 Columna: ACQUITY UPLC BEH Phenyl (2,1 × 50 mm, 1,7 μm, 130 angstroms; Waters Corp., PIN 186002884)

Temperatura de la columna: 80 °C

Fase móvil A: Solución acuosa que contiene ácido trifluoroacético al 0,10 % (TFA) y 2-propanol al 15 %

Fase móvil B: Solución de acetonitrilo que contiene TFA al 0,075 % y 2-propanol al 15 %

10 Programa de gradiente: 14 %-36 % (0 min-15 min), 36 %-80 % (15 min-17 min), 80 %-14 % (17 min-17,01 min.) y 14 % (17,01 min-25 min)

Inyección de muestras: 10 μl

o

Sistema HPLC: Sistema HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies)

Detector: Espectrómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm).

15 Columna: PLRP-S (2,1 × 50 mm, 8 μm, 1000 angstroms; Agilent Technologies, Inc., PIN PL1912-1802)

Temperatura de la columna: 80 °C

Fase móvil A: solución acuosa de TFA al 0,04 %

Fase móvil B: Solución de acetonitrilo que contiene 0,04% de TFA (v/v)

20 Programa de gradiente: 29 %-36 % (0 min-12,5 min), 36 %-42 % (12,5 min-15 min), 42 %-29 % (15 min-15,1 min) y 29 %-29 % (15,1 min-25 min)

Inyección de muestras: 15 μl

F-3. Análisis de datos

25 F-3-1. La cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo se representan por L_i y H_i , respectivamente, según el número de moléculas de fármaco conjugadas (en los que i representa el número de moléculas de fármaco conjugadas, es decir, el número de moléculas de fármaco conjugadas según la presente invención se representa por L_0 , L_1 , H_0 , H_1 , H_2 , H_3 , etc.).

30 En comparación con las cadenas ligeras (L_0) y pesadas (H_0) de anticuerpo no conjugados, una cadena ligera unida a una molécula de fármaco (L_1), una cadena pesada unida a una molécula de fármaco (H_1), una cadena pesada unida a dos moléculas de fármaco (H_2) y una cadena pesada unida a tres moléculas de fármaco (H_3) presentan una mayor hidrofobicidad en proporción al número de moléculas de fármaco conjugadas y, por lo tanto, tienen un mayor tiempo de retención. Por tanto, estas cadenas eluyen en el orden de L_0 y L_1 o H_0 , H_1 , H_2 y H_3 . Los picos de detección pueden asignarse a cualquiera de L_0 , L_1 , H_0 , H_1 , H_2 y H_3 mediante la comparación de los tiempos de retención con L_0 y H_0 .

35 F-3-2. Dado que el fármaco-conector absorbe la luz ultravioleta, los valores del área del pico se corrigen en función del número de moléculas de fármaco-conector conjugadas de acuerdo con la siguiente expresión, utilizando los coeficientes de absorción molar de la cadena ligera o pesada y del fármaco-conector:

[Expresión 1]

Valor corregido del área del pico del enlace de la cadena ligera i moléculas de fármaco (A_{Li})

$$A_{Li} = \text{Área del pico} \times \frac{\epsilon_{L,280}}{\epsilon_{L,280} + \epsilon_{D,280} \times i}$$

$\epsilon_{L,280}$: Coeficiente de absorción molar de la cadena ligera a 280 nm

40 $\epsilon_{D,280}$: Coeficiente de absorción molar del fármaco-conector a 280 nm

i: El número de moléculas de fármaco conjugadas

[Expresión 2]

Valor corregido del área del pico del enlace de la cadena ligera i moléculas de fármaco (A_{Hi})

$$A_{Hi} = \text{Área del pico} \times \frac{\epsilon_{H,280}}{\epsilon_{H,280} + \epsilon_{D,280} \times i}$$

5 $\epsilon_{H,280}$: Coeficiente de absorción molar de la cadena pesada a 280 nm

$\epsilon_{D,280}$: Coeficiente de absorción molar del fármaco-conector a 280 nm

i: El número de moléculas de fármaco conjugadas

10 En este contexto, un valor estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o de la cadena pesada de cada anticuerpo mediante un procedimiento de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) puede utilizarse como el coeficiente de absorción molar (280 nm) de la cadena ligera o de la cadena pesada del anticuerpo. El coeficiente de absorción molar (280 nm) realmente medido de un compuesto en el que el grupo maleimida se ha convertido en tioéter de succinimida mediante la reacción de cada fármaco-conector con mercaptoetanol o N-acetilcisteína se utilizó como coeficiente de absorción molar (280 nm) del fármaco-conector.

15 La longitud de onda para la medición de la absorbancia puede ser fijada apropiadamente por un experto en la materia, pero preferentemente es una longitud de onda en la que puede medirse el pico del anticuerpo, y más preferentemente 280 nm.

F-3-3. La proporción del área del pico (%) de cada cadena con respecto a un total de valores corregidos de áreas de los picos se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

[Expresión 3]

$$\text{Proporción del área del pico del enlace de cadena ligera a i fármacos} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

20
$$\text{Proporción del área del pico del enlace de cadena pesada a i fármacos} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

F-3-4. El número promedio de fármacos unidos por molécula única de anticuerpo en una composición de conjugado de anticuerpo-fármaco se calculó de acuerdo con la siguiente expresión.:

25 Número promedio de moléculas de fármaco conjugadas = (proporción de área del pico $L_0 \times 0$ + proporción de área del pico $L_1 \times 1$ + proporción de área del pico $H_0 \times 0$ + proporción de área del pico $H_1 \times 1$ + proporción de área del pico $H_2 \times 2$ + proporción de área del pico $H_3 \times 3$)/100 $\times 2$

Cabe señalar que, para asegurar la cantidad del conjugado, puede mezclarse una pluralidad de conjugados que tengan casi el mismo número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (por ejemplo, del orden de ± 1), que se hayan producido en condiciones similares, para preparar un nuevo lote. En este caso, el número promedio de moléculas de fármaco se sitúa entre los números promedio de moléculas de fármaco antes de la mezcla.

30 Figuras

35 La figura 1 muestra las curvas de unión ELISA de los anticuerpos anti-MUC1 a diferentes péptidos MUC1. (A) muestra la unión al antígeno de PankoMab N54Q (PM-N54Q) sin glucosilación de Fab y PankoMab con glucosilación de Fab (PM) al péptido MUC1 con la secuencia epitópica PDTR. La treonina del péptido MUC1 está glucosilada con Tn, sTn, TF o sTF. (B) muestra la unión de PankoMab y PM-N54Q al péptido MUC1 que comprende la variante de secuencia del epítipo PESR. La serina del péptido MUC1 está glucosilada con Tn. (C) muestra la unión de PM-N54Q al péptido MUC1 que comprende la secuencia epitópica PDTR. La treonina del péptido MUC1 está glucosilada con Tn o no está glucosilada. (D) muestra la unión de varias variantes N54X al péptido Tn-PDTR MUC1 en comparación con PankoMab que comprende la glucosilación de Fab diluida a partir de sobrenadante de cultivo celular de células transfectadas transitoriamente. (E) muestra curvas de unión de tres variantes N54X purificadas sin glucosilación de Fab en comparación con PankoMab con glucosilación de Fab en Tn-PDTR, TF-PDTR y péptido PDTR MUC1 no glucosilado. (F) muestra la unión de dos variantes de marco de PM-N54Q al péptido Tn-PDTR MUC1 en comparación con PankoMab con glucosilación de Fab. Para la variante de marco mf-a se mutan nueve aminoácidos en el marco VH y tres en el marco VL, para mf-b también se mutan nueve aminoácidos en el marco VH y cuatro en el marco 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 glucosilado. La señal de unión máxima de diferentes concentraciones de PM-N54Q y PankoMab se representan gráficamente frente a la concentración de anticuerpo.

5 La figura 3 muestra los resultados de la detección de proximidad por fluorescencia en el instrumento DRX. Se muestran las curvas de asociación y disociación. (A) PM con glucosilación de Fab en comparación con (B) PM-N54Q sin glucosilación de Fab

10 La figura 4 muestra un gel de acrilamida SDS de una separación electroforética de PM- N54Q y PankoMab en condiciones no reductoras (izquierda) y reductoras (derecha). Carril 1: PM-N54Q tras la etapa de captura; carril 2: PM-N54Q tras la etapa de refinado; carril 3: PankoMab después de la etapa de captura; carril 4: PankoMab después de la etapa de refinado; carril 5: marcador de peso molecular.

La figura 5 muestra el gel teñido con azul de Coomassie de un ensayo de enfoque isoelectrico con PM-N54Q carente de glucosilación de Fab y PankoMab con glucosilación de Fab. Carril 1: PankoMab con glucosilación de Fab; carril 2: PM-N54Q sin glucosilación de Fab.

15 La figura 6 muestra la unión del anticuerpo anti-MUC1 al receptor Fcγ IIIa. Concentraciones crecientes del anticuerpo PM-N54Q o PankoMab desplazan las esferas aceptoras acopladas a conejo-anti-ratón de las esferas donadoras cargadas con FcγRIIIa, reduciendo así la quimioluminiscencia detectada. En la figura 6A se aplicaron en el ensayo anticuerpos de baja fucosilación y en la figura 6B anticuerpos de alta fucosilación.

20 La figura 7 muestra la unión de los anticuerpos anti-MUC1 PM-N54Q, PM-N54D y PM con glucosilación de Fab a las líneas celulares tumorales (A) CaOV-3 y (B) HSC-4 analizadas por citometría de flujo.

25 La figura 8 muestra la actividad citotóxica de A) hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo y PankoMab-ADC contra líneas celulares de cáncer MDA-MB-468 con expresión de proteínas TA-MUC1, B) hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo y PankoMab-ADC contra líneas celulares de cáncer HCT-15 sin expresión de proteínas TA-MUC1, C) hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo, PankoMab-ADC, PM-N54Q desnudo y PM-N54Q-ADC contra líneas celulares de cáncer NCI-H441 con expresión de proteínas TA-MUC1, D) hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo PankoMab-ADC, PM-N54Q desnudo y PM-N54Q-ADC contra líneas celulares de cáncer HPAC con expresión de proteínas TA-MUC1. Las células se trataron con cada compuesto durante 6 días y la viabilidad celular (%) se calculó mediante el ensayo de ATP. Los datos representan la media ± DE (N = 3).

30 La figura 9 muestra la eficacia antitumoral de hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo y PankoMab-ADC frente a ratones atímicos portadores de MDA-MB-468. El hlgG-ADC de control, el PankoMab desnudo y el PankoMab-ADC en dosis de 3 mg/kg o el vehículo (solución de tampón acetato) se administraron en dosis única por vía intravenosa a ratones atímicos portadores de MDA-MB-468 (N = 6/grupo). Los datos del volumen tumoral estimado representan la media ± EEM. La flecha muestra el momento de la administración. 35 Los volúmenes tumorales estimados a los 21 días de la administración del PankoMab-ADC se compararon con los del grupo de hlgG-ADC de control o con los del grupo tratado con PankoMab desnudo mediante la prueba de la *t* de Student. ****p* < 0,001.

40 La figura 10 muestra la eficacia antitumoral de hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo y PankoMab-ADC frente a ratones atímicos portadores de HCC70. El hlgG-ADC de control, el PankoMab desnudo y el PankoMab-ADC en dosis de 10 mg/kg o el vehículo (solución de tampón acetato) se administraron en dosis única por vía intravenosa a ratones atímicos portadores de HCC70 (N = 6/grupo). Los datos del volumen tumoral estimado representan la media ± EEM. La flecha muestra el momento de la administración. Los volúmenes tumorales estimados a los 21 días de la administración del PankoMab-ADC se compararon con los del grupo de hlgG-ADC de control o tratado con PankoMab desnudo mediante la prueba de la *t* de Student. 45 ****p* < 0,001.

50 La figura 11 muestra la eficacia antitumoral del hlgG-ADC de control, PM-N54Q desnudo, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC frente a ratones atímicos portadores de HPAC. Se administraron hlgG-ADC de control, PM-N54Q desnudo, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC en dosis de 10 mg/kg o vehículo (solución de tampón acetato) en dosis única por vía intravenosa a ratones atímicos portadores de HPAC (N = 6/grupo). Los datos del volumen tumoral estimado representan la media ± EEM. La flecha muestra el momento de la administración. Los volúmenes tumorales estimados a los 21 días de la administración de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC se compararon con los del grupo tratado con hlgG-ADC de control mediante la prueba de Dunnett. ****p* < 0,001.

55 La figura 12 muestra la eficacia antitumoral de hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo, PM-N54Q desnudo, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC frente a ratones atímicos portadores de NCI-H441. El PankoMab desnudo, PM-N54Q desnudo en dosis de 10 mg/kg, hlgG-ADC de control, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC en dosis de 3 mg/kg o vehículo (solución de tampón acetato) se administraron en dosis única por vía intravenosa a ratones atímicos portadores de NCI-H441 (N = 6/grupo). Los datos del volumen tumoral estimado representan

la media \pm EEM. La flecha muestra el momento de la administración. Los volúmenes tumorales estimados a los 31 días de la administración de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC se compararon con los del grupo tratado con hlgG-ADC de control mediante la prueba de Dunnett. *** $p < 0,001$.

5 La figura 13 muestra la eficacia antitumoral de hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo, PM-N54Q desnudo, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC frente a ratones atímicos portadores de OVCAR-5. Se administraron hlgG-ADC de control, PankoMab desnudo, PM-N54Q desnudo, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC en dosis de 10 mg/kg o vehículo (solución de tampón acetato) en dosis única por vía intravenosa a ratones atímicos portadores de OVCAR-5 (N = 6/grupo). Los datos del volumen tumoral estimado representan la media \pm EEM. La flecha muestra el momento de la administración. Los volúmenes tumorales estimados a los 14 días de la administración de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC se compararon con los del grupo tratado con hlgG-ADC de control mediante la prueba de Dunnett. Los volúmenes tumorales estimados a los 14 días después de la administración de PM-N54Q-ADC se compararon con los del grupo tratado con PankoMab-ADC mediante la prueba de la t de Student. *** $p < 0,001$.

15 La figura 14 muestra la eficacia antitumoral de hlgG-ADC de control, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC frente a ratones atímicos portadores de HCT-15. El hlgG-ADC de control, el PankoMab-ADC y el PM-N54Q-ADC a dosis de 10 mg/kg o el vehículo (solución de tampón acetato) se administraron en dosis única por vía intravenosa a ratones atímicos portadores de HCT-15 (N = 6/grupo). Los datos del volumen tumoral estimado representan la media \pm EEM. La flecha muestra el momento de la administración. Los volúmenes tumorales estimados a los 21 días de la administración de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC se compararon con los del grupo tratado con hlgG-ADC de control mediante la prueba de Dunnett. *** $p < 0,001$.

20 La figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado PM N54Q (SEQ ID NO: 15, en la que el aminoácido en la posición 57 es Gln, a saber, SEQ ID NO: 22).

La figura 16 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de los anticuerpos humanizados PM N54Q y PankoMab (SEQ ID NO: 16).

25 La figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado PankoMab (SEQ ID NO: 19).

La figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo quimérico PM N54Q (SEQ ID NO: 20, en la que el aminoácido en la posición 76 es Gln, a saber, SEQ ID NO: 23).

30 La figura 19 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo quimérico PM N54Q (SEQ ID NO: 21).

Ejemplos

Ejemplo 1:

1. Producción de anticuerpos anti-MUC 1

35 La secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del anticuerpo humanizado PankoMab (véase, por ejemplo, el documento WO 2011/012309) se modificó mutando el codón para Asn54 según el sistema de numeración Kabat/Eu (posición de aminoácido 57 en SEQ ID NO: 11) en el codón para cualquier aminoácido excepto Asn, especialmente para Gln.

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

40 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 línea celular derivada de leucemia mieloide humana NM-H9D8 (DSM ACC2806). Los diferentes anticuerpos α MUC1 que comprenden la mutación N54X (PankoMab N54X/PM-N54X, en los que X es cualquier aminoácido excepto N/Asn) o mutaciones de aminoácidos en las secuencias marco de la VH y VL se expresaron en los clones obtenidos, produciendo las construcciones con un patrón de glucosilación humana. La concentración de los anticuerpos α MUC1 en el sobrenadante se determinó por medición con Octet utilizando agujas recubiertas de proteína A o se cuantificaron por absorbancia UV280 tras la purificación por cromatografía de proteína A. Las características de unión de los diferentes anticuerpos α MUC1 se determinaron mediante ELISA de antígeno (véase el ejemplo 2), y los anticuerpos purificados seleccionados también se analizaron mediante análisis de Scatchard (véase el ejemplo 3), mediante Biacore (véase el ejemplo 4a), mediante tecnología DRX² switchSENSE® (véase el ejemplo 4b), o mediante citometría de flujo (ejemplo 7).

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

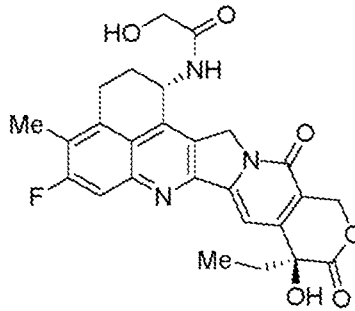
2) Producción del anticuerpo anti-MUC1 en la línea celular CHO

Secuencias codificantes de PM-N54Q (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de PM-N54Q representada por SEQ ID NO: 17 y secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de PM-N54Q) representada por SEQ ID NO: 18), sintetizadas por GeneArt™ de ThermoFisher Scientific, se clonaron en vectores de expresión y los plásmidos resultantes se electrotransfectaron a células CHO. Se utilizaron las células agrupadas cultivadas bajo presión de selección para fabricar el anticuerpo mutante PM-N54Q por medio de los procedimientos generales. El anticuerpo anti-MUC 1 (PM-N54Q) producido en la línea celular CHO se utilizó para los ejemplos 8 y 9.

2. PankoMab-ADC, N54Q-ADC y DXd

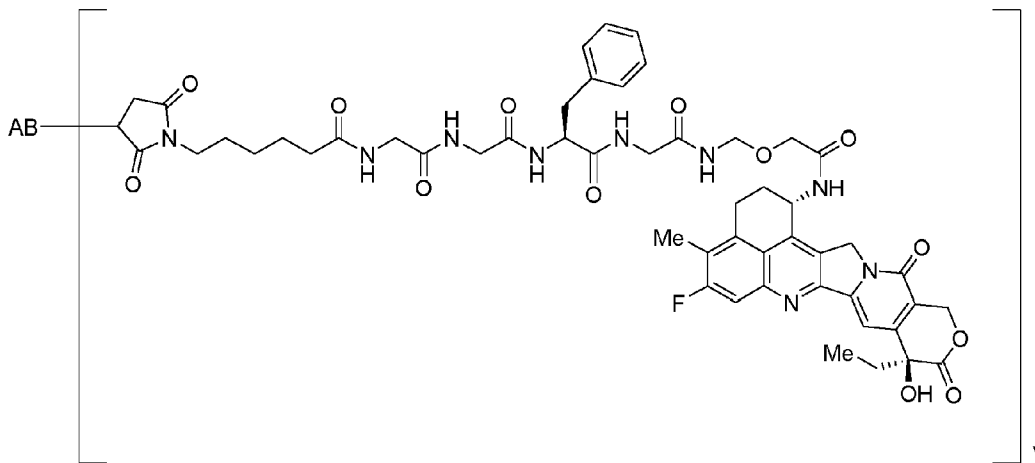
PankoMab-GEX, que se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado anti-TA-MUC1 que comprende un sitio de glucosilación en CDR2-H2 (glucosilación de Fab), y PM-N54Q, que se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado anti-TA-MUC1 que carece de glucosilación de Fab (ejemplo 1-1), PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC se produjeron mediante un procedimiento conocido, tal como en los documentos WO 2014/057687 y WO 2015/115091. El anticuerpo PankoMab-GEX comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 16, por lo que el anticuerpo PankoMab-GEX está unido a un fármaco-conector de fórmula 2. El anticuerpo PM-N54Q mencionado anteriormente comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 16, por lo que el anticuerpo PM-N54Q está unido a un fármaco-conector de fórmula 2:

[Fórmula 2]



Tales estructuras de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC tienen la siguiente fórmula 5: El número de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo es de 4 a 8, es decir, número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (y) por anticuerpo: aproximadamente 8), AB representa PankoMab o PM-N54Q.

[Fórmula 5]



El hlgG-ADC de control estaba compuesto de un anticuerpo monoclonal de control de isotipo IgG1 humanizado, que no se une a células de mamífero, y el mismo fármaco-conector que PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC. La carga activa de ADC (DXd) se produjo mediante un procedimiento conocido, tal como en los documentos WO 2014/057687 y WO 2015/115091.

Ejemplo 2: Antígeno de ELISA

Las características de unión al antígeno de PankoMab N54X, en el que el sitio de N-glucosilación en la parte Fab está eliminado, se comparó con PankoMab que tiene un sitio de N-glucosilación en su parte Fab.

- Se analizaron las características de unión de la versión Fab desglucosilada del anticuerpo específico de MUC1 PankoMab (PM-N54Q) en comparación con el PankoMab-GEX® (glucosilado) utilizando péptidos de repetición en tándem derivados de MUC1 no glucosilados y con diferente glucosilación en estudios ELISA. En principio, ambos anticuerpos muestran la misma gradación mediante la unión a péptidos PDTR glucosilados (APPAHGVTSA PD-T(X)-RPAGSTAPPAHGVTSA) con diferentes glicosilaciones en T: La unión más fuerte se observó con el péptido PDTR portador de una Gal β 1-3GalNAc_{alfa} (TF), seguido de TF sialilada y O-glucosilación GalNAc_{alfa} (Tn). La unión con O-glucosilación GalNAc_{alfa} sialilada (sTn) fue significativamente menor. Al igual que PankoMab-GEX®, PM-N54Q mostró poca afinidad de unión al péptido MUC1 PDTR no glucosilado, lo que indica una especificidad tumoral adecuada (figura 1C).
- 10 Sin embargo, en comparación con PankoMab-GEX® se descubrió una unión cuatro veces mayor para PM-N54Q en el ELISA del antígeno TA-MUC1 usando el glucopéptido biotinilado portador de un O-glucano GalNAc_{alfa} (Tn). PM-N54Q se une unas siete veces mejor al mismo péptido MUC1 cuando se glucosila con GalNAc_{alfa} sialilada (sTn). La unión a Gal β 1-3GalNAc_{alfa} (TF) y TF sialilada (sTF) en la treonina de la secuencia PDTR (figura 1A) fue dos veces mejor para PM-N54Q.
- 15 Ambos anticuerpos muestran una unión fuertemente disminuida a la variante peptídica de MUC1 APPAHGVTSAPE-S(Tn)-RPAGSTAPPAHGVTSA con glucosilación Tn en la serina en comparación con la del péptido PDT(Tn)R. Sin embargo, también aquí el Fab desglucosilado PM-N54Q se une significativamente con más fuerza que PankoMab-GEX® (figura 1B).
- Otras variantes Fab desglucosiladas diferentes de PM-N54X fueron comparadas con PankoMab que tiene una N-glucosilación en su parte Fab. En primer lugar, se compararon todas las variantes directamente a partir del sobrenadante, sin purificación. La concentración se determinó mediante Octet. Todas las variantes de PM-N54X se unieron mejor que PM con Fab glucosilado. Además, se observó una clara tendencia en función de las propiedades químicas de la cadena lateral del aminoácido. Los grupos de ácido carboxílico en la cadena lateral mostraron el menor aumento de la unión. La mejor unión se observó en los aminoácidos con uno o dos nitrógenos (como aminas primarias o secundarias) (figura 1D).
- Además, variantes de Fab desglucosilado seleccionadas (PM-N54H, -W, y -Q) fueron purificadas por cromatografía de proteína A y analizadas en ELISA (figura 1E). La mejora de la unión al péptido TF-MUC1 es aproximadamente de 5 a 8 veces y al péptido Tn-MUC1 de 2 a 3 veces en comparación con PankoMab con glucosilación de Fab, respectivamente.
- 30 Además, se analizaron dos variantes de marco diferentes de la PM-N54Q para la unión al péptido PDTR-MUC1 con glucosilación Tn en ELISA (ver figura 1F). La variante de marco mf-a presenta nueve mutaciones de aminoácidos en el marco de VH y tres en el marco de VL; la variante mf-b presenta también nueve mutaciones de aminoácidos en el marco de VH y cuatro en el marco de VL. Ambas variantes mutadas muestran una unión similar en comparación con el anticuerpo PM-N54Q.
- 35 **Ejemplo 3: Análisis de saturación de anticuerpos anti-MUC1 en 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 en las células tumorales.
- Se evaluó la unión de la versión Fab desglucosilada del anticuerpo específico de MUC1 PankoMab (PM-N54Q) en líneas celulares tumorales humanas positivas a TA-MUC-1 utilizando anticuerpos radiomarcados mediante análisis de unión saturada en las líneas celulares de carcinoma de mama humano ZR-75-1 y MCF-7 en comparación con PankoMab-GEX® Fab glucosilado. Los anticuerpos se quelaron con un exceso molar 12 veces mayor 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 incubación durante la noche a 2-8 °C. El quelante libre se eliminó mediante columnas de desalación y filtración sin salida (corte de 50 kDa, intercambio tampón 6x a PBS). Los anticuerpos quelados se radiomarcaron con ¹¹¹In sin portador (2 μ Ci/ μ g de anticuerpo) durante 1 h a 37 °C en fosfato 6 mM, KCl 1,6 mM, NaCl 80 mM, Na-acetato 0,2 M, HCl 0,1 M. Las preparaciones se neutralizaron añadiendo 8-9 veces el volumen de PBS concentrado 10x. Se añadió aproximadamente 1/50 volumen de suero bovino fetal a la preparación de anticuerpos neutralizados. Se usó un enfoque de unión por célula de 1×10^6 células. Se añadieron varias concentraciones de anticuerpos marcados a las células sedimentadas (30-1000 ng/200 μ l en BSA al 1 %/PBS). Las mezclas de célula-anticuerpo resuspendidas se midieron en un contador gamma y se incubaron 1 h a 4 °C. Las células con anticuerpos unidos se separaron por centrifugación y se lavaron con BSA al 1 %/PBS durante otra hora a 4 °C. A continuación, el sedimento celular se midió para detectar anticuerpos marcados con ¹¹¹In unidos en un contador gamma. La evaluación se realizó mediante "ka específica de un sitio" en GraphPad Prism. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 1. Los datos muestran la alta afinidad y el elevado número de sitios de unión de PM-N54Q en estas células tumorales. La unión fue más de 2,5 veces superior a la de PankoMab-GEX® y también aumentó ligeramente el número de sitios de unión.

Tabla 1: Constante de asociación y sitios de unión al antígeno en células tumorales MUC1*

K_{as} [1/M]	ZR-75-1	MCF-7
PM con Fab gluc.	1,2 × 10 ⁷	3 × 10 ⁷
PM N54Q sin Fab gluc.	3,4 × 10 ⁷	7,8 × 10 ⁷
Sitios de unión	ZR-75-1	MCF-7
PM con Fab gluc.	20 × 10 ⁵	0,6 × 10 ⁵
PM N54Q sin Fab gluc.	30 × 10 ⁵	0,9 × 10 ⁵

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

La unión de la versión Fab desglucosilada del anticuerpo específico de MUC1 PankoMab (PM-N54Q) al péptido glucosilado derivado de TA-MUC-1 se evaluó mediante análisis de resonancia de plasmón de superficie (Biacore). Se recubrió un chip sensor de estreptavidina con péptido TA-MUC1 biotinilado (Tn glucosilado o no glucosilado). PankoMab y PM-N54Q se diluyeron secuencialmente 1:3 de 3600 a 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 ("response units", RU), respectivamente, y se evaluó con GraphPad Prism utilizando la "unión específica de un sitio". La figura 2 muestra las curvas de unión obtenidas con PM-N54Q en comparación con PankoMab-GEX®. Se calcularon afinidades (K_D) de 388 nM y 652 nM para PM-N54Q y PankoMab-GEX®, respectivamente. Por lo tanto, en este entorno experimental se pudo detectar un aumento de la afinidad de casi el doble.

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

Un nuevo procedimiento para determinar las constantes de unión y afinidad es la detección de proximidad por fluorescencia utilizando ADN monocatenario (96mero) dispuesto en gotas 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 produjo un cambio de fluorescencia. Se pueden calcular las tasas de activación y desactivación durante la asociación y la disociación. Debido a su mayor sensibilidad, se pueden seguir interacciones más rápidas en comparación con la resonancia de plasmón de superficie. Esto da lugar a una cinética de unión diferente de la SPR, pero más comparable al procedimiento de "criterio de referencia" KinExA, medido en un sistema líquido.

PankoMab y PM-N54Q se diluyeron 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 las variantes de PankoMab al péptido del antígeno

Variante de PankoMab	K_D
PM con glucosilación de Fab	4,1 nM
PM-N54D	1,9 nM
PM-N54Q	1,6 nM
PM-N54H	0,6 nM

Ejemplo 5: Caracterización bioquímica

Se utiliza SDS-PAGE reductor y no reductor para analizar la pureza y la identidad de un anticuerpo. El patrón de bandas en geles no reductores muestra la banda principal en torno a 160 kDa y artefactos metódicos de cadenas pesadas y ligeras y combinaciones de las mismas (aproximadamente 25, 50-55, 75, 110, 135 kDa). Los geles reductores muestran bandas diferenciadas de cadenas ligeras y pesadas a 25 y 50-55 kDa. Debido a la falta de la

glucosilación de Fab, PM-N54Q tiene una cadena pesada más pequeña, tal como se esperaba (véase la figura 4, derecha).

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

Ejemplo 6: Unión al receptor de Fcγ

Los ensayos de unión al FcγR para FcγRIIIa (CD16a) se basan en la tecnología AlphaScreen® de PerkinElmer. La plataforma AlphaScreen® se basa en una sencilla tecnología basada en esferas de PerkinElmer y es una alternativa más eficaz que el ELISA tradicional, ya que no requiere etapas de lavado.

Para los ensayos de unión al receptor, FcγRIIIa marcado con His (Glycotope GmbH) es capturado por esferas donadoras de Ni-quelato. Los anticuerpos anti-MUC1 y las esferasceptoras acopladas a conejo-anti-ratón compiten por la unión al FcγR. En el caso de la interacción del FcγR con las esferasceptoras unidas a conejo-anti-ratón, las esferas donadora y aceptora se aproximan, lo que conduce, tras la excitación con láser a 680 nm, a la emisión de luz. Se alcanza una señal máxima (señal_{máx}) sin competidor. En caso de competencia, cuando un anticuerpo de ensayo se une al FcγR, la señal_{máx} se reduce de forma dependiente de la concentración. La quimioluminiscencia se cuantificó mediante medición a 520-620 nm (procedimiento AlphaScreen®) utilizando un lector multimarcador EnSpire 2300 (PerkinElmer). Todos los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar de muestras duplicadas. Los datos se evaluaron y calcularon mediante ajuste de curvas no lineal (pendiente de la variable de dosis-respuesta sigmoidal) con el software GraphPad Prism 5. Como resultado, se obtuvo una curva sigmoidal dependiente de la concentración, definida por la meseta superior, la meseta inferior, la pendiente y la CE₅₀.

Tal como se muestra en la figura 6A y B, la afinidad de unión a FcγRIIIa fue comparable para PankoMab N54Q y PankoMab, por lo que en la figura A se aplicaron anticuerpos de baja fucosilación y en la figura B, anticuerpos de alto fucosilación en el ensayo. Por lo tanto, la eliminación de la glucosilación de Fab no afectó a la interacción del anticuerpo con el receptor.

Ejemplo 7: Unión a TA-MUC1 celular

N54Q y N54D fueron expresados transitoriamente y purificados por cromatografía de proteína A. La unión de las dos variantes a TA-MUC1 de la superficie celular se comparó con PM con glucosilación de Fab utilizando dos líneas celulares de carcinoma diferentes. La línea de carcinoma de células escamosas de lengua HSC-4 expresa TA-MUC1 en un grado intermedio y la línea celular de carcinoma de ovario CaOV-3 en un grado alto. Las células tumorales se incubaron con anticuerpos en diluciones seriadas y los anticuerpos unidos se detectaron utilizando un anticuerpo anti-IgG humana de cabra (cadena pesada y ligera) conjugado con ficoeritrina. Se incluyó un control de IgG humana para controlar la tinción de fondo. La unión se analizó mediante citometría de flujo.

Las construcciones analizadas PM, PM-N54Q y PM-N54D muestran una unión fuerte y específica a las células HSC-4 y CaOV-3 que expresan TA-MUC1 en comparación con un control IgG1 humano (figura 7). La unión de PM-N54D a las células CaOV-3 con TA-MUC1^{alto} fue comparable a PM con glucosilación de Fab, mientras que PM-N54Q mostró una unión ligeramente mejor (figura 7A). Usando 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 glucosilación de Fab (figura 7B).

Ejemplo 8: Evaluación de la eficacia *in vitro* de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC

8.1 Líneas celulares

La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468, la línea celular de cáncer de páncreas humano HPAC y la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H441 se utilizaron como células con expresión de TA-MUC1 de intermedia a alta. La línea celular de cáncer colorrectal humano HCT-15 se utilizó como células negativas a TA-MUC1. Estas líneas celulares se adquirieron en ATCC. Cada línea celular se cultivó de acuerdo con un manual de instrucciones. El nivel de expresión de TA-MUC1 en cada línea celular cancerosa se confirmó mediante citometría de flujo.

8.2 Evaluación de la eficacia *in vitro* de PankoMab-ADC

Se preparó una suspensión de MDA-MB-468 para obtener una concentración de $1,25 \times 10^4$ células/ml utilizando medio de cultivo, y se añadió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo negro transparente a 80 ul/pocillo (1000 células/pocillo). Para los pocillos de blanco, se añadió el medio solo a los pocillos a 80 ul/pocillo (N = 3). Todas las células se incubaron durante la noche en las condiciones adecuadas para MDA-MB-468.

Se preparó una suspensión de HCT-15 para obtener una concentración de $3,1 \times 10^3$ células/ml utilizando medio de cultivo, la suspensión se añadió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo negro transparente a 80 ul/pocillo

(250 células/pocillo). Para los pocillos de blanco, se añadió el medio solo a los pocillos a 80 ul/pocillo (N = 3). Todas las células se incubaron durante la noche en las condiciones adecuadas para HCT-15.

Al día siguiente, cada PankoMab desnudo, hlgG-ADC de control y PankoMab-ADC se diluyó 3 veces en serie con cada medio de cultivo de 500 nM a 0,2 nM. Se añadieron 20 microlitros de estas soluciones diluidas a los pocillos correspondientes (concentración final: de 100 nM a 0,04 nM). Para los pocillos de blanco y los no tratados, se añadieron a los pocillos 20 ul de cada medio de cultivo solo. Todas las placas se incubaron durante 6 días en las condiciones adecuadas para cada línea celular.

Tras las incubaciones, se midió la cantidad de ATP en cada pocillo utilizando un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega). La luminiscencia se midió con un contador multimarcaador (ARVO X3, PerkinElmer Japan Co., Ltd.). Este ensayo se realizó por triplicado.

La viabilidad celular de cada muestra se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = 100 \times (T - B)/(C - B)$$

T: intensidad de luminiscencia del pocillo de ensayo

C: intensidad media de luminiscencia de los pocillos no tratados

15 B: intensidad media de luminiscencia de los pocillos de blanco

8.3 Comparación de la eficacia *in vitro* entre PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC

Se preparó una suspensión de HPAC para obtener una concentración de $1,25 \times 10^4$ células/ml utilizando medio de cultivo, y se añadió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo negro transparente a 80 ul/pocillo (1000 células/pocillo). Para los pocillos de blanco, se añadió el medio solo a los pocillos a 80 ul/pocillo (N = 3). Todas las células se incubaron durante la noche en las condiciones adecuadas para HPAC.

Se preparó una suspensión de NCI-H441 para obtener una concentración de $1,25 \times 10^4$ células/ml utilizando medio de cultivo, y se añadió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo negro transparente a 80 ul/pocillo (1000 células/pocillo). Para los pocillos de blanco, se añadió el medio solo a los pocillos a 80 ul/pocillo (N = 3). Todas las células se incubaron durante la noche en las condiciones adecuadas para NCI-H441.

Al día siguiente, cada PankoMab desnudo, PM-N54Q desnudo, hlgG-ADC, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC se diluyó 3 veces en serie con cada medio de cultivo de 500 nM a 0,2 nM. Se añadieron 20 microlitros de estas soluciones diluidas a los pocillos correspondientes (concentración final: de 100 nM a 0,04 nM). Para los pocillos de blanco y los no tratados, se añadieron a los pocillos 20 ul de cada medio de cultivo solo. Todas las placas se incubaron durante 6 días en las condiciones adecuadas para cada línea celular.

Tras las incubaciones, se midió la cantidad de ATP en cada pocillo utilizando un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega). La luminiscencia se midió con un contador multimarcaador (ARVO X3, PerkinElmer Japan Co., Ltd.). Este ensayo se realizó por triplicado.

La viabilidad celular de cada muestra se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = 100 \times (T - B)/(C - B)$$

35 T: intensidad de luminiscencia del pocillo de ensayo

C: intensidad media de luminiscencia de los pocillos no tratados

B: intensidad media de luminiscencia de los pocillos de blanco

La razón de potencia de la actividad citotóxica de PankoMab-ADC frente a PM-N54Q-ADC contra HPAC y NCI-H441 y sus IC del 95 % fueron calculados como análisis *a posteriori* usando un análisis logístico de línea paralela de 3 parámetros (pendiente común) usando EXSUS ver.8.1 (CAC Croit, Tokio, Japón) basado en SAS versión de lanzamiento 9.4 (SAS Institute Japan, Tokio, Japón) (Emáx: 100, Emín: estimación). La diferencia en la potencia de la actividad citotóxica se consideró significativa si el IC del 95 % de la razón de potencia excluía 1.

Ejemplo 9: Evaluación de la eficacia *in vivo* de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC

9.1 Líneas celulares

La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y HCC70, la línea celular de cáncer de páncreas humano HPAC y la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H441 se utilizaron como células tumorales con expresión de TA-MUC1 de intermedia a alta. La línea celular de cáncer colorrectal humano HCT-15 se utilizó como células tumorales negativas a TA-MUC1. Estas líneas celulares se adquirieron en ATCC. La línea celular de cáncer de ovario humano OVCAR-5 se adquirió en el Instituto Nacional del Cáncer y se utilizó como células tumorales con baja

expresión de TA-MUC1. Cada línea celular se cultivó de acuerdo con un manual de instrucciones. El nivel de expresión de TA-MUC1 en cada línea celular cancerosa se confirmó mediante citometría de flujo y tinción IHC.

9.2 Evaluación de la eficacia *in vivo* de PankoMab-ADC

5 Se suspendieron células MDA-MB-468 en Matrigel (BD), y se trasplantaron 1×10^7 células por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón atímico hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 20 (N = 6). Tras el agrupamiento, cada PankoMab desnudo, hlgG-ADC de control o solución PankoMab-ADC se administró en dosis única por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg. Se estableció un grupo de administración de vehículo (solución de tampón acetato) como grupo de control. Tras la administración, se midieron la longitud y la anchura del tumor de cada ratón con el calibrador digital dos veces por semana durante 21 días.

10 Se suspendieron células HCC70 en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y se trasplantaron 1×10^7 células por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón atímico hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 19 (N = 6). Tras el agrupamiento, cada PankoMab desnudo, hlgG-ADC de control o solución PankoMab-ADC se administró en dosis única por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg. Se estableció un grupo de administración de vehículo (solución de tampón acetato) como grupo de control. Tras la administración, se midieron la longitud y la anchura del tumor de cada ratón con el calibrador digital dos veces por semana durante 21 días.

El volumen tumoral estimado de cada ratón se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen tumoral estimado (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{longitud (mm)} \times \text{anchura (mm)}^2$$

20 La inhibición del crecimiento tumoral ("tumor growth inhibition", TGI, %) de cada grupo en el último día de medición de los grupos tratados con vehículo también se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación, y se redondeó a un número entero:

$$\text{TGI (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

T: volumen tumoral medio estimado (mm³) de PankoMab desnudo, hlgG-ADC de control o PankoMab-ADC

C: el volumen tumoral medio estimado (mm³) del grupo tratado con vehículo

25 Para evaluar la eficacia antitumoral de PankoMab-ADC, los volúmenes tumorales de cada ratón en el último día de medición de los grupos tratados con PankoMab-ADC (MDA-MB-468: día 41, HCC70: día 40) se compararon con las de los grupos tratados con hlgG-ADC de control o con las del grupo tratado con PankoMab desnudo mediante la prueba de la *t* de Student. Todos los análisis estadísticos se realizaron como análisis *a posteriori* utilizando SAS System versión de lanzamiento 9.2 (SAS Institute Inc.). Un valor de *p* inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

30 9.3 Comparación de la eficacia *in vivo* de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC

35 Se suspendieron células HPAC en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y se trasplantaron 3×10^6 células por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón atímico hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 11 (N = 6). Tras el agrupamiento, cada solución de PM-N54Q desnudo, hlgG-ADC de control, PankoMab-ADC o PM-N54Q-ADC se administró por vía intravenosa en dosis única de 10 mg/kg. Se estableció un grupo de administración de vehículo (solución de tampón acetato) como grupo de control. Tras la administración, se midieron la longitud y la anchura del tumor de cada ratón con el calibrador digital dos veces por semana durante 21 días.

40 Se suspendieron células NCI-H441 en Matrigel (BD), y se trasplantaron 5×10^6 células por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón atímico hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 7 (N = 6). Tras la agrupación, cada solución de PankoMab desnudo o PM-N54Q desnudo se administró en una dosis única por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg, y la solución de control de hlgG-ADC, PankoMab-ADC o PM-N54Q-ADC se administró en una dosis única por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg. Se estableció un grupo de administración de vehículo (solución de tampón acetato) como grupo de control. Tras la administración, se midieron la longitud y la anchura del tumor de cada ratón con el calibrador digital dos veces por semana durante 31 días.

45 Se suspendieron células OVCAR-5 en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y se trasplantaron 5×10^6 células por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón atímico hembra (día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el día 12 (N = 6). Tras el agrupamiento, se administró por vía intravenosa una dosis única de PankoMab desnudo, PM-N54Q desnudo, hlgG-ADC de control, PankoMab-ADC o PM-N54Q-ADC de control a una dosis de 10 mg/kg. Se estableció un grupo de administración de vehículo (solución de tampón acetato) como grupo de control. Tras la administración, se midieron la longitud y la anchura del tumor de cada ratón con el calibrador digital dos veces por semana durante 21 días.

50 Se suspendieron células HCT-15 en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y se trasplantaron 5×10^6 células por vía subcutánea al lado derecho del cuerpo de cada ratón atímico hembra (día 0), y los ratones se

agruparon aleatoriamente el día 10 (N = 6). Tras el agrupamiento, se administró por vía intravenosa una dosis única de 10 mg/kg de la solución de hlgG-ADC de control, PankoMab-ADC o PM-N54Q-ADC. Se estableció un grupo de administración de vehículo (solución de tampón acetato) como grupo de control. Tras la administración, se midieron la longitud y la anchura del tumor de cada ratón con el calibrador digital dos veces por semana durante 21 días.

5 El volumen tumoral de cada ratón se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen tumoral estimado (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{longitud (mm)} \times \text{anchura (mm)}^2$$

La inhibición del crecimiento tumoral (TGI, %) de cada ratón en el último día de medición de los grupos tratados con vehículo o el último día en que todos los grupos están vivos también se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación, y se redondeó a un número entero:

10
$$\text{TGI (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

T: el volumen tumoral medio estimado (mm^3) de PankoMab desnudo, PM-N54Q desnudo, hlgG-ADC de control, PankoMab-ADC o PM-N54Q-ADC

C: el volumen tumoral medio estimado (mm^3) del grupo tratado con vehículo

15 Para evaluar la eficacia antitumoral de cada compuesto frente a los ratones portadores de HPAC, NCI-H441, OVCAR-5 y HCT-15, los volúmenes tumorales de cada ratón en el último día de medición de los grupos tratados con hlgG-ADC de control (HPAC: día 32, NCI-H441: día 38, HCT-15: día 32) o el último día en que todos los grupos estaban vivos (OVCAR-5: día 26) se compararon con las de los grupos de control tratados con hlgG-ADC mediante la prueba de Dunnett. Además, los volúmenes tumorales de los ratones atímicos portadores de OVCAR-5 en el día 33 se compararon mediante la prueba de la *t* de Student entre los grupos tratados con PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC.
20 Todos los análisis estadísticos se realizaron como análisis *a posteriori* utilizando SAS System versión de lanzamiento 9.2 (SAS Institute Inc.). Un valor de *p* inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 10: Resultados

10.1 Actividad citotóxica de PankoMab-ADC contra líneas celulares de cáncer positivas a TA-MUC1 y células negativas *in vitro*

25 Para investigar si PankoMab-ADC muestra actividad citotóxica dependiente de la diana y del fármaco contra líneas celulares de cáncer humano, se evaluó la eficacia *in vitro* de PankoMab desnudo, hlgG-ADC de control y PankoMab-ADC contra las células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 (positivo a TA-MUC1) y las células de cáncer colorrectal humano HCT-15 (negativo a TA-MUC1). Tal como se muestra en la figura 8, PankoMab desnudo y hlgG-ADC mostraron poca actividad contra cada línea celular ($\text{CI}_{50} > 100$ nM). En estas condiciones, PankoMab-ADC
30 mostró una actividad citotóxica dependiente de la dosis contra las células MDA-MB-468 positivas a TA-MUC1 (figura 8A, $\text{CI}_{50} < 10$ nM), pero no mostró actividad contra las células HCT-15 negativas a TA-MUC1 (figura 8B, $\text{CI}_{50} > 100$ nM). Basándose en estos resultados, se concluyó que PankoMab-ADC muestra una citotoxicidad dependiente de la diana y del fármaco contra las líneas celulares de cáncer positivas a TA-MUC1 *in vitro*.

35 10.2 Comparación de la actividad citotóxica *in vitro* entre PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC contra células positivas a TA-MUC1 *in vitro*

Para investigar si la mejora de la afinidad de unión al antígeno puede contribuir a la mejora de la actividad citotóxica, se evaluó la eficacia *in vitro* de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC contra la línea celular de cáncer de páncreas humano HPAC y la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H441. La actividad citotóxica de PM-N54Q-ADC contra éstas fue más de 1,5 veces más potente que la de PankoMab-ADC (figura 8C y figura 8D). La razón de potencia de PM-N54Q-ADC frente a PankoMab-ADC contra HPAC fue de 1,917 (1,611-2,280, IC del 95 %), y la razón de potencia contra NCI-H441 fue de 1,663 (de 1,495 a 1,849, IC del 95 % en CE_{50}). Estos datos demostraron que la actividad citotóxica de PM-N54Q-ADC es significativamente más potente que la de PankoMab-ADC. Estos resultados sugieren que la mejora de la afinidad de unión al antígeno de PankoMab-ADC puede contribuir a una mejora significativa de la actividad de destrucción celular.

45 10.3 Eficacia antitumoral de PankoMab-ADC contra un tumor positivo a TA-MUC1

Para investigar si PankoMab-ADC muestra eficacia no solo *in vitro* sino también *in vivo*, se evaluó la eficacia antitumoral de PankoMab desnudo, hlgG-ADC de control y PankoMab-ADC frente a ratones portadores de MDA-MB-468. Como se muestra en la figura 9, el PankoMab desnudo y el IgG-ADC de control (3 mg/kg, administración única) no mostraron eficacia antitumoral (ambas TGI fueron del -18 % en el día 41). Por el contrario, PankoMab-ADC (3 mg/kg, administración única) inhibió notablemente el crecimiento tumoral (la TGI fue del 97 % en el día 41). Además, mostró una eficacia antitumoral significativa en comparación con el hlgG-ADC de control y el PankoMab desnudo (ambos de $p < 0,001$ en el día 41). En cuanto al cambio de peso corporal, no se observó ninguna pérdida de peso corporal causada por el tratamiento farmacológico en todos los grupos tratados con fármacos.

También se evaluó la eficacia antitumoral de PankoMab desnudo, hlgG-ADC de control y PankoMab-ADC frente a ratones portadores de HCC70. Tal como se muestra en la figura 10, PankoMab desnudo y el hlgG-ADC de control (10 mg/kg, administración única) mostraron una débil eficacia antitumoral contra estos modelos de xenoinjerto (la TGI fue del 10 % y del 29 % en el día 40, respectivamente). Por el contrario, PankoMab-ADC (10 mg/kg, administración única) inhibió notablemente el crecimiento tumoral (la TGI fue del 95 % en el día 40). Además, mostró una eficacia antitumoral estadísticamente significativa en comparación con el hlgG-ADC de control (ambos de $p < 0,001$ en el día 40). En cuanto al cambio de peso corporal, no se observó ninguna pérdida de peso corporal causada por el tratamiento farmacológico en todos los grupos tratados con fármacos. Estos resultados sugieren que PankoMab-ADC tiene una fuerte eficacia antitumoral y mostró una eficacia antitumoral dependiente de la diana y del fármaco contra varios modelos de xenoinjerto TA-MUC1 positivos.

10.4 Comparación de la eficacia antitumoral entre PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC contra un tumor positivo a TA-MUC1 *in vivo*

Para investigar si PM-N54Q-ADC tiene igual o mayor eficacia antitumoral contra células tumorales positivas a TA-MUC1 que PankoMab-ADC, se comparó la eficacia antitumoral de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC contra varios tipos de células tumorales positivas a TA-MUC1.

Al principio, se evaluó la eficacia *in vivo* contra las células tumorales HPAC y NCI-H441 con expresión de TA-MUC1 de intermedia a alta. Como se muestra en la figura 11, el PM-N54Q desnudo y el hlgG-ADC de control (10 mg/kg, administración única) mostraron una débil eficacia antitumoral contra los ratones portadores de HPAC (la TGI fue del 27 % y del 18 % en el día 32, respectivamente). Por el contrario, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC (10 mg/kg, administración única) inhibieron notablemente el crecimiento tumoral (ambas TGI fueron del 93 % en el día 32). Además, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC (10 mg/kg, administración única) mostraron una eficacia antitumoral estadísticamente significativa en comparación con el hlgG-ADC de control (ambos de $p < 0,001$ en el día 32). En cuanto al cambio de peso corporal, no se observó ninguna pérdida de peso corporal causada por el tratamiento farmacológico en todos los grupos tratados con fármacos.

Tal como se muestra en la figura 12, PankoMab desnudo y PM-N54Q desnudo (10 mg/kg, administración única) mostraron una débil eficacia antitumoral frente a ratones portadores de NCI-H441 (la TGI fue del 8 % y del 12 % en el día 38, respectivamente). Aunque el grupo tratado con hlgG-ADC de control (3 mg/kg, administración única) mostró eficacia antitumoral durante las dos semanas siguientes a la administración, se observó un rebrote tumoral después del día 21 (la TGI fue del 71 % en el día 38). Por el contrario, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC (3 mg/kg, administración única) inhibieron notablemente el crecimiento tumoral (ambas TGI fueron del 99 % en el día 38). Además, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC mostraron una eficacia antitumoral estadísticamente significativa en comparación con el hlgG-ADC de control ($p < 0,001$ en el día 38, respectivamente). En cuanto al cambio de peso corporal, no se observó ninguna pérdida de peso corporal causada por el tratamiento farmacológico en todos los grupos tratados con fármacos.

A continuación, se evaluó la eficacia *in vivo* contra células tumorales OVCAR-5 con expresión baja de TA-MUC1. Tal como se muestra en la figura 13, PankoMab desnudo, PM-N54Q y el hlgG-ADC de control (10 mg/kg, administración única) mostraron poca eficacia antitumoral contra los ratones portadores de OVCAR5 (la TGI fue del 1 %, del 11 % y del 3 % en el día 26, respectivamente). En este modelo, la eficacia antitumoral de PankoMab-ADC (10 mg/kg, administración única) fue limitada (la TGI fue del 37 % en el día 26), pero PM-N54Q-ADC (10 mg/kg, administración única) mostró una fuerte eficacia antitumoral (la TGI fue del 73 % en el día 26). Además, PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC mostraron una eficacia antitumoral estadísticamente significativa en comparación con el hlgG-ADC de control ($p = 0,01$ y $p < 0,001$ en el día 26, respectivamente). Además, PM-N54Q-ADC mostró una eficacia antitumoral estadísticamente significativa en comparación con PankoMab-ADC ($p < 0,001$ en el día 26). En cuanto al cambio de peso corporal, no se observó ninguna pérdida de peso corporal causada por el tratamiento farmacológico en todos los grupos tratados con fármacos.

Por último, se evaluó la eficacia *in vivo* contra células tumorales HCT-15 que eran negativas a TA-MUC1.

Tal como se muestra en la figura 14, PankoMab desnudo y PM-N54Q (10 mg/kg, administración única) mostraron poca eficacia antitumoral contra este modelo (la TGI fue del 7 %, del 4 % en el día 32, respectivamente). Además, PankoMab-ADC, PM-N54Q-ADC y el hlgG-ADC de control también mostraron poca eficacia antitumoral frente a este modelo (la TGI fue del 15 %, del 22 % y del 26 % en el día 32, respectivamente).

En base a estos resultados, se concluyó que la eficacia antitumoral de PankoMab-ADC y PM-N54Q-ADC es dependiente de la diana y del fármaco. Además, la mejora de la afinidad de unión al antígeno puede contribuir a aumentar la eficacia antitumoral contra las células tumorales positivas a TA-MUC1.

Identificación del material biológico depositado

Las líneas celulares DSM ACC 2806, DSM ACC 2807 y DSM ACC 2856 fueron depositadas en el DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE) en las fechas indicadas en la tabla siguiente.

ES 2 980 468 T3

Nombre de la línea celular	Número de registro	Depositante	Fecha del 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

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, en el que el anticuerpo es capaz de unirse a MUC1 o TA-MUC1, y en el que el anticuerpo comprende:

5 (i) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR-H1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y

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

en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 2 se selecciona del grupo que consiste en glutamina, histidina, triptófano, tirosina, lisina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico, o en el que la CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

2. El conjugado según la reivindicación 1, en el que:

15 (i) la región variable de cadena pesada del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, o la región variable de cadena pesada del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y/o

20 (ii) la región variable de cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o

(iii) la región variable de cadena pesada del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

25 3. El conjugado según la reivindicación 1 o 2, en el que la cadena pesada del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, en concreto SEQ ID NO: 22, y la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

4. El conjugado según la reivindicación 1, en el que:

30 (i) la región variable de cadena pesada del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y/o

(ii) la región variable de cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos un 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

35 5. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo comprende una región Fc y preferentemente es un anticuerpo de tipo IgG1, IgG2 o IgG4.

6. El conjugado según las reivindicaciones 3 o 5, en el que el anticuerpo comprende un patrón de glucosilación que tiene una o más de las siguientes características:

(i) una cantidad detectable de glucanos que portan un residuo de GlcNAc bisecante;

40 (ii) una cantidad relativa de glucanos que portan al menos un residuo de galactosa de al menos el 25 % de la cantidad total de glucanos unidos a los sitios de glucosilación de Fc del anticuerpo en una composición.

7. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo se puede obtener por producción en una célula de mamífero, preferentemente en el que el anticuerpo se puede obtener por producción en una línea 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 líneas celulares derivadas de las mismas o en una línea celular CHO y líneas celulares derivadas de la misma.

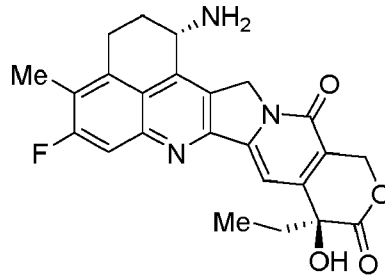
8. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo se puede obtener mediante un procedimiento de producción que comprende las etapas de (i) proporcionar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, (ii) cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y (iii) obtener el anticuerpo expresado por la célula hospedadora.

9. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo compite con el anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, o el anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y una región variable de

5 10. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo tiene la actividad de ser internalizado en células que expresan MUC1 o TA-MUC1 mediante la unión a MUC-1 o TA-MUC1.

11. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el agente citotóxico es un agente antitumoral, preferentemente un agente quimioterapéutico, aún preferentemente en el que el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de microtúbulos, un inhibidor de topoisomerasa I, un agente que daña el ADN, un agente alquilante del ADN y un ligante del surco menor del ADN, preferentemente un inhibidor de topoisomerasa I, y más preferentemente en el que el inhibidor de topoisomerasa I es un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]



15 12. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo se conjuga con el agente citotóxico o compuesto antitumoral mediante un conector que tiene cualquier estructura seleccionada del grupo que consiste en las siguientes fórmulas (a) a (f):

(a) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

20 (b) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

(c) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

(d) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

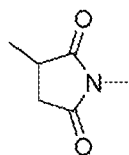
(e) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-, y

25 (f) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

30 en el que el anticuerpo está conectado al extremo terminal de -(Succinimid-3-il-N), el agente citotóxico o compuesto antitumoral está conectado al grupo carbonilo en el extremo derecho de las fórmulas (a) a (f) con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como posición de conexión, GGFG representa una secuencia de aminoácidos que consiste en glicina-glicina-fenilalanina-glicina unida mediante enlaces peptídicos, y

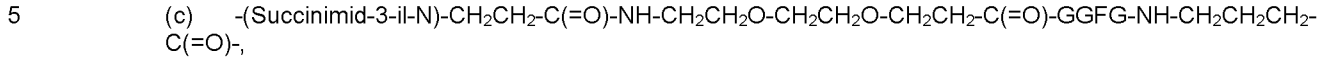
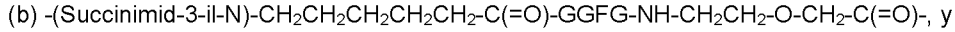
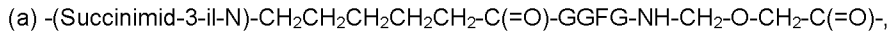
-(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 2]

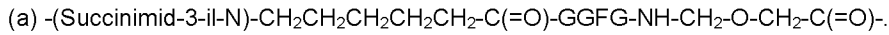


35 que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura del conector que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

preferentemente en la que el conector está representado por cualquier fórmula seleccionada del grupo que consiste en las siguientes fórmulas (a) a (c):

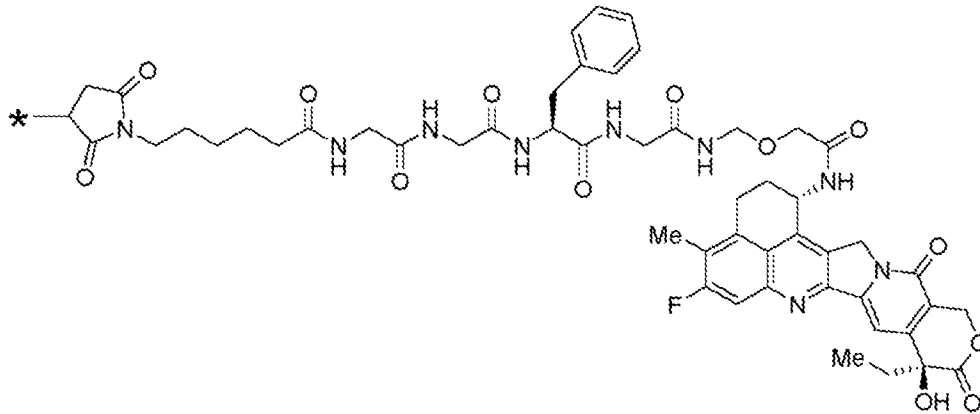


preferentemente en el que el conector está representado por la siguiente fórmula (a):



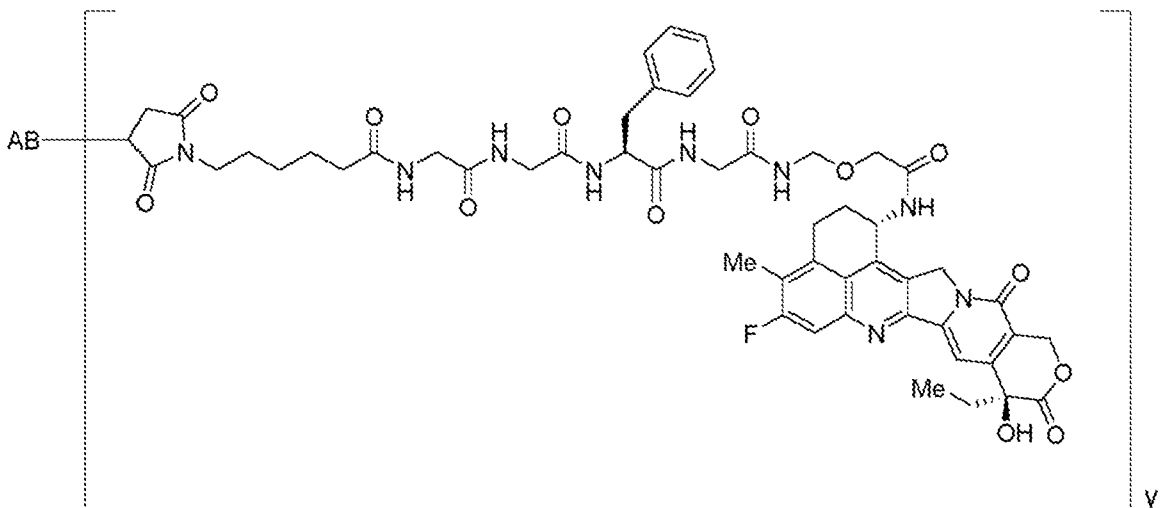
10 13. El conjugado según las reivindicaciones 11 o 12, en el que el anticuerpo se conjuga con un fármaco-conector representado por la siguiente fórmula (en la que el asterisco* representa el punto de conexión con el anticuerpo) mediante un enlace tioéter:

[Fórmula 3]



14. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que está representado por la siguiente fórmula:

15 [Fórmula 4]



en la que AB representa el anticuerpo del mismo, y representa un número promedio de unidades de la estructura de fármaco-conector conjugada al anticuerpo por sí misma, y el anticuerpo está conjugado a un fármaco-conector representado por la fórmula anterior mediante un enlace tioéter.

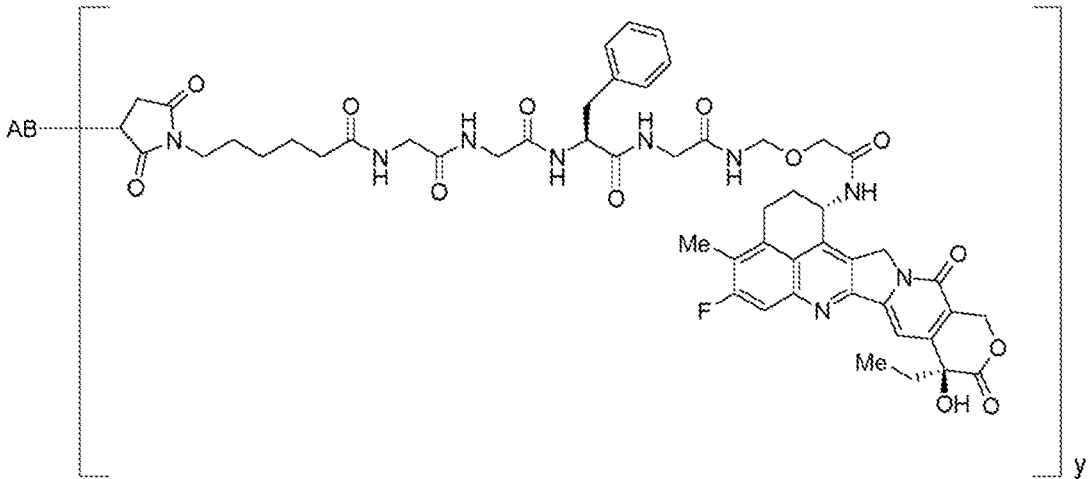
20 15. El conjugado según la reivindicación 13 o 14, en el que el anticuerpo comprende cualquiera de las siguientes combinaciones a) a b) de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, o cadena pesada y cadena ligera:

(a) la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y

(b) la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16.

5 16. Un conjugado, que está representado por la siguiente fórmula:

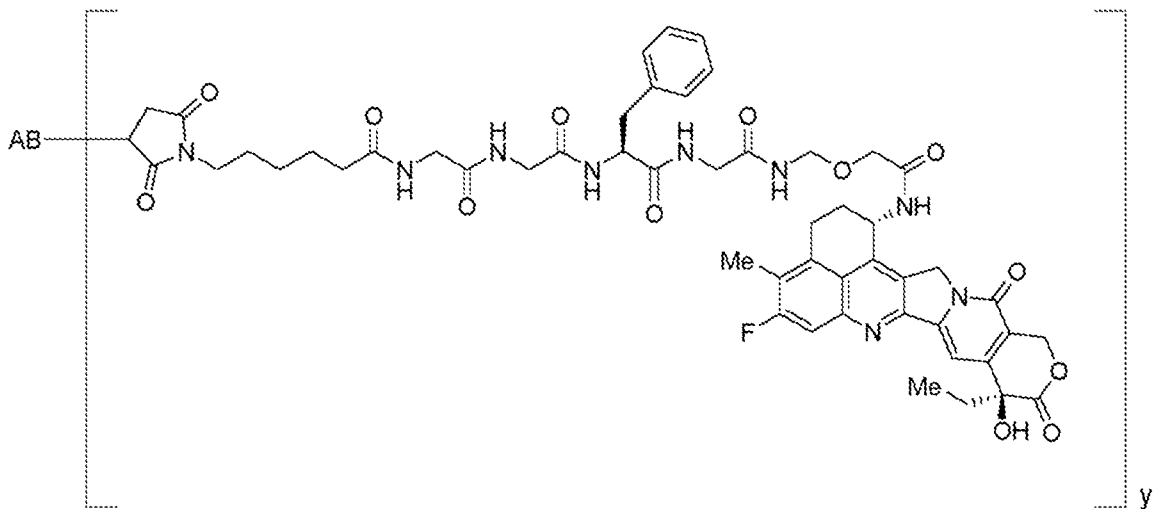
[Fórmula 5]



10 en la que AB representa el anticuerpo, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y representa un número promedio de unidades de la estructura de fármaco-conector conjugada con el anticuerpo por sí misma, y el anticuerpo se conjuga con un fármaco-conector representado por la fórmula anterior mediante un enlace tioéter.

17. Un conjugado, que está representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 7]



15 en la que AB representa el anticuerpo, el anticuerpo comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y representa un número promedio de unidades de la estructura de fármaco-conector conjugada con el anticuerpo por sí misma, y el anticuerpo se conjuga con un fármaco-conector representado por la fórmula anterior mediante un enlace tioéter.

20 18. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el anticuerpo comprende una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en defucosilación, fucosa reducida, glucosilación N-enlazada, glucosilación O-enlazada, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización del

- ácido aspártico, oxidación de la metionina, la sustitución de dos residuos de leucina (L) por alanina (A) en las posiciones 234 y 235 de la cadena pesada (LALA), la amidación de un residuo de prolina, y una delección o falta de uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo terminal, preferentemente en el que el anticuerpo comprende una delección o falta de uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada., más preferentemente, en el que el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas, ambas de las cuales carecen de un residuo de aminoácido carboxilo-terminal.
- 5
19. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el número promedio y de los agentes citotóxicos, en concreto estructuras de fármaco-conector, conjugados por anticuerpo está en un intervalo de 1 a 10.
- 10
20. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el número promedio y de los agentes citotóxicos, en concreto de unidades de la estructura fármaco-conector seleccionada, conjugados por anticuerpo está en un intervalo de 2 a 8, de 3 a 8, de 7 a 8, o de 7,5 a 8.
21. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el número de agentes citotóxicos conjugados por molécula de anticuerpo es 8.
22. Una composición que comprende el conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
- 15
23. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para su uso en medicina.
24. El conjugado según la reivindicación 23, o la composición según la reivindicación 22 para su uso en el tratamiento del cáncer, una infección, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno de inmunodeficiencia, preferentemente, en el que el cáncer se **caracteriza por** expresar TA-MUC1, más preferentemente en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de sangre, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, leucemias, seminomas, melanomas, carcinomas, teratomas, linfomas, sarcomas, mesoteliomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer de recto, cáncer suprarrenal, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer de cuello de útero, cáncer intestinal, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de oído, nariz y garganta (ORL), cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de útero y sus metástasis.
- 20
25. El conjugado o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en los que el conjugado o la composición se utilizan en combinación con otro agente.
- 25

Figura 1

A

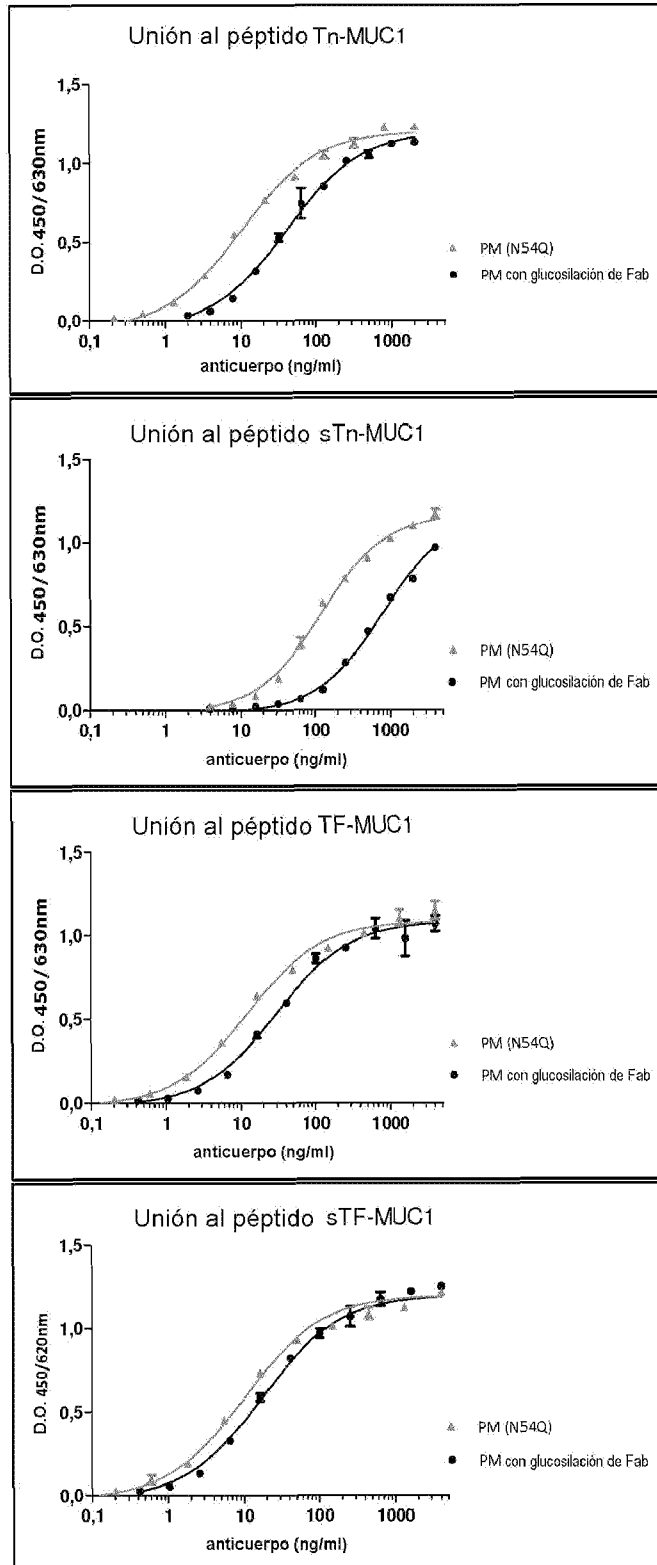
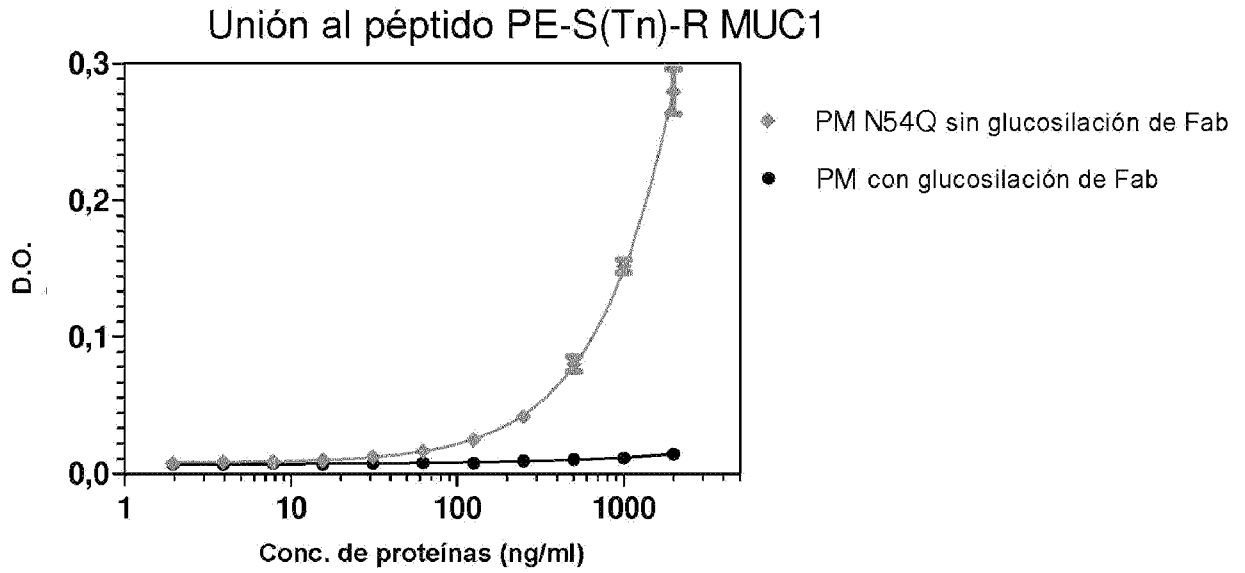


Figura 1 (continuación)

B



C

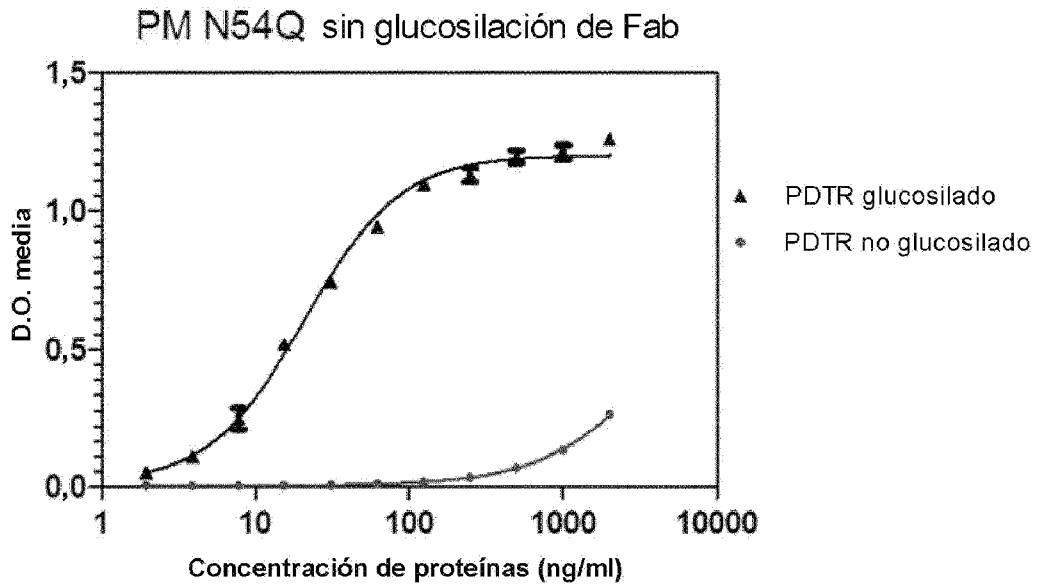


Figura 1 (continuación)

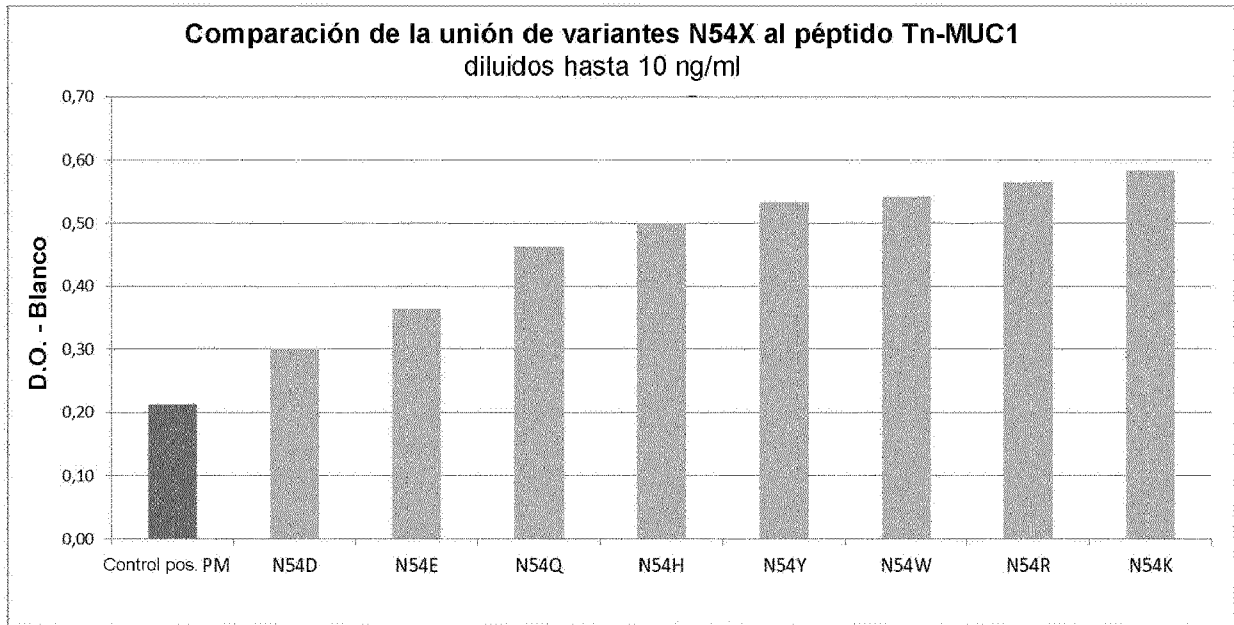
D

Figura 1 (continuación)

E

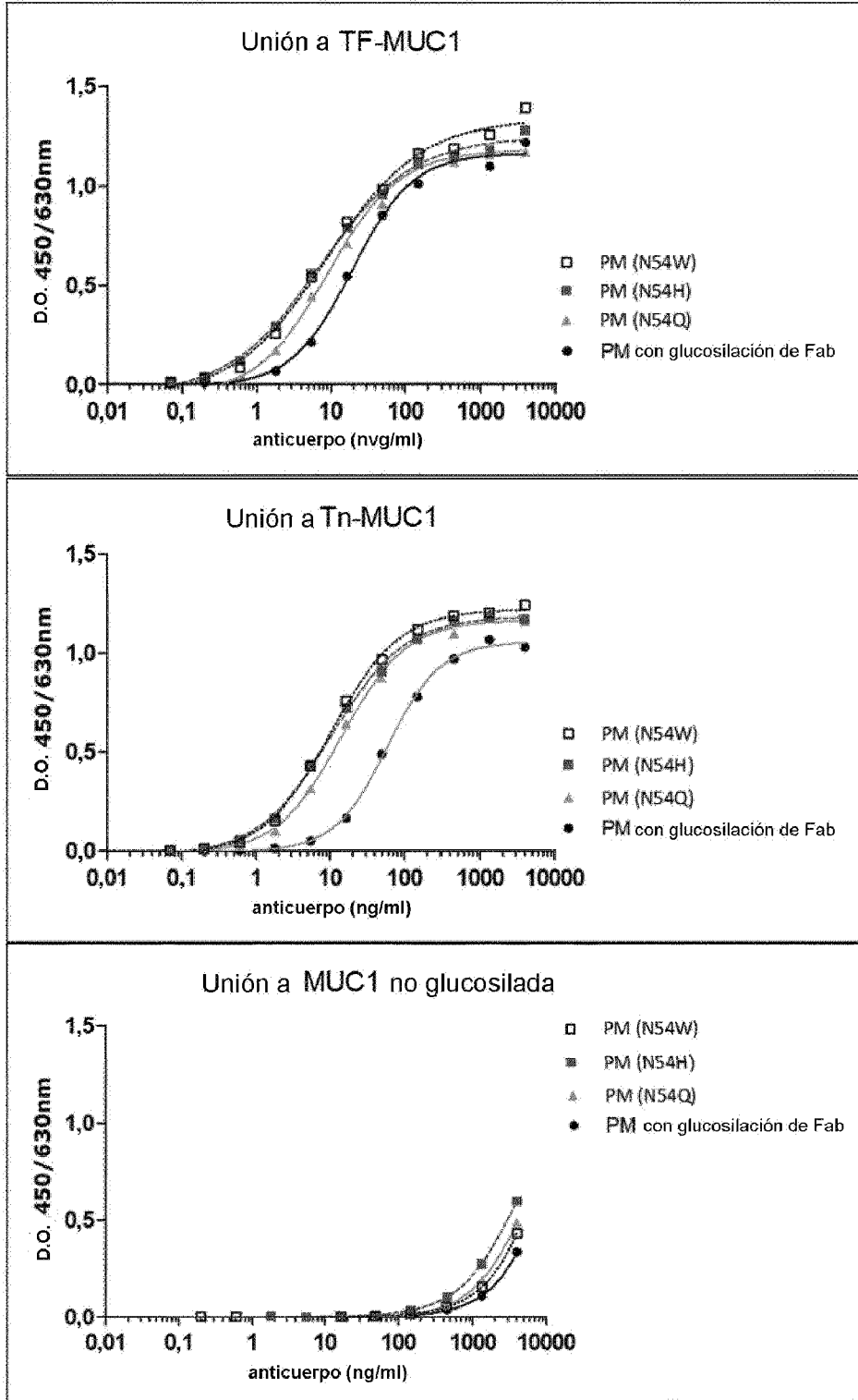


Figura 4

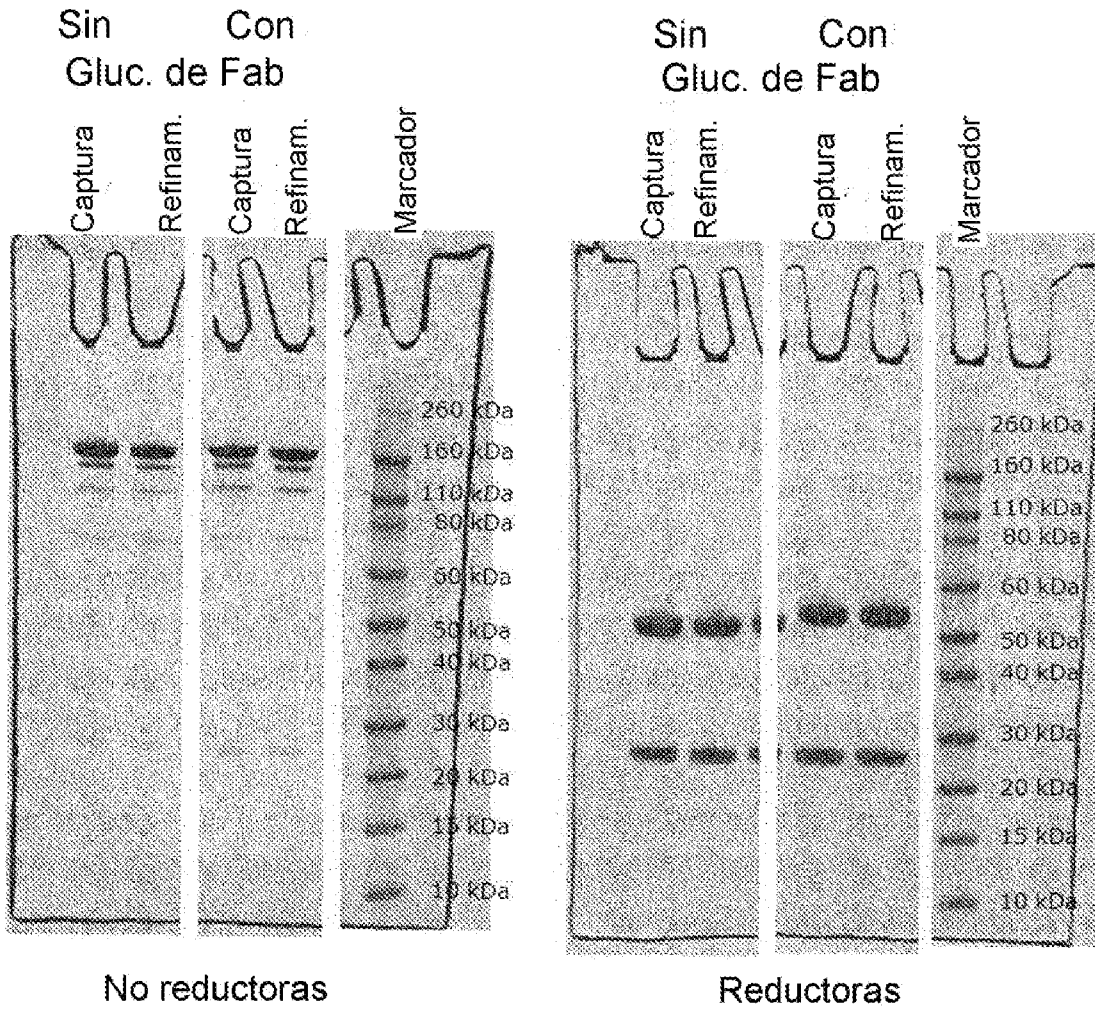


Figura 5

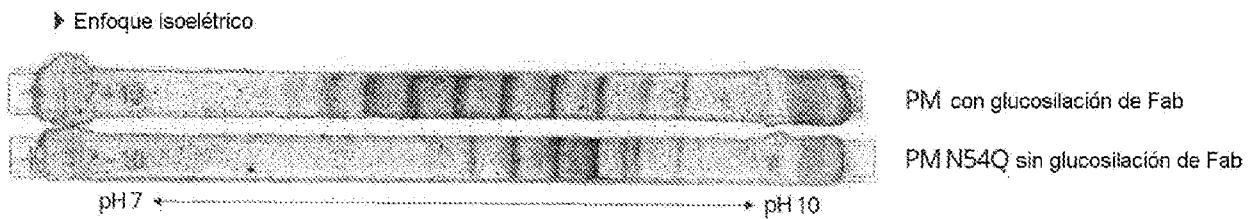


Figura 6

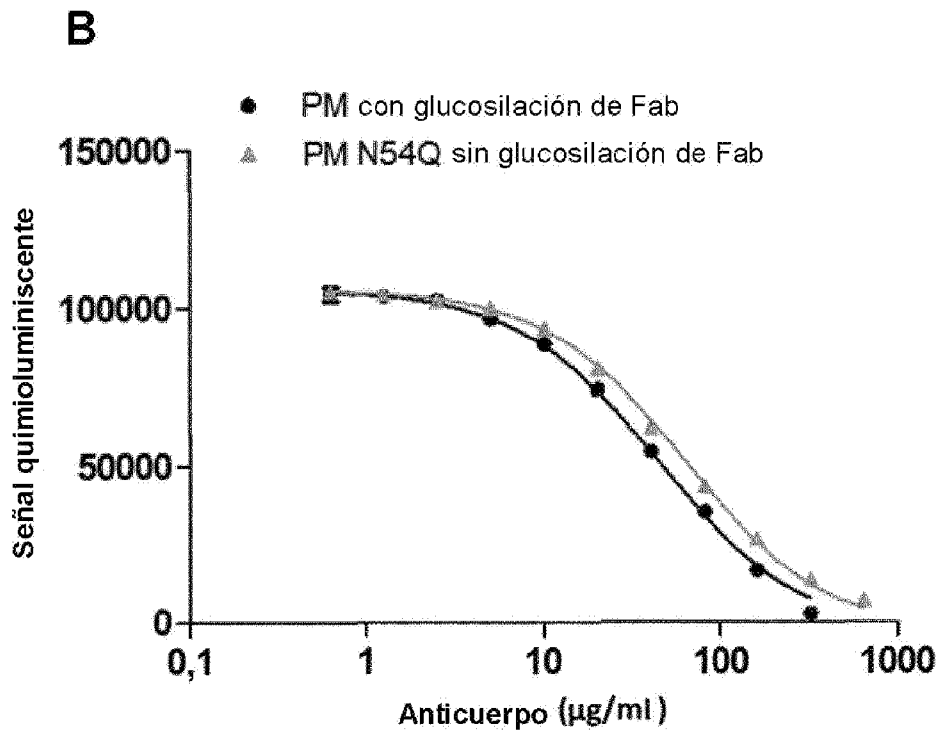
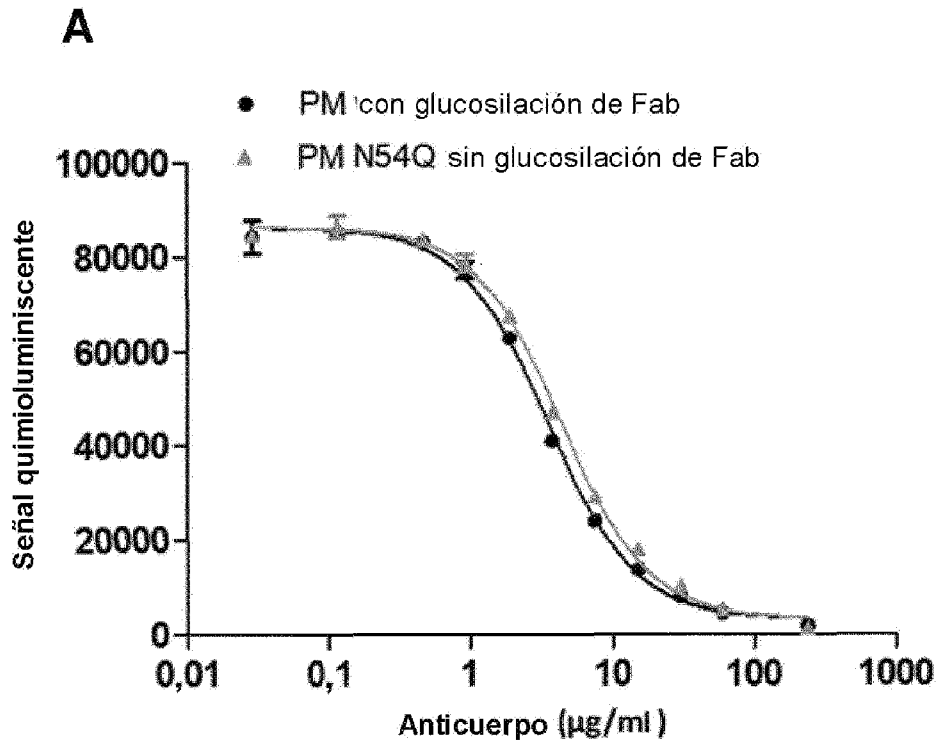
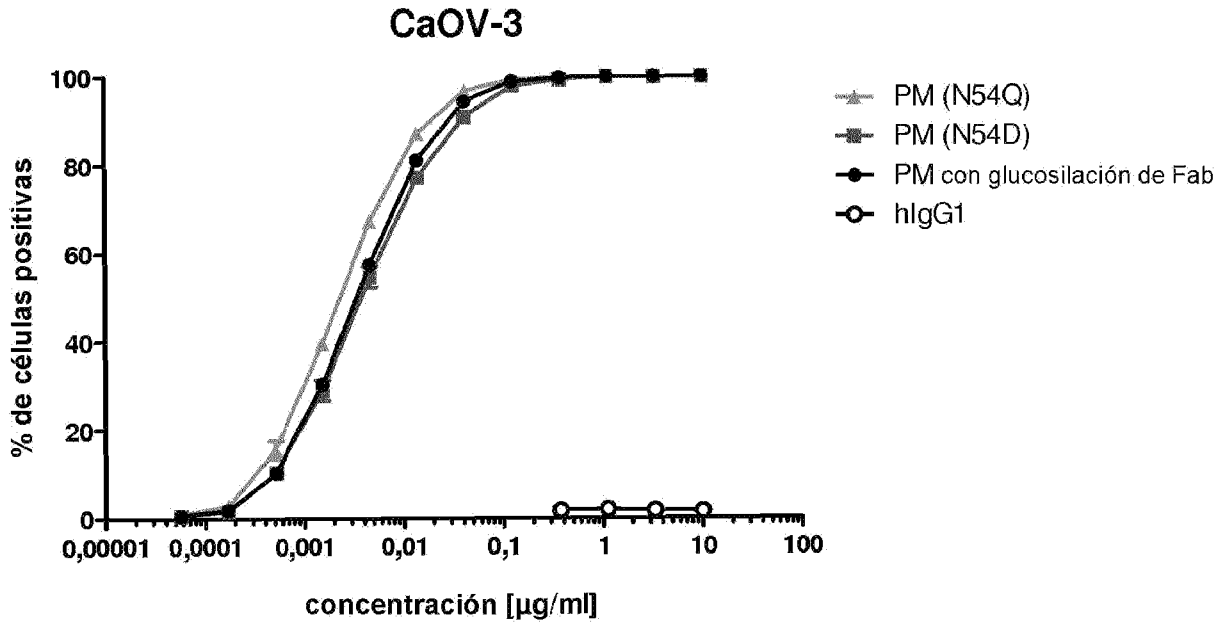


Figura 7

A



B

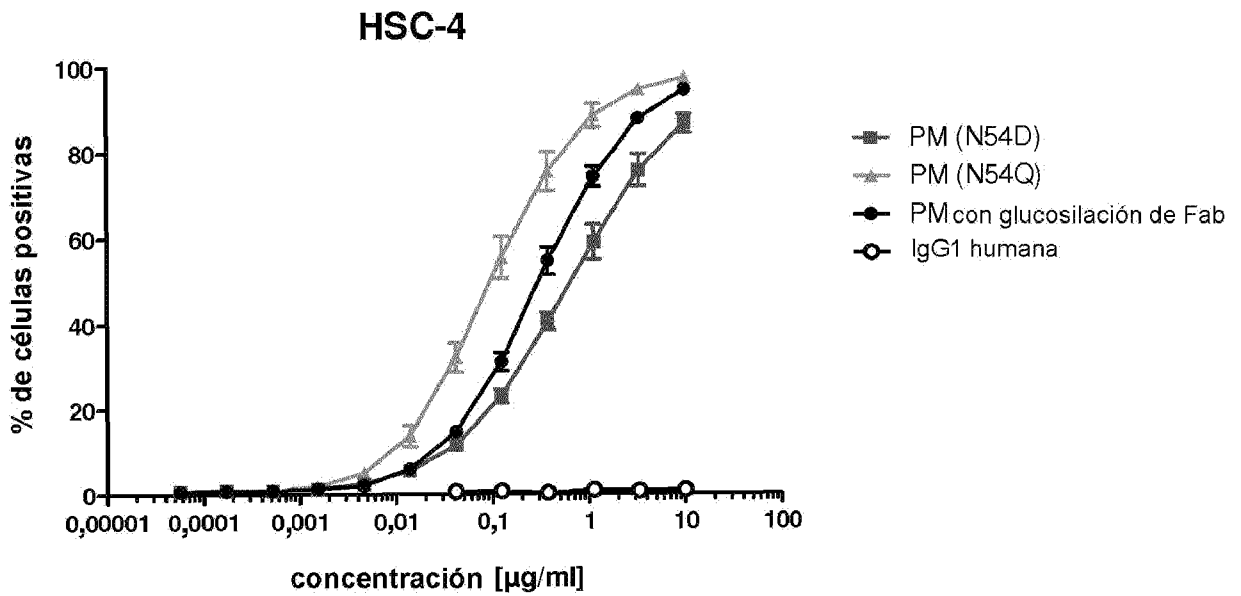
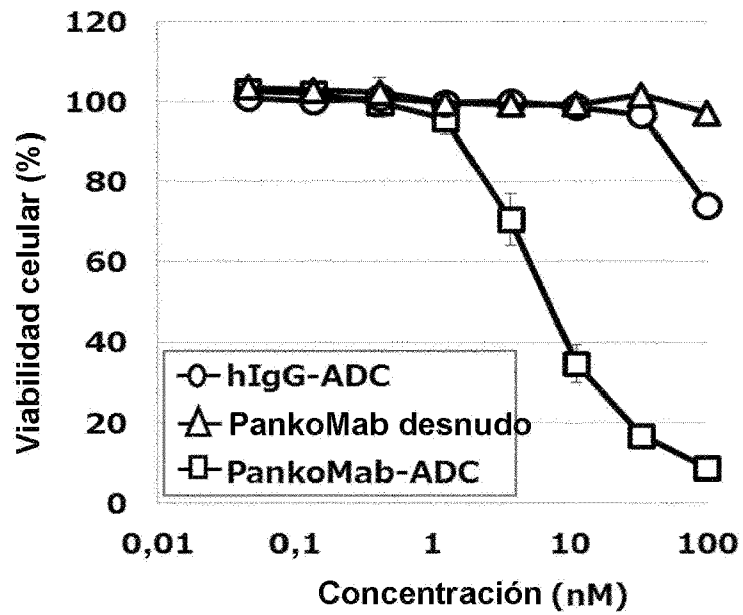


Figura 8

A
MDA-MB-468 (positivo a TA-MUC1)



B
HCT-15 (positivo a TA-MUC1)

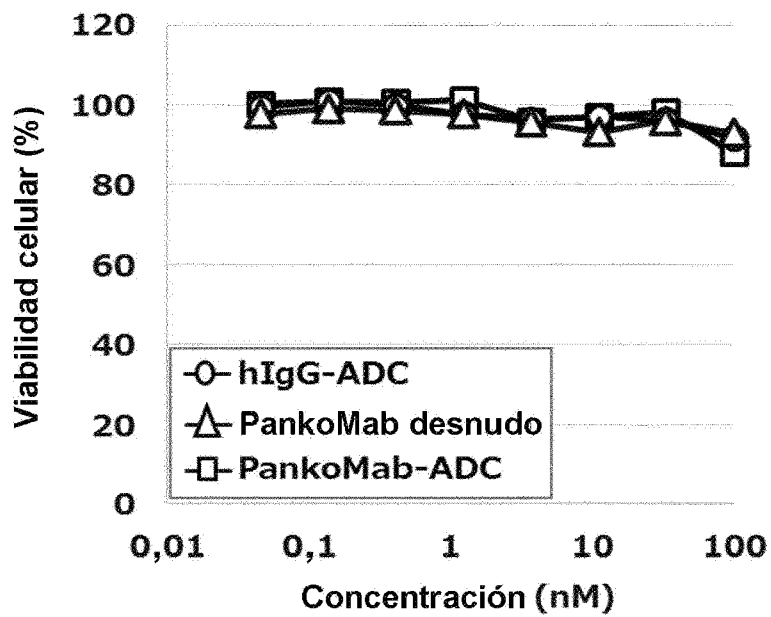


Figura 8 (continuación)

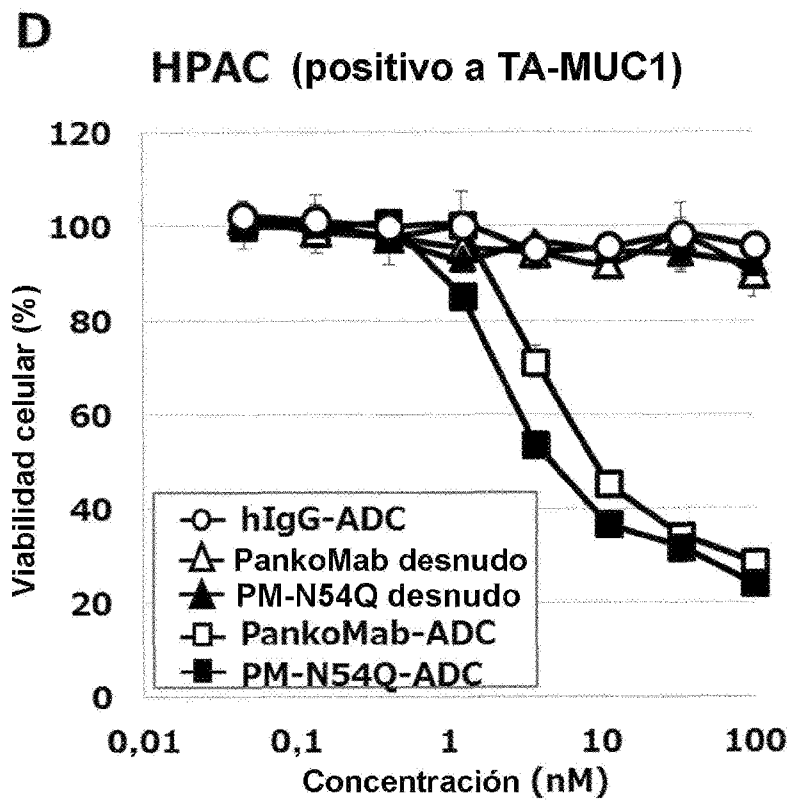
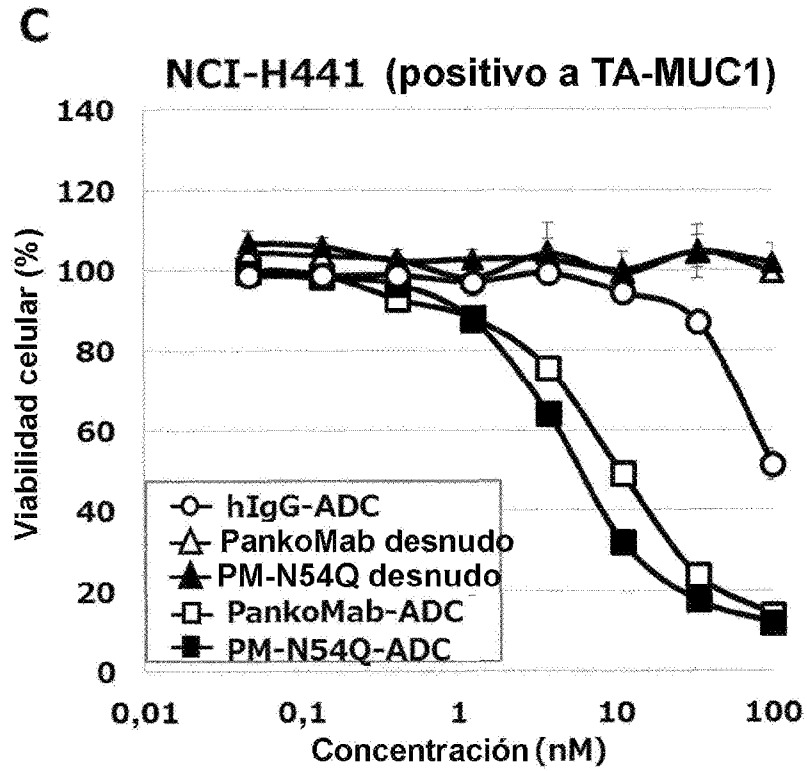


Figura 9

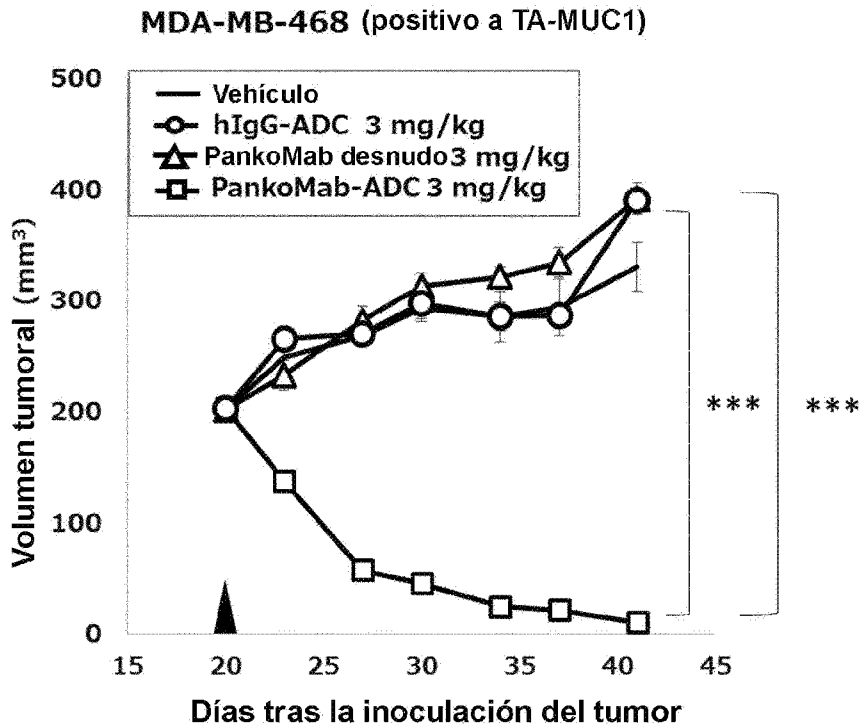


Figura 10

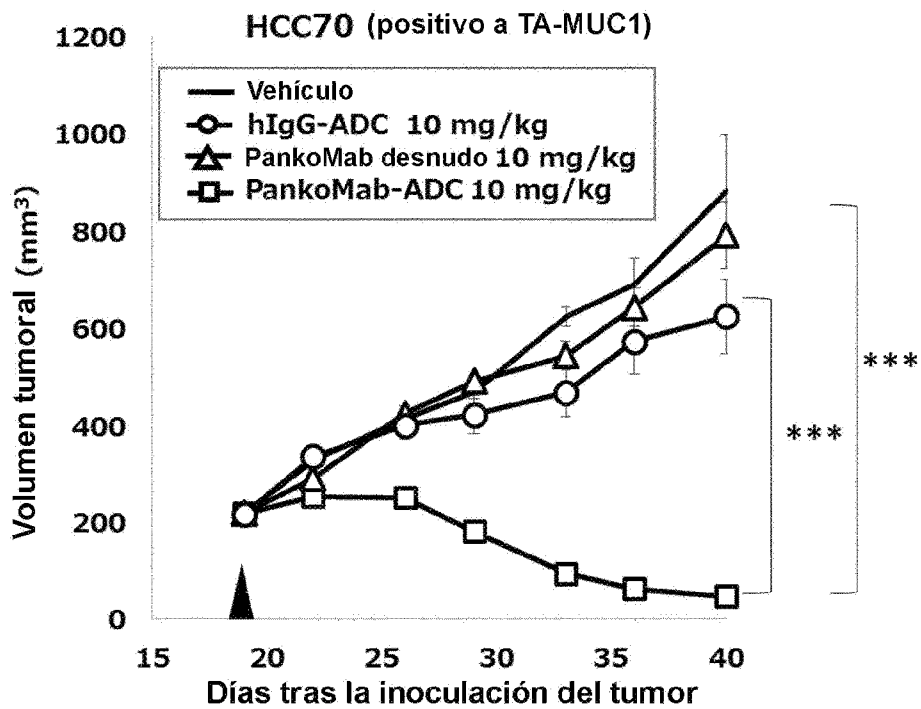


Figura 11

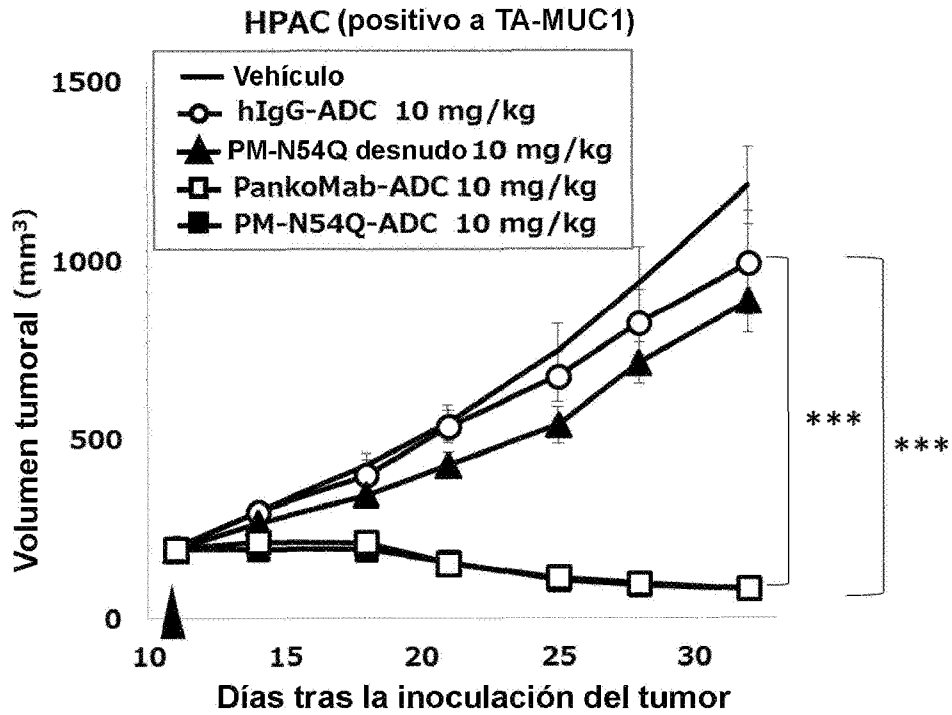


Figura 12

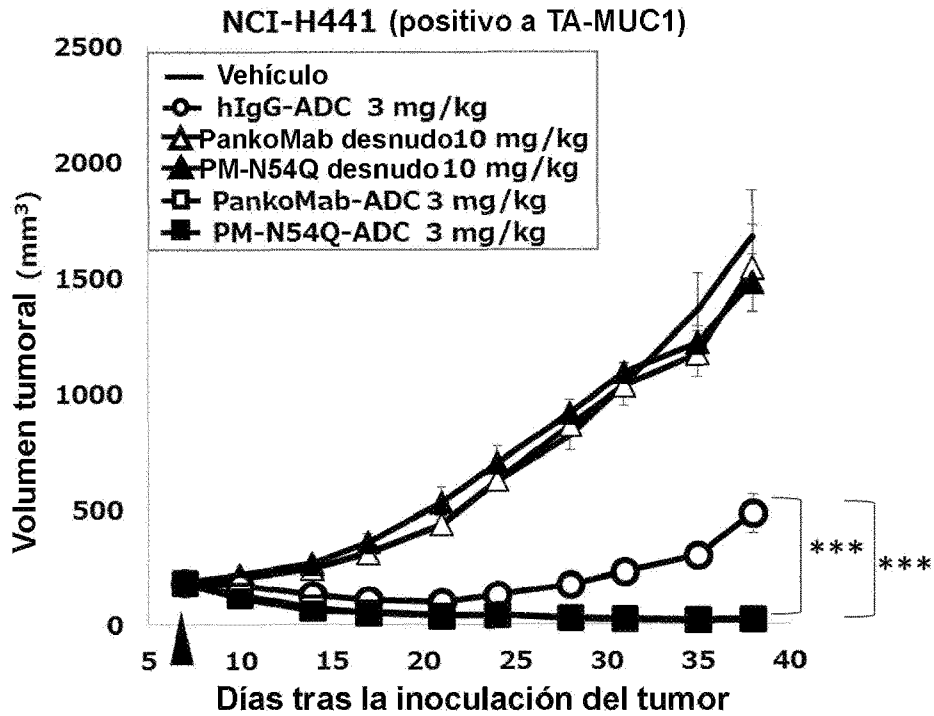


Figura 13

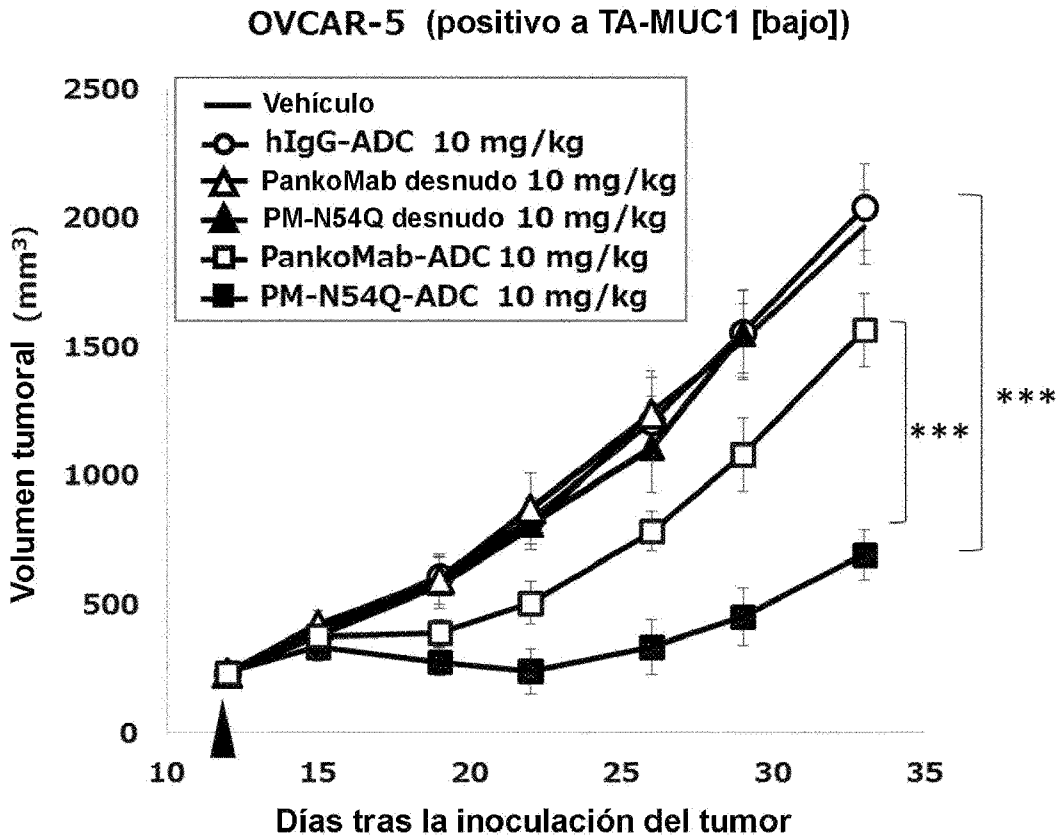


Figura 14

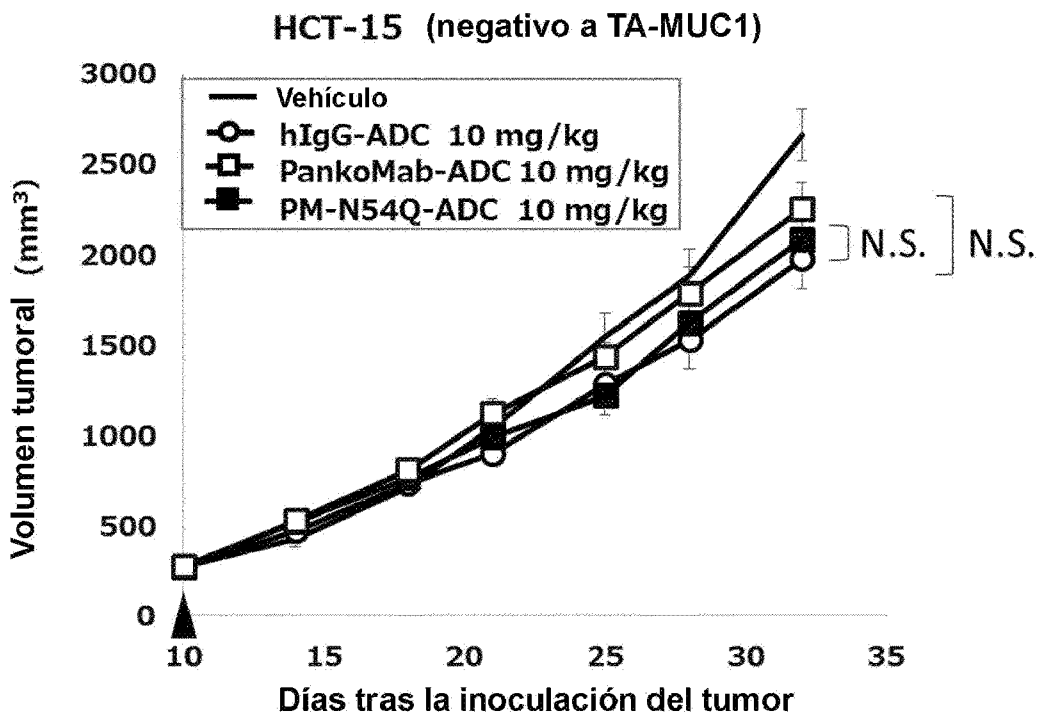


Figura 15

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

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGEIRLKS**Q**YTTTHY
AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEGLHN
HYTQKSLSLSPGK

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

Figura 16

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

DIVMTQSPLSNPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYFFWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTEFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

Figura 17

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

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGEIRLKS**N**YTTTHY
AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEGLHN
HYTQKSLSLSPGK

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

Figura 18

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

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFPPFSNYWMNWVRQAPGK
GLEWVGEIRLKSQYTTTHYAESVKGRTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHYFD
YWGQGLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV
HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVP
EVSSVFIFFPKPKDVLITILTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQIN
STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIKTKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMA
KDKVSLTTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGN
TFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

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

Figura 19

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

MVLQIQVFISLWISGAYGDIVMTQSPLSNPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYFFWYL
QKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLRI SRVEAEDVGVYYCAQNLKLPPTFG
QGTKVEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNRFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLN
SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRNEC

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