



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 552**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06290091 .5**

96 Fecha de presentación : **13.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1808442**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **Síntesis enzimática a gran escala de glicoconjugados de mucina y sus aplicaciones en inmunología.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2011

73 Titular/es: **Institut Pasteur
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR
Institut National de la Sante et de la Recherche
Medicale (INSERM) y
Centre National de la Recherche
Scientifique-CNRS**

72 Inventor/es: **Bay, Sylvie;
Freire, Teresa;
Leclerc, Claude y
Lo-Man, Richard**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 552 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

Síntesis enzimática a gran escala de glicoconjugados de mucina y sus aplicaciones en inmunología.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere a glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn, tales como glicoconjugados de mucina-Tn, mucina sTn, mucina-TF, y a un complejo inmunitario soluble que comprende dicho glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn, para sus usos como inmunógenos, y a sus aplicaciones biológicas, farmacéuticas y médicas, más particularmente a sus aplicaciones en inmunología, notablemente en el campo del tratamiento paliativo, preventivo o terapéutico de tumores.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

- 10 Las células malignas se expresan selectivamente en sus moléculas superficiales que tienen importancia funcional en la adherencia, invasión y metástasis celulares. Algunas de estas estructuras asociadas a tumores son el resultado de un bloqueo en la vía de glicosilación. En particular, el alargamiento incompleto de cadenas sacarídicas de O-glicano conduce a la expresión de estructuras de carbohidratos más cortas, tales como los antígenos Tn, sialil-Tn o TF (Hollingsworth and Swanson 2004). El antígeno Tn, definido como una unidad GalNAc α -enlazada a un residuo
15 de serina o treonina (α -GalNAc-O-Ser/Thr), es una de las estructuras asociadas a tumores humanas más específicas. El antígeno Tn se detecta en aproximadamente 90% de los carcinomas humanos (Springer 1984) y su expresión está correlacionada con la agresividad de los carcinomas (Springer 1997). Por otra parte, en condiciones apropiadas, el antígeno Tn es capaz de inducir una fuerte respuesta inmunitaria en ratones y primates no humanos, siendo los anticuerpos resultantes capaces de reconocer células cancerígenas humanas (Lo-Man *et al.*, 2001, Lo-Man *et al.*, 2004).

- Este epítipo O-enlazado se expresa generalmente en mucinas como sus estructuras nucleares de carbohidratos (Hollingsworth and Swanson 2004). Las mucinas son proteínas O-glicosiladas de alto peso molecular (50-80% de sus masas es debida a las cadenas de carbohidratos O-enlazadas) que participan en la protección, lubricación y
25 resistencia a los ácidos de la superficie epitelial (Gendler and Spicer 1995). Hasta la fecha, se han identificado y numerado en orden cronológico de su descripción diferentes mucinas (MUC1-MUC20) (Chen *et al.*, 2004, Filshie *et al.*, 1998, Gum *et al.*, 2002, Higuchi *et al.*, 2004, Moniaux *et al.*, 2001, Pallesen *et al.*, 2002, Williams *et al.*, 2001, Yin and Lloyd 2001). Aunque no muestran homología de secuencias, todas las mucinas presentan una región grande compuesta de un número variable de unidades repetitivas en tándem (VNTR, del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*). Estas regiones, denominadas generalmente unidades repetitivas de secuencias en tándem, se
30 caracterizan por un alto contenido en residuos de serina, treonina (que constituyen los sitios potenciales de O-glicosilación) y prolina.

- Cada órgano o tejido presenta un único modelo de expresión de los genes MUC (Gendler and Spicer 1995). Este perfil de la expresión de las mucinas se puede modificar en condiciones patológicas y especialmente durante la transformación maligna. La sobre-regulación, la sub-regulación y la expresión *de novo* de las proteínas mucinas han
35 sido descritas en células epiteliales cancerígenas y se sabe que influyen en la adherencia celular (Hilkens *et al.* 1992) y que contribuyen a la capacidad invasiva de los tumores (Segal-Eiras and Croce 1997). Por otra parte, estas mucinas asociadas a tumores presentan diferencias antigénicas con las mucinas normales y son altamente inmunógenas y en este sentido pueden usarse como dianas potenciales para inmunoterapia (Agrawal *et al.* 1998, Apostolopoulos *et al.* 1996). En particular, la MUC1 está siendo sometida a diversas pruebas clínicas como vacuna
40 anti-cancerígena (Finn *et al.* 1995, Gilewski *et al.* 2000).

- La MUC6 fue aislada primeramente de una genoteca humana de estómago (Toribara *et al.*, 1993) y se expresa a altos niveles en el estómago normal y en la vesícula biliar con expresión más débil en el íleo terminal, colon derecho y en el endo-cuello del útero (De Bolos *et al.*, 1995, Ho *et al.* 1995, Reis *et al.*, 2000, Toribara *et al.*, 1993). La MUC6
45 tiene una unidad repetitiva en tándem de 169 aminoácidos (507 pb cada uno) (Toribara *et al.*, 1993) y los análisis por transferencia Southern de los alelos más cortos de MUC6 indican que contienen al menos 15 unidades repetitivas (Vinall *et al.*, 1998). Aunque el gen completo de MUC6 ha sido localizado e identificado, todavía no se ha secuenciado completamente un cDNA de longitud completa (Rousseau *et al.*, 2004). Además de su expresión normal en los tejidos gástricos, la MUC6 ha sido detectada en el adenocarcinoma y la metaplasia de Barrett (Guillem
50 *et al.*, 2000), en el adenoma y carcinoma intestinal (Guillem *et al.*, 2000), en el carcinoma pulmonar (Hamamoto *et al.*, 2005, Nishiumi *et al.* 2003), en pólipos colorrectales (Bartman *et al.*, 1999) y en carcinoma de mama (De Bolos *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 2001), mientras que no se expresa en los tejidos normales respectivos. En algunos casos, se ha observado que la expresión de MUC6 está correlacionada con los grados de histopatología relacionada con la
55 potencial malignidad (Bartman *et al.*, 1999, Hamamoto *et al.*, 2005, Nishiumi *et al.*, 2003). Los inventores de la presente solicitud han demostrado recientemente que la MUC6 está anómalamente glicosilada en las células del cáncer de mama MCF7 puesto que contiene el antígeno Tn (Freire *et al.*, 2005). Diversos estudios han demostrado que las estructuras de carbohidratos de las mucinas (incluyendo el antígeno Tn del núcleo) pueden ser esenciales para la definición de las estructuras asociadas a tumores (Grinstead *et al.*, 2003, von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2005). Por consiguiente, los glicoconjugados Tn-MUC6 representan dianas atractivas para ser utilizadas en la inmunoterapia del cáncer. Una respuesta del anticuerpos anti-Tn específicos debe dirigirse a las células

cancerígenas a través del antígeno Tn, que se expresa en sus superficies. Además, se debe favorecer la activación de los linfocitos T citotóxicos específicos de las mucinas a través de la absorción de complejos inmunitarios MUC6-Tn solubles por receptores Fc en células dendríticas (Amigorena and Bonnerot 1999).

5 Sin embargo las técnicas anteriores adolecen del inconveniente de no permitir una producción fácil de glicoconjugados de mucina-Tn.

Los glicoconjugados de mucina-Tn son:

- glicoconjugados que existen en la naturaleza o
- glicopéptidos sintéticos.

10 Los glicoconjugados mucina-Tn que existen en la naturaleza se obtienen por aislamiento a partir de una fuente biológica (Podolsky 1985; Robbe *et al.*, 2004). Dichos glicoconjugados se pueden obtener sólo en muy pequeñas cantidades. Su cadena principal de apomucina es una proteína completa de apomucina, que lleva un gran número de diferentes residuos de carbohidratos. Los glicoconjugados mucina-Tn que existen en la naturaleza no sólo contienen antígenos Tn, sTn y TF, sino también un gran número de otros residuos de carbohidratos, cuya naturaleza varía dependiendo del tipo, condición y estado de la célula de la que proceden.

15 La preparación de glicoconjugados antigénicos que existen en la naturaleza implica además purificaciones tediosas en múltiples etapas y/o que consumen tiempo.

Otros glicoconjugados mucina-Tn de la técnica anterior son los glicopéptidos sintéticos mucina-Tn. Su cadena principal de apomucina está limitada a unos cuantos aminoácidos.

20 Por ejemplo, Kagan *et al.*, 2005 describen conjugados KHL de glicopéptidos de MUC1 o MUC2. La cadena principal peptídica de estos conjugados de KHL es un péptido de 32 aa de MUC1 o MUC2 y la(s) enzima(s) utilizada(s) para glicosilar estos péptidos es(son) N-acetilgalactosaminiltransferasa(s) T2 y/o T4.

25 Dichos glicopéptidos de la técnica anterior, cuando se utilizan solos, no son muy eficaces en inducir una respuesta inmunitaria: requieren ser conjugados a un vehículo proteínico, tal como KLH, para ejercer sus propiedades antigénicas, si las tienen. Como consecuencia, los glicopéptidos derivados de mucina utilizados como inmunógenos son de hecho conjugados con KLH.

Otros glicopéptidos de mucina sintéticos han sido descritos por los inventores de la presente solicitud, en Freire *et al.*, 2005 (*Cancer Res.* 65(17): 7880-7887).

30 Freire *et al.* 2005 describen la producción de un glicopéptido MUC6-Tn (GTTPPPTTLK; SEQ ID NO:14) y de los glicopéptidos MUC1-Tn, MUC2-Tn y MUC5B-Tn. La cadena principal de apomucina de estos glicoconjugados de mucina-Tn es un péptido con 9-12 aa (10 aa para MUC6-Tn; 9 aa u 11 aa para MUC1-Tn; 12 aa para MUC2-Tn; 11 aa para MUC5B-Tn; véase la página 7881 de Freire *et al.*, 2005).

Estos glicopéptidos de mucina-Tn se producen:

- bien por el procedimiento bastante caro de síntesis glicopeptídica utilizando un bloque glicosilado protegido [Fmoc-Thr(α -GalNAc(OAc)3)-OH] en el lugar adecuado de la secuencia peptídica (véase el párrafo titulado "*synthetic (glyco)peptides*", en el apartado "*Materials and Methods*" en la página 7881),
- o por transferencia enzimática de GalNAc al péptido de apomucina, en la que se utilizan extractos microsómicos MCF-7 como fuente de actividad de ppGalNAc-T y en la que la glicosilación es monitorizada por HPLC en fase inversa (véase el párrafo titulado "*Enzymatic transfer of GalNAc or Gal into MUC6 o MUC6-Tn, respectively*", en el apartado "*Materials and Methods*" en la página 7881; véase también la Figura 1 en la página 7882).

Ambos procesos están, sin embargo, limitados a la glicosilación de péptidos con 9-12 aa y no consiguen cantidades semi-preparativas de producción (mg a g).

45 Freire *et al.*, 2005 además no describen ningún resultado relacionado con la inmunización para estos glicopéptidos MUC6-Tn, MUC1-Tn, MUC2-Tn y MUC5B-Tn, tanto si están unidos a un vehículo proteínico, tal como KLH, como si no lo está.

Además con el fin de desarrollar vacunas anti-tumorales basadas en el antígeno Tn, los inventores de la presente solicitud proporcionan un método enzimático *in vitro* para la preparación de glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn y describen nuevos glicopéptidos de mucina y nuevas composiciones inmunógenas que superan los inconvenientes de las técnicas anteriores y que pueden inducir una respuesta inmunógena altamente eficaz.

50 Los inventores de la presente solicitud desarrollaron un método enzimático, que permite la producción de glicoconjugados de mucina con una alta densidad del antígeno Tn en cantidades a una escala al menos semi-preparativa.

Al contrario que los glicopeptídicos sintéticos de la técnica anterior, los glicoconjugados de mucina de la invención son inmunógenos, incluso cuando se utilizan en ausencia de proteína vehículo.

Los glicoconjugados de mucina inmunógenos de la invención difieren de los glicoconjugados que existen en la naturaleza en que su componente de carbohidratos no tiene una composición heterogénea ni variable. El componente de carbohidratos de los glicoconjugados de mucina inmunógenos de la invención tiene una composición precisa: cada uno de los restos de carbohidratos que están O-enlazados directamente a un residuo de Ser o Thr de la cadena principal de apomucina es un resto GalNAc.

Que sepan los inventores de la presente solicitud, este es el primer trabajo que describe la inducción de anticuerpos específicos de células tumorales después de la inmunización con un polipéptido derivado de mucina que lleva el antígeno Tn, sin un vehículo proteínico.

Como un aspecto muy ventajoso, los glicoconjugados de mucina producidos de acuerdo con la presente invención inducen un efecto inmunógeno que es un efecto inmunógeno específico: por administración *in vivo*, los glicoconjugados de mucina de la invención son capaces de inducir anticuerpos y ventajosamente anticuerpos IgG que son capaces de reconocer células tumorales humanas por medio de un mecanismo dependiente del antígeno Tn.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere al objeto definido en las reivindicaciones.

Con el fin de desarrollar más las vacunas anti-tumorales basadas en el antígeno Tn, los inventores de la presente solicitud establecieron un procedimiento para la producción *in vitro* de una composición inmunógena, comprendiendo dicho procedimiento la producción enzimática de glicoconjugados de mucina, más particularmente de glicoconjugados MUC6-Tn, como se define en las reivindicaciones.

Para este fin, los inventores de la presente solicitud realizaron la transferencia enzimática de GalNAc a los residuos de serina y treonina de la mucina, utilizando al menos una UDP-N-acetilgalactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (EC 2.4.1.41, ppGalNAc-T(s)).

Como característica ventajosa de la invención, se utiliza espectrometría de masas con desorción-ionización láser potenciada en superficie con detector de tiempo de vuelo (SELDI-TOF MS, del inglés *Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight mass spectrometry*) para monitorizar la conjugación en la mucina, particularmente cuando la mezcla de reacción tiene una composición compleja.

El método de transglicosilación de una proteína de mucina recombinante de acuerdo con la invención es muy conveniente y eficaz, puesto que el 100% de la proteína de partida se convirtió en especies glicosiladas.

Además, se consigue una alta relación de glicosilación, es decir, una alta densidad de antígeno Tn.

Que sepan los inventores de la presente solicitud, esta es la primera vez que se obtiene un polipéptido recombinante glicosilado de Tn/sTn/TF que carece de restos de carbohidratos distintos de Tn, sTn o TF, en cantidades semi-preparativas, por el uso de al menos una ppGalNAc-T.

Que sepan los inventores de la presente solicitud, este el primer trabajo que describe la inducción de anticuerpos específicos de células tumorales humanas después de inmunización con un polipéptido derivado de mucina que lleva el antígeno Tn, sin un vehículo proteínico.

Como característica muy ventajosa, los productos que son accesibles por la presente solicitud de patente son capaces, por administración *in vivo*, de inducir anticuerpos IgG, que son capaces de reconocer células tumorales humanas a través de un mecanismo dependiente de Tn.

Que sepan los inventores de la presente solicitud, esta es la primera vez que se utiliza espectrometría de masas SELDI-TOF para monitorizar la conjugación de mucina, particularmente cuando la mezcla tiene una composición compleja.

La invención se refiere a un procedimiento que implica la producción de glicoconjugados homogéneos de mucina, por incorporación de uno o diversos restos de carbohidratos elegidos entre las especies de carbohidratos definidas (es decir, antígenos Tn, sTn y TF) y a los glicoconjugados homogéneos de mucina obtenibles por este procedimiento, como se definen en las reivindicaciones.

El componente de carbohidratos de los glicoconjugados de la invención consiste en al menos un antígeno Tn, sTn o TF, pero no comprende ningún resto de carbohidratos distinto de Tn, sTn o TF. Por consiguiente, los glicoconjugados de la invención son estructuralmente mucho más homogéneos que los glicoconjugados que existen en la naturaleza.

La invención también se refiere a glicoconjugados inmunógenos de mucina basados en el antígeno Tn (por ejemplo, mucina-Tn, mucina-T o mucina-sTn), para sus usos como inmunógenos, donde el componente apomucina es un

polipéptido o proteína de apomucina que comprende al menos una unidad repetitiva en tándem de mucina o un fragmento conservado o sus derivados, como se definen en las reivindicaciones. La solicitud describe ácidos nucleicos que codifican dichos glicopolipéptidos o glicoproteínas, vectores y células hospedantes que comprenden dicho ácido nucleico y/o que expresan dicho glicopolipéptido o glicoproteína. Dichos glicopolipéptidos o glicoproteínas de mucina se obtienen por el procedimiento de la invención.

La invención se refiere también a un complejo inmunitario soluble, para utilizar como inmunógeno, que comprende al menos un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn y al menos una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, como se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere también a composiciones, principalmente composiciones farmacéuticas, fármacos, fármacos inmunógenos, vacunas, que comprenden un glicoconjugado de mucina, para su uso como composiciones inmunógenas como se definen en las reivindicaciones. Dichas composiciones no requieren la presencia de un vehículo proteínico para inducir un efecto inmunógeno.

La invención se refiere también a las aplicaciones anti-tumorales de los glicoconjugados de mucina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURAS 1A, 1B, 1C:

FIG. 1A. Alineación de las proteínas clonadas MUC6 con dos unidades repetitivas en tándem conocidas de MUC6.

La alineación se realizó con ClustalW utilizando las secuencias predichas obtenidas de proteínas MUC6 clonadas (MUC6-1 de SEQ ID NO:4, primera línea de alineación; y MUC6-2 de SEQ ID NO:5, segunda línea de alineación) a partir de las células de cáncer de mama MCF7 y con unidades repetitivas en tándem de MUC6 ya citadas (TR1 y TR2 y TR3, desde la tercera a la cuarta líneas de alineación, respectivamente) amplificadas a partir de una genoteca gástrica normal (número de acceso Q14395). Los sitios potenciales de O-glicosilación se determinaron utilizando el servidor NetOGlyc3.1 en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> y están sombreados en gris. Las secuencias correspondientes a la fusión cola de His están subrayadas (es decir, los primeros 34 aminoácidos en el extremo N de SEQ ID NO:4 y NO:5). Los aminoácidos idénticos están marcados con [*].

FIG. 1 B. Purificación de proteína recombinante MUC6-1 analizada por SDS-PAGE.

La proteína MUC6-1 recombinante se purificó utilizando Ni-NTA-agarosa y HPLC. Las fracciones se resolvieron por SDS-PAGE (13%) y se tiñeron con azul de Coomassie. Pistas 1-4: fracciones de elución con Ni-NTA agarosa; Pista 5: MUC6-1 purificada después por HPLC. Los marcadores moleculares se expresan en kDa.

FIG. 1C. Purificación de proteína recombinante MUC6-2 analizada por SDS-PAGE.

La proteína MUC6-2 recombinante se purificó utilizando Ni-NTA-agarosa. Las fracciones se resolvieron por SDS-PAGE (13%) y se tiñeron con azul de Coomassie. Pistas 1-4: fracciones de elución con Ni-NTA agarosa. Los marcadores moleculares se expresan en kDa.

FIGURAS 2A, 2B, 2C, 2D: Transferencia de GalNAc a las proteínas MUC6 y determinación del número de GalNAc.

La reacción de transglicosilación se realizó bien con mucina MUC6-1 purificada (3 mg, 0,14 μ moles) y UDP-GalNAc (7,8 mg, 11,5 μ moles) utilizando bppGalNAc-T1 (300 μ g) o con mucina MUC6-2 purificada (1 mg, 0,082 μ moles) y UDP-GalNAc (3,2 mg, 4,92 μ moles en dos veces) utilizando extractos de células MCF7 (12 mg en dos veces). La glicoproteína MUC6-1:Tn(T1) fue analizada directamente por HPLC (FIG. 2A). La glicoproteína MUC6-2:Tn(MCF7) fue purificada utilizando Ni-NTA agarosa y analizada por HPLC (FIG. 2B). Después de purificación por HPLC, MUC6-1:Tn(T1) (FIG. 2C) y MUC6-2:Tn(MCF7) (FIG. 2D) fueron analizadas por SELDI-TOF MS. Cada pico está marcado con el valor masa/carga (m/z) en Daltons. Entre paréntesis se indica el número correspondiente de unidades GalNAc incorporadas.

FIGURA 3: SDS-PAGE de MUC6-1 y MUC6-2 purificadas y sus glicoconjugados.

Los glicoconjugados purificados (0,5 μ g) se separaron en SDS-PAGE al 13% y se tiñeron con azul de Coomassie. Pista 1: MUC6-2; Pista 2: MUC6-2:Tn(T1); Pista 3: MUC6-2:Tn(MCF7); Pista 4: MUC6-1; Pista 5: MUC6-1:Tn(T1); Pista 6: MUC6-1:Tn(MCF7). Los marcadores moleculares se expresan en kDa.

FIGURAS 4A, 4B, 4C, 4D, 4E: Reconocimiento de glicoconjugados MUC6-Tn por mAb anti-Tn por transferencia de Western (A-B) y ELISA (C-E).

Los glicoconjugados se separaron en un SDS-PAGE al 13% y se transfirieron a láminas de nitrocelulosa. Se añadieron un mAb anti-His (FIG. 4A) y el mAb anti-Tn 83D4 (FIG. 4B), seguido de un conjugado de peroxidasa anti-ratón y la reacción se desarrolló con quimioluminiscencia mejorada. Pista 1: MUC6-2; Pista 2: MUC6-2:Tn(T1); Pista 3: MUC6-2:Tn(MCF7); Pista 4: MUC6-1; Pista 5: MUC6-1:Tn(T1); Pista 6: MUC6-1:Tn(MCF7). Los marcadores

moleculares se expresan en kDa.

El reconocimiento de los glicoconjugados MUC6-Tn por anticuerpos monoclonales anti-Tn 83D4 (FIG. 4C) y MLS128 (FIG. 4D) y por un suero anti-MUC6 policlonal (FIG. 4E) se analizaron también por ELISA. Como control se utilizó mucina submaxilar asialo-ovina (aOSM, una mucina rica en Tn).

5 FIGURAS 5A, 5B: Reconocimiento de células tumorales de Jurkat humanas por sueros procedentes de ratones inmunizados con MUC6-2:Tn(MCF7).

FIG. 5A: Se realizaron análisis por citometría de flujo de células tumorales de Jurkat Tn+ humanas incubadas con sueros individuales (diluidas 1:500) extraídas de ratones BALB/c (5 por grupo) inmunizados con MUC6-2, MUC6-2:Tn(MCF7) o alumbre más CpG solo (grupo control).

10 FIG. 5B: Para análisis de inhibición, se incubaron células con una mezcla de sueros procedentes de ratones inmunizados con MUC6-2:Tn(MCF7) junto con diversas concentraciones de asialo-OSM (mucina Tn+) u OSM desglucosilado (mucina Tn-). Como controles se usaron el mAb IgM anti-Tn 83D4 y un mAb IgG anti-CD4. Se detectó la unión a anticuerpos utilizando anticuerpos marcados con PE específicos de la inmunoglobulina de ratón. Las concentraciones utilizadas para asialo-OSM u OSM desglucosilado fueron: 0 µg/ml (----); 0,01 µg/ml (—); 1 µg/ml (.....); 100 µg/ml (- -). Los resultados obtenidos con sueros de ratón son el resultado de dos experimentos independientes.

FIGURA 6: Esquema de transglucosilación enzimática de GalNAc desde UDPGalNAc a la mucina MUC6, utilizando bien ppGalNAc-T1 recombinante o extractos de las células tumorales MCF-7.

FIGURAS 7A-7G: Análisis por SELDI-TOF MS

20 El análisis por SELDI-TOF MS del progreso de la transglucosilación de GalNAc en MUC6 (masa molecular, 12144.3, FIG. 7A) utilizando ppGalNAcT1, dependiendo de la cantidad de donador (paneles FIG. 7B-7E), y de la cantidad enzimática (paneles E-G). El panel A sirvió como control para el material de partida MUC6 (reacción de incubación sin UDP-GalNAc). Los valores medios de masa/carga (m/z) (en daltons) se muestran en cada panel sobre el pico medio indicado con una flecha. Para detalles de las condiciones, véase la Tabla 2 siguiente.

25 FIGURAS 8A, 8B:

Comparación de la resolución del método de análisis en el experimento representativo de la FIG. 7G (1 eq. de UDP-GalNAc y 1 µg de ppGalNAcT T1/10 µg de MUC6).

FIG. 8A: Espectro de masas SELDI-TOF ampliado que muestra los detalles del aumento de masa (valores m/z en daltons).

30 FIG. 8B: Perfil de HPLC en fase inversa; condiciones cromatográficas: Waters Symmetry C18 (5 µm, 300 Å, 3,9 x 250 mm), caudal 1 mL/min, gradiente con agua (ácido trifluoroacético 0,1%)/acetonitrilo (10-60%) durante 30 min.

FIGURAS 9A-9B:

Análisis por SELDI-TOF MS de la reacción de conjugación utilizando extractos de células tumorales MCF-7 (FIG. 9B).

35 La FIG. 9A sirvió como control para el material de partida MUC6 (reacción de incubación sin UDP-GalNAc). Los valores medios de masa/carga (m/z) (en daltons) se muestran en ambos paneles en el pico medio indicado con una flecha. Para los detalles de las condiciones, véase la Tabla 2 siguiente.

40 Las FIGURAS 10A y 10B muestran las secuencias de DNA y aminoácidos de MUC6-1 (secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO:8 y secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9; secuencia de ácidos nucleicos de MUC6-1 con cola de His = SEQ ID NO:10) y de MUC6-2 (secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO:11 y secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; secuencia de ácidos nucleicos de MUC6-2 con cola de His = SEQ ID NO:13).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente solicitud, los términos “mucina”, “apomucina”, “Tn”, tienen el significado usual en su campo.

45 Más particularmente, una mucina es definida por un experto en la técnica como una glicoproteína de alto peso molecular ($M > 10^6$) con un alto grado de glicosilación O-enlazada en los residuos de serina y/o treonina. Las glicoproteínas de tipo mucina se polimerizan además por el enlace dependiente de S-S y son los componentes principales de las secreciones epiteliales.

Dos regiones claramente diferentes se encuentran en las mucinas maduras que existen en la naturaleza:

- 50 • las regiones de los extremos amino y carboxi están muy glicosiladas, pero son ricas en cisteínas, que están implicadas probablemente en el establecimiento de enlaces disulfuro dentro y entre los monómeros

de mucina,

- una región central grande formada de múltiples unidades repetitivas en tándem de 10 a 170 residuos en los que hasta la mitad de los aminoácidos son serina o treonina. Esta zona llega a saturarse con cientos de oligosacáridos O-enlazados. También se encuentran en las mucinas oligosacáridos N-enlazados, pero mucho menos abundantes.

El término "apomucina" en la presente memoria se refiere a la porción proteínica, polipeptídica o peptídica de una mucina, en oposición a su(s) componente(s) de carbohidratos.

El antígeno Tn (T independiente) es un carbohidrato N-acetilgalactosamina O-enlazado a un residuo de Ser o Thr de la porción apomucina de una mucina. El antígeno Tn es GalNAc- α 1,O-Ser/Thr.

La invención se refiere a productos, procedimiento y sus aplicaciones, que estén relacionados particularmente con el concepto de proveer glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn, más particularmente glicoconjugados mucina-Tn, y glicoconjugados derivados directamente de ellos por adición de un(os) grupo(s) orgánico(s), tales como glicoconjugados mucina-T y glicoconjugados mucina-sTn:

- que no se obtienen por aislamiento de una fuente que existe en la naturaleza, sino que se obtienen por el procedimiento de síntesis enzimática *in vitro* de la invención, y
- que son capaces de inducir anticuerpos y más particularmente anticuerpos IgG, que reconocen células tumorales humanas.

Más particularmente, los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención son capaces de inducir anticuerpos anti-Tn específicos de células tumorales humanas, preferiblemente IgG y/o IgA anti-Tn específicos de células tumorales humanas, en ausencia de un vehículo proteínico.

Que sepan los inventores de la presente solicitud, la presente invención es la primera descripción de medios que permiten la producción de glicoconjugados de mucina producidos sintéticamente que son capaces de inducir dichos anticuerpos y más particularmente la producción de IgG en ausencia de un vehículo proteínico.

Que sepan los inventores de la presente solicitud, también es la primera vez que se obtiene en cantidades semi-preparativas un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn.

Por consiguiente, como una característica ventajosa de la invención, por administración a un roedor o a un primate no humano o a un ser humano, los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención son capaces de inducir anticuerpos y preferiblemente anticuerpos IgG y/o IgA, que reconocen (es decir, se unen a) una célula tumoral humana, tal como una célula de Jurkat, mientras que la misma mucina, pero no glicosilada no es capaz de dicha inducción de Ig (véase el ejemplo 1 más adelante, en el que se compara la administración del glicoconjugado MUC6-2:Tn(MCF7) con la administración de la proteína MUC6-2 no glicosilada en alumbre más CpG).

Las IgG y/o IgA que son inducidas de acuerdo con la invención están dirigidas contra el glicoconjugado utilizado para inmunización (es decir, contra su componente de carbohidrato, tal como el antígeno Tn y/o contra su cadena principal de MUC).

Las IgG y/o IgA inducidas reconocen (es decir, se unen a) células tumorales y más particularmente células tumorales humanas, tales como, por ejemplo, la línea de células tumorales humanas de Jurkat (ATCC TIB-152) (véase el ejemplo 1 más adelante). Preferiblemente, dichas células tumorales humanas son células tumorales de mama y/o células tumorales de páncreas y/o células tumorales renales y/o células tumorales de estómago y/o células tumorales de próstata y/o células tumorales de ovario y/o células tumorales intestinales y/o células tumorales pulmonares y/o células tumorales colorrectales.

Ventajosamente, este reconocimiento del tumor puede ser específico en el sentido de que un anticuerpo inducido (por ejemplo, IgG y/o IgA) se une a una célula tumoral, pero no se une a una célula no tumoral pero por lo demás equivalente.

El análisis de si un glicoconjugado dado induce anticuerpos (tales como IgG y/o IgA) que reconozcan células tumorales es de la competencia de los expertos habituales de la técnica.

Por ejemplo (véase, por ejemplo, el ejemplo 1 más adelante, véase también la Figura 5), el glicoconjugado que se va a analizar puede ser inyectado i.p. a un ratón BALB/c. Dicho glicoconjugado puede ser inyectado, por ejemplo, en alumbre más CpG; los ratones de control reciben solamente CpG en alumbre. Los sueros se pueden recoger después de la inmunización y se analizan por ELISA y/o FACS para determinar la presencia de IgG dirigida contra el glicoconjugado que se ha utilizado para la inmunización. Los sueros recogidos pueden ser analizados por citometría de flujo para reconocimiento de una célula tumoral, tal como la línea de células tumorales humanas de Jurkat (ATCC TIB-152). El reconocimiento específico se puede evaluar determinando que los sueros recogidos no reconocen una célula no tumoral, tales como una célula de mama y/o una célula de páncreas y/o una célula renal y/o una célula de

estómago y/o una célula de próstata y/o una célula de ovario y/o una célula intestinal y/o una célula pulmonar y/o una célula colorrectal.

Si se desea, los anticuerpos inducidos (por ejemplo, IgG y/o IgA) se pueden purificar a partir de los sueros recogidos.

5 Los glicoconjugados de mucina de la técnica anterior requieren ser acoplados a un vehículo proteínico, tal como KLH. Por consiguiente tienen limitaciones en cuanto a su aplicación para inmunoterapia anti-cancerígena en seres humanos. La respuesta inmunitaria a la molécula vehículo da como resultado un nivel bajo de los anticuerpos deseados, en comparación con la cantidad total de anticuerpos producidos. Esto puede conducir a la supresión inducida por el vehículo de la respuesta inmunitaria dirigida contra la molécula hapténica (Schutze *et al.*, 1985).

10 Al contrario de estos glicoconjugados de la técnica anterior, los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención no requieren estar acoplados a un vehículo proteínico, tal como KLH.

Además, al contrario que los conjugados acoplados a KLH de la técnica anterior, la estructura y la composición de los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención, se pueden determinar precisamente por espectrometría de masas. Esta característica es esencial para satisfacer los requisitos de cuerpos reguladores para su aprobación en seres humanos. La invención proporciona por ello compuestos que están especialmente mucho más adaptados a una aplicación para vacunas anti-tumorales, que los glicoconjugados de la técnica anterior.

La invención se refiere así a glicoconjugados inmunógenos de mucina basados en el antígeno Tn, para su uso como inmunógenos, que, en ausencia de un vehículo proteínico, son capaces de inducir anticuerpos y preferiblemente anticuerpos IgG y/o IgA, que reconocen células tumorales humanas, tal como un célula de Jurkat. Más particularmente, los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención son capaces de inducir anticuerpos anti-Tn específicos de células tumorales humanas, preferiblemente IgG anti-Tn específica de células tumorales humanas, en ausencia de un vehículo proteínico.

Los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención comprenden al menos un resto de carbohidratos, preferiblemente una pluralidad de restos de carbohidratos, unidos a una cadena principal de apomucina.

Al menos uno de estos restos de carbohidratos está O-enlazado directamente a un residuo de Ser o Thr de la cadena principal de apomucina.

En los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención, cada uno de los restos de carbohidratos que están directamente O-enlazados a un residuo de Ser o Thr de dicha cadena principal de apomucina es un resto GalNAc.

La cadena principal de apomucina de los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn, de la invención es ventajosamente una proteína apomucina o un fragmento de apomucina que ha retenido al menos una unidad repetitiva en tándem o un subfragmento de apomucina que ha retenido un fragmento de al menos 15 aminoácidos, preferiblemente de al menos 20 aminoácidos, de la unidad repetitiva en tándem de apomucina.

35 Preferiblemente, dicho fragmento o subfragmento ha retenido dicha capacidad de inducir anticuerpos y más particularmente los anticuerpos IgG y/o IgA, que reconocen las células tumorales humanas, tales como las células de Jurkat.

Dicha cadena principal de apomucina puede ser ventajosamente una variante conservada de una proteína apomucina o de un fragmento de apomucina, habiendo retenido dicha variante conservada la capacidad de inducir anticuerpos, y más particularmente los anticuerpos IgG y/o IgA, que reconocen al menos una célula tumoral humana, tales como las células de Jurkat.

Dicha cadena principal de apomucina puede ser ventajosamente una cadena principal de apomucina producida sintética o recombinantemente, que comprende al menos dos proteínas apomucina y/o al menos dos fragmentos y/o subfragmentos y/o variantes de apomucina. Dicha cadena principal de apomucina es muy ventajosa, puesto que puede conducir a un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn de la invención, que puede ser útil en el tratamiento preventivo y/o paliativo y/o curativo de diferentes tumores.

Cada uno de al menos dichos dos proteínas y/o fragmentos y/o subfragmentos y/o variantes de apomucina pueden tener idénticas secuencias o diferentes secuencias.

50 Cada uno de al menos dichos dos proteínas y/o fragmentos y/o subfragmentos y/o variantes de apomucina pueden proceder del mismo grupo de mucinas (por ejemplo, MUC6 o MUC3 o MUC4 o MUC5).

Cada uno de al menos dichos dos proteínas y/o fragmentos y/o subfragmentos y/o variantes de apomucina pueden proceder de diferentes grupos de mucinas (por ejemplo, MUC6 y MUC3, MUC6 y MUC4, MUC6 y MUC5, MUC3 y MUC4, MUC4 y MUC5, MUC3 y MUC5). Por tanto, al menos dichas dos proteínas apomucinas pueden ser la apomucina de mucinas que pertenecen a diferentes grupos de mucinas. Al menos dichos dos fragmentos o

subfragmentos de apomucina pueden ser los fragmentos o subfragmentos de apomucina de mucinas que pertenecen a diferentes grupos de mucinas.

La cadena principal de apomucina de los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención pueden comprender así la secuencia de aminoácidos de:

- 5 i. al menos una apomucina, y/o
- ii. al menos un fragmento de apomucina, en el que al menos dicho un fragmento comprende al menos una unidad repetitiva en tándem de apomucina y en el que al menos dicho fragmento ha retenido la capacidad de inducir anticuerpos anti-tumorales, por ejemplo, IgG y/o IgA, y/o
- 10 iii. al menos un subfragmento de apomucina, en el que al menos dicho un subfragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de una unidad repetitiva en tándem de apomucina y en el que al menos dicho subfragmento ha retenido la capacidad de inducir anticuerpos anti-tumorales, por ejemplo, IgG y/o IgA, y/o
- 15 iv. al menos una variante conservada de apomucina o de un fragmento como se ha definido en el apartado ii., en donde la secuencia de al menos dicha variante conservada tiene una identidad de al menos 70% con la secuencia de dicha apomucina o fragmento, en toda la longitud de esta secuencia de la proteína o del fragmento, y en el que al menos dicha variante conservada ha retenido la capacidad de inducir anticuerpos anti-tumorales, por ejemplo, IgG y/o IgA.

De acuerdo con una realización ventajosa de la invención, los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención no están enlazados a un vehículo proteínico (es decir, una estructura antigénica, típicamente un péptido, polipéptido o proteína o un hapteno, que sea capaz de estimular la respuesta inmunitaria), tal como KLH, BSA, ovoalbúmina o tiroglobulina.

Dicha apomucina puede ser una apomucina o un fragmento o subfragmento de apomucina que los expertos en la técnica puedan considerar apropiados.

La apomucina se puede aislar de mucinas que existen en la naturaleza o sintetizar de acuerdo con la secuencia de la apomucina o fragmento o subfragmento de apomucina de una mucina conocida. Por tanto, dicha apomucina o fragmento o subfragmento de apomucina, se puede obtener de una célula que existe en la naturaleza (como un extracto celular o por purificación) o a partir de una célula manipulada genéticamente. Las cadenas principales de longitud corta se pueden sintetizar químicamente.

Hasta la fecha, se han identificado veinte mucinas.

30 Las mucinas conocidas incluye principalmente: MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC10, MUC11, MUC12, MUC13, MUC14, MUC15, MUC16, MUC17, MUC18, MUC19, MUC20.

Cada una de MUC1-MUC20 comprende una unidad repetitiva en tándem característica en su región central.

35 Dicha cadena principal de apomucina puede ser así un fragmento o sub-fragmento o variante de la apomucina de MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC10, MUC11, MUC12, MUC13, MUC14, MUC15, MUC16, MUC17, MUC18, MUC19 o MUC20.

La mayoría de las mucinas, tales como MUC1 y MUC2, tienen una expresión ubicua.

De acuerdo con la invención, las mucinas preferidas son por consiguiente las mucinas que tienen un modelo de expresión que está restringido más particularmente a células tumorales, o es específico de ellas, tales como MUC6, MUC3, MUC4 y MUC5.

40 Por ejemplo, las MUC6 y MUC5 son expresadas por las células tumorales de tejidos de mama, pero no son expresadas por células de mama no tumorales, mientras que la MUC1 es expresada tanto por células de mama tanto tumorales como no tumorales. Las MUC5AC, MUC4, MUC6 son expresadas por células tumorales de tejidos de páncreas, pero no son expresadas por células de mama no tumorales, mientras que la MUC1 es expresada por células de páncreas tanto tumorales como no tumorales.

45 La MUC4 está además implicada en la apoptosis.

La estructura respectiva de las diferentes mucinas (y más particularmente, de MUC6, MUC4, MUC3, MUC5) ha sido descrita por Hollingsworth y Swanson, 2004, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia. El recuadro 1 en la página 48 del trabajo de Hollingsworth and Swanson, 2004 describe los dominios de mucina y más particularmente las unidades repetitivas en tándem.

50 La Tabla 3 siguiente muestra las secuencias ilustrativas de unidades repetitivas en tándem de algunas mucinas.

Tabla 3: Secuencias de algunas unidades en tándem de mucinas

	SEQ ID NO:
MUC1 GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP (20 aa)	24
Muc-1 DSTSSPVHSGTSSPATSAPE (20-21 aa) (ratón)	25
MUC2 PTTTPITTTTTVTPTPTGTQT (23 aa)	26
Muc-2 PSTPSTPPPST (11-12 aa) (MLP de rata)	27
MUC3 HSTPSFTSSITTETTS (17 aa)	28
MUC4 TSSASTGHATPLPVD (16 aa)	29
MUC5AC TTSTTSAP (8 aa)	30
MUC5B SSTPGTAHTLVLTATTPTATGSTATP (29 aa)	31
MUC7 TTAAPPTPSATTPAPPSSSAPPE (23 aa)	32

Dicha apomucina puede ser por tanto una apomucina de MUC3 o MUC4 o MUC5.

Por ejemplo, dicha apomucina puede comprender la unidad repetitiva en tándem de MUC3 de SEQ ID NO: 28 o la unidad repetitiva en tándem de MUC4 de SEQ ID NO: 29 o la unidad repetitiva en tándem de MUC5 de SEQ ID NO: 30 o 31, preferiblemente de SEQ ID NO: 30 (MUC5AC).

Como una característica muy ventajosa de la invención, dicha apomucina puede ser una apomucina de MUC6 o uno de sus fragmentos o subfragmentos.

Ejemplos de células manipuladas genéticamente que expresan un fragmento de apomucina de MUC6 son los clones I-3491 e I-3492 de *E. coli*, que fueron depositados el 10 de agosto de 2005 en el CNCM de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest.

El clon I-3491 expresa el fragmento polipeptídico de apomucina, que se denomina MUC6-1 en los ejemplos que se dan más adelante: ha sido clonado a partir de la línea celular de cáncer de mama MCF7 y está asociado al cáncer de mama.

El clon I-3492 expresa el fragmento polipeptídico de apomucina que se denomina MUC6-2 en los ejemplos que se dan más adelante.

La unidad repetitiva en tándem de MUC6 es una secuencia de 169 aa. Las secuencias ilustrativas de una unidad repetitiva en tándem de MUC6 son las secuencias de aminoácido de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15 (véanse las Figuras 1A, 10A, 10B).

De acuerdo con una realización preferida de la invención, los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención comprenden al menos un fragmento o subfragmento de la apomucina antes descrita. Pueden comprender varios de tales fragmentos o subfragmentos.

Dichos fragmentos o subfragmentos son, en la invención, como se han definido en los apartados ii. e iii. anteriores, es decir:

- un fragmento comprende al menos una unidad repetitiva en tándem de apomucina y ha retenido la capacidad de inducción de anticuerpos anti-tumorales, por ejemplo, IgG y/o IgA,
- un subfragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de unidades repetitivas en tándem de apomucina y ha retenido la capacidad de inducción de anticuerpos anti-tumorales, por ejemplo, IgG y/o IgA.

Preferiblemente, dicho al menos un subfragmento, como se ha definido en el apartado iii. anterior, comprende al menos 20 aminoácidos contiguos, más preferiblemente al menos 22 aminoácidos contiguos, más preferiblemente al menos 25 aminoácidos contiguos, incluso más preferiblemente al menos 30 aminoácidos contiguos, todavía más preferiblemente al menos 35 aminoácidos contiguos, de dicha unidad repetitiva en tándem.

Dicho al menos un subfragmento, como se ha definido en el apartado iii. anterior, puede comprender, por ejemplo, aproximadamente una mitad de una secuencia de la unidad repetitiva en tándem (con la condición de que esta mitad de secuencia de la unidad repetitiva en tándem tenga una longitud de al menos 15 aminoácidos).

Por ejemplo, en el caso de MUC6, al menos dicho un subfragmento puede comprender al menos 85 aminoácidos contiguos de la unidad repetitiva en tándem de MUC6. Las secuencias de subfragmentos ilustrativas comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 12 (MUC6-2, véase la Figura 10B).

La secuencia de al menos dicho fragmento, como se ha definido en el apartado iii. anterior, puede consistir en una secuencia de unidades repetitivas en tándem de una proteína apomucina, tal como la unidad repetitiva en tándem de

una apomucina de MUC6 (por ejemplo, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:15), MUC3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 28), MUC4 (por ejemplo, SEQ ID NO: 29) o MUC5 (por ejemplo, SEQ ID NO: 30 o 31, preferiblemente SEQ ID NO: 30).

Ventajosamente, la secuencia de dicha cadena principal de apomucina es o procede de una apomucina de MUC6.

5 Más particularmente, la secuencia de dicha cadena principal de apomucina puede ser:

a. una apomucina de MUC6, o

b. un polipéptido o una proteína, que:

α. comprende al menos una unidad repetitiva en tándem de una apomucina de MUC6, o

10 β. comprende al menos un fragmento conservado de una unidad repetitiva en tándem de apomucina de MUC6, en donde dicho fragmento conservado ha retenido varios residuos de Ser y Thr de al menos 30, o

c. una variante conservada de aminoácidos de una apomucina de MUC6 (como se ha definido en a.) o de un polipéptido o proteína como se ha definido en b. α., en donde la secuencia de dicha variante conservada tiene una identidad al menos del 70% con:

15 - la secuencia de al menos dichas unidades repetitivas en tándem contenida en dicho fragmento de apomucina que contiene unidades repetitivas en tándem de MUC6 (como se ha definido en α.), a lo largo de toda la longitud de esta secuencia de unidades repetitivas en tándem,

y

20 - dicha secuencia variante conservada ha retenido un número de al menos 30 residuos de Ser y Thr.

Preferiblemente dicho número mínimo de residuos de Ser y Thr contenidos en la cadena principal polipeptídica de apomucina derivada de MUC6 o MUC6 es al menos 32, más preferiblemente al menos 35, todavía más preferiblemente al menos 37, mucho más preferiblemente al menos 40, incluso más preferiblemente al menos 45.

25 Los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención pueden tener cualquier porcentaje deseado de O-glicosilación.

Cuando la cadena principal de apomucina que va a ser glicosilada tiene un número pequeño de residuos de Ser y Thr, se puede alcanzar un índice de transferencia de GalNAc muy alto, tal como por ejemplo al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, mucho más preferiblemente al menos 95%, todavía más preferiblemente al menos 98%, incluso más preferiblemente al menos 99%, por ejemplo, 100%.

30 Una característica ventajosa de la invención es que describe un procedimiento que permite alcanzar una alta densidad de Tn en las complejas cadenas principales polipeptídicas o proteínicas, tales como las derivadas de MUC6. En la unidad repetitiva en tándem de MUC6, que contiene 169 aminoácidos, el número total de residuos de Ser y Thr (= sitios potenciales de O-glicosilación) es aproximadamente 83. La invención permite conseguir altos índices de glicosilación en una cadena principal polipeptídica o proteínica tan compleja como una cadena principal de MUC6 o derivada de MUC6 (véase el ejemplo 1 siguiente).

35 De acuerdo con la invención, al menos el 40% del número total de residuos de Ser y Thr contenidos en la cadena principal de apomucina, tal como una cadena principal de MUC6 o derivada de MUC6, puede estar O-enlazada directamente a al menos una N-acetilgalactosamina (GalNAc).

40 En otras palabras, la densidad global de los antígenos Tn contenidos en un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn de la invención, tal como un glicoconjugado de MUC6 o derivado de MUC6 de la invención, es (o la densidad de carbohidratos de los glicopolipéptidos de la invención) al menos 40%.

Más preferiblemente, dicho número total de residuos de Ser y Thr O-enlazados a GalNAc es al menos 41%, todavía más preferiblemente al menos 42%, incluso más preferiblemente al menos 43%, mucho más preferiblemente al menos 45%.

45 Dicho número total de residuos de Ser y Thr O-enlazados a GalNAc puede ser incluso al menos 50%, preferiblemente al menos 51%, más preferiblemente al menos 52%, incluso más preferiblemente al menos 53%, todavía incluso más preferiblemente al menos 55%, mucho más preferiblemente al menos 57%.

50 El procedimiento de la invención permite además la producción de glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn, tales como los glicoconjugados de MUC6 o derivados de MUC6, en donde el número total de residuos de Ser y Thr O-enlazados a GalNAc es al menos 58%, más preferiblemente al menos 60%, incluso más

preferiblemente al menos 61%, todavía incluso más preferiblemente al menos 62%, mucho más preferiblemente al menos 65%.

Por ejemplo, los glicopolipéptidos mucina-Tn de MUC6 o derivados de MUC6 descritos en los ejemplos que se dan más adelante tienen una densidad de Tn (= % de residuos de Ser y Thr O-enlazados a GalNAc) de 42% [MUC6-2:Tn(T1)], 54% [MUC6-2:Tn(MCF7)], 58% [MUC6-1:Tn(MCF7)] y 64% [MUC6-1:Tn(T1)].

El glicoconjugado inmunógeno de mucina basado en el antígeno Tn de la invención comprende preferiblemente al menos un epítipo de CTL en su cadena principal de apomucina.

Ventajosamente, dicho fragmento o subfragmento de apomucina que puede estar incluido en la cadena principal de apomucina de un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn de la invención ha retenido al menos un epítipo de CTL.

De acuerdo con la invención, los fragmentos preferidos de unidades repetitivas en tándem son los que han retenido al menos un epítipo de CTL.

Los expertos en la técnica pueden identificar los epítipos de CTL, por ejemplo, utilizando el sitio de predicciones <http://www.svfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>.

En la secuencia de MUC6-1 de SEQ ID NO:4 mostrada en la Figura 1A (MUC6-1 con cola de His), los epítipos de CTL incluyen principalmente las siguientes secuencias:

- desde la posición 38 hasta la posición 46 (LVTPSTHTV; SEQ ID NO:16);
- desde la posición 66 hasta la posición 74 (GTIPPPTTL; SEQ ID NO:17);
- desde la posición 73 hasta la posición 81 (TLKATGSTH; SEQ ID NO:18);
- desde la posición 67 hasta la posición 75 (TIPPPTTLK; SEQ ID NO:19);
- desde la posición 120 hasta la posición 128 (EVTPTSTTT; SEQ ID NO:20);
- desde la posición 40 hasta la posición 48 (TPSTHTVIT; SEQ ID NO:21);
- desde la posición 68 hasta la posición 76 (IPPPTTLKA; SEQ ID NO:22);
- desde la posición 31 hasta la posición 39 (GRGSSTSLV; SEQ ID NO:23).

En la secuencia de MUC6-1 sin cola de His (SEQ ID NO:9 mostrada en la Figura 10A), así como en las secuencias de MUC6 mostradas en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:15 en la Figura 1A, estos epítipos de CTL corresponden a las secuencias que se extienden:

- desde la posición 4 hasta la posición 12;
- desde la posición 32 hasta la posición 40;
- desde la posición 39 hasta la posición 47;
- desde la posición 33 hasta la posición 41;
- desde la posición 86 hasta la posición 94;
- desde la posición 6 hasta la posición 14;
- desde la posición 34 hasta la posición 40;

de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:15, respectivamente.

En la secuencia de MUC6-2 de SEQ ID NO:5 mostrada en la Figura 1A (MUC6-2 con cola de His), los epítipos de CTL incluyen principalmente las siguientes secuencias:

- desde la posición 38 hasta la posición 46 (LVTPSTHTV; SEQ ID NO:16);
- desde la posición 66 hasta la posición 74 (GTIPPPTTL; SEQ ID NO:17);
- desde la posición 73 hasta la posición 81 (TLKATGSTH; SEQ ID NO:18);
- desde la posición 67 hasta la posición 75 (TIPPPTTLK; SEQ ID NO:19);
- desde la posición 40 hasta la posición 48 (TPSTHTVIT; SEQ ID NO:21);
- desde la posición 68 hasta la posición 76 (IPPPTTLKA; SEQ ID NO:22);

- desde la posición 31 hasta la posición 39 (GRGSSTSLV; SEQ ID NO:23).

En la secuencia de MUC6-2 sin cola de His (SEQ ID NO:12 mostrada en la Figura 10B), estos epítomos de CTL corresponden a las secuencias que se extienden:

- desde la posición 4 hasta la posición 12;
 - 5 - desde la posición 32 hasta la posición 40;
 - desde la posición 39 hasta la posición 47;
 - desde la posición 33 hasta la posición 41;
 - desde la posición 6 hasta la posición 14;
 - desde la posición 34 hasta la posición 40.
- 10 Otros glicoconjugados de mucina preferidos de la invención son los que llevan al menos un neo-epítipo de CTL. En realidad, las glicoproteínas, los glicopolipéptidos y los glicopéptidos se pueden enlazar a una o varias moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) Clase II e inducir CTL que son específicos de carbohidratos (Haurum *et al.* 1994, Aurum *et al.* 1999, Abdel-Motal *et al.* 1996, Apostolopoulos *et al.* 2003, Glithero *et al.* 1999, Speir *et al.* 1999, Xu *et al.* 2004).
- 15 Los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención puede comprender además al menos una entidad, que puede ser una entidad orgánica, tal como una proteína o un polipéptido o un péptido o un carbohidrato, pero que es distinta de una apomucina o un fragmento de apomucina (como se define en la presente memoria) o un antígeno Tn.
- 20 Esta otra entidad puede encontrarse realmente útil y ser elegida por los expertos en la técnica, principalmente para colaborar en la producción de dicho glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn y/o para servir en su detección en una muestra y/o para aumentar sus efectos biológicos.
- Dicho glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn puede comprender, por ejemplo, al menos una entidad que puede ser útil en su purificación a partir de una muestra, tal como una secuencia de cola de His (por ejemplo, los 34 primeros aminoácidos en el extremo N de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5 (véase la Figura 1A)).
- 25 Dicho glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn puede comprender, por ejemplo, al menos una entidad que es útil en la detección de un glicoconjugado en una muestra y principalmente en una muestra biológica.
- Dicho glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn puede comprender, por ejemplo, al menos una cola para purificación y/o detección.
- 30 Dicho glicoconjugado de mucina basados en el antígeno Tn puede comprender, por ejemplo, al menos una entidad que puede ser útil para su secreción a partir de una célula hospedante, tal como un péptido señal.
- Para aumentar sus efectos biológicos, los glicoconjugados de mucina de la invención pueden comprender, por ejemplo, al menos una entidad que es un agente anti-tumoral y/o que ayuda a dirigirlos a una célula tumoral como diana.
- 35 Los glicoconjugados de mucina de la invención pueden tener una cadena principal peptídica lineal, una cadena principal peptídica cíclica o una cadena principal peptídica multivalente. Pueden comprender lípidos (como residuos de palmitoilo), dendrímeros de lisina (tal como la cadena principal de MAG, véase la EP 969 873).
- Aunque la invención permite la producción de glicoconjugados de mucina que son antigénicos en ausencia de un vehículo proteínico, los expertos en la técnica pueden encontrar apropiado o útil, naturalmente, en ciertas circunstancias, acoplarse o asociarse de algún otro modo al glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn con dicho vehículo proteínico. Dicho glicoconjugados acoplado a un vehículo está incluido por consiguiente en el alcance de la invención.
- 40 Sin embargo, la realización preferida de la invención es que el glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn de la invención no comprende ningún vehículo proteínico, tal como KLH.
- La invención se refiere también a los glicoconjugados de mucina que proceden de los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención, por adición de al menos otro grupo carbohidrato distinto de dicho GalNAc O-enlazado directamente, para su uso como inmunógenos.
- 45 El glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn puede comprender más particularmente al menos un resto carbohidrato unido a al menos uno de dichos restos GalNAc O-enlazados directamente.
- Dichos glicoconjugados de mucina derivados incluyen principalmente glicoconjugados mucina-sTn (tales como conjugados glicopeptídicos mucina-sTn) y glicoconjugados mucina-T (tales como conjugados glicopolipeptídicos
- 50 conjugados glicopeptídicos mucina-sTn) y glicoconjugados mucina-T (tales como conjugados glicopolipeptídicos

mucina-T).

En realidad, la sialil-transferasa puede alargar el antígeno Tn con un grupo sialilo formando el antígeno sialosil-Tn o sialil-Tn, (sTn) (NeuAc-alfa(2-6)-GalNAc-alfa-O-Ser/Thr). La expresión de este antígeno es inducida frecuentemente durante el proceso de carcinogénesis.

- 5 El antígeno T (o TF, Thomsen-Friedenreich) es definido por un disacárido de mucina que está O-enlazado a proteínas: Gal-beta1,3-GalNAc-alfa1,O-Ser/Thr. El antígeno Tn (T negativo) es GalNAc-alfa1,O-Ser/Thr. Así, la beta1,3-galactosilación de Tn genera el epítipo T.

10 Por lo tanto, la invención proporciona acceso directo a glicoconjugados de mucina-T, que se obtienen por (al menos una) beta1,3-galactosilación de un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn descrito en la presente memoria.

Dicho al menos un otro grupo carbohidrato puede comprender por tanto, o ser:

- un grupo sialilo (sialil-Tn), tales como Neu5Ac (ácido N-acetilneurámico), Neu5Gc (ácido N-glicolilneurámico), KDN o sus derivados directos, tales como Neu2en5Ac, Neu2en5Gc, KDN2en; o
- Gal.

15 Dicho al menos un otro grupo carbohidrato puede comprender por tanto, o ser:

- un grupo sialilo (sialil-Tn), tales como Neu5Ac (ácido N-acetilneurámico), Neu5Gc (ácido N-glicolilneurámico), KDN o sus derivados directos, tales como Neu2en5Ac, Neu2en5Gc, KDN2en;
- N-acetilmanosamina (ManNAc),
- Gal, o

20 - un grupo carbohidrato que los expertos en la técnica puedan considerar apropiado, principalmente para aplicaciones anti-tumorales, tales como, por ejemplo, un glicolípido, principalmente un antígeno glicosídico, incluyendo glicolípido ácido, tal como, por ejemplo, gangliosidos GD2, GD3 y GM3 (melanoma) y glicolípidos neutros, tales como, por ejemplo, los antígenos Lewis.sup.y (Le.sup.y) (mama, próstata, ovario) y los antígenos Globo H (mama, próstata, ovario).

25 La invención se refiere más particularmente a glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn, en donde al menos dicho un resto carbohidrato enlazado a GalNAc es un resto GalNAc, un grupo sialilo o un resto de galactosa.

30 Los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención pueden comprender más de una apomucina o fragmento o subfragmento de apomucina en sus cadenas principales. Dichos glicoconjugados de mucina basados en Tn tienen la ventaja de adaptarse al tratamiento preventivo y/o paliativo y/o curativo de diferentes patologías de tumores.

Los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención puede tener, por tanto, tienen una cadena principal de apomucina, que comprende la secuencia de:

- al menos dos apomucinas, y/o
- al menos dos fragmentos como se han definido en la presente memoria (véase ii. anterior), y/o
- 35 - al menos dos subfragmentos como se han definido en la presente memoria en iii., y/o
- al menos una apomucina y al menos un fragmento como se ha definido en la presente memoria en ii., y/o
- al menos una apomucina y al menos un subfragmento como se ha definido en la presente memoria en iii., y/o
- 40 - al menos un fragmento como se ha definido en la presente memoria en ii., y al menos un subfragmento como se ha definido en la presente memoria en iii.

Ventajosamente, cada uno de los dos elementos contenidos en dicha cadena principal de apomucina es de diferentes apomucinas, preferiblemente de apomucinas de diferentes grupos de mucinas (por ejemplo, MUC6 y MUC3, MUC6 y MUC4, MUC6 y MUC5, MUC3 y MUC4, MUC3 y MUC5, MUC4 y MUC5).

45 Cada uno de dichos al menos dos fragmentos, y/o de dichos al menos dos sub-fragmentos, y/o de dichos al menos un fragmento y al menos un sub-fragmento, contenido en dicha cadena principal de apomucina es preferiblemente un fragmento, o sub-fragmento, de una apomucina diferente.

Ventajosamente, dicha cadena principal de apomucina comprende la secuencia de aminoácidos de al menos dos

proteínas apomucinas, y/o de al menos dos fragmentos como se definen en la presente memoria en el apartado ii., y/o al menos dos sub-fragmentos como se definen en la presente memoria en el apartado iii. Preferiblemente, cada uno de dichos al menos dos fragmentos o sub-fragmentos es un fragmento, o sub-fragmento, de una apomucina diferente, más preferiblemente de apomucinas de grupos mucina diferentes (por ejemplo, MUC6 y MUC3, MUC6 y MUC4, MUC6 y MUC5, MUC3 y MUC4, MUC3 y MUC5, MUC4 y MUC5).

De acuerdo con una realización muy ventajosa, la secuencia de cada uno de dichos al menos dos fragmentos es la secuencia de la unidad repetitiva en tándem de una proteína apomucina.

La invención se refiere por tanto a un proceso para la producción de una composición inmunógena, que comprende la producción de glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn.

El proceso de la invención es una síntesis enzimática *in vitro*.

El proceso de la invención comprende por tanto la producción *in vitro* de un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn, que, en ausencia de un vehículo proteínico, puede inducir anticuerpos, y más particularmente anticuerpos IgG y/o IgA, que reconocen células tumorales humanas, tales como células de Jurkat. En un aspecto muy ventajoso, el proceso de la invención permite la producción de dichos glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn, en al menos cantidades a escala semi-preparativa (más de 100 microgramos, preferiblemente en cantidades de mg).

El proceso de la invención comprende transferir *in vitro* al menos una N-acetilgalactosamina (GalNAc) a un residuo de Ser o Thr contenido en un aceptor de proteínico o polipeptídico o peptídico, en donde dicha transferencia *in vitro* es una transferencia que se realiza enzimáticamente usando al menos un UDP-N-acetilgalactosamina:polipéptido-N-acetilgalactosaminiltransferasa (ppGalNAc-T).

El proceso de la invención no requiere actividad de células intactas; ni requiere la presencia de células intactas.

El resultado de la implementación del proceso de la invención es que cada uno de los restos de carbohidrato que están O-enlazados directamente al residuo de Ser o Thr de dicha cadena principal de apomucina es un resto GalNAc.

Dicho aceptor proteínico o polipeptídico o peptídico es ventajosamente una cadena principal de apomucina como se define en la presente memoria, es decir, una proteína apomucina o un fragmento de apomucina que tiene retenida al menos una unidad repetitiva en tándem o un sub-fragmento de apomucina que tiene retenido un fragmento de al menos 15 aminoácidos, preferiblemente de al menos 20 aminoácidos, de la unidad repetitiva en tándem de apomucina.

Preferiblemente, dicho fragmento o sub-fragmento es un fragmento conservado que ha retenido dicha capacidad de inducir anticuerpos, y más particularmente anticuerpos IgG y/o IgA, que reconocen células tumorales humanas, tales como células de Jurkat.

Dicho aceptor proteínico o polipeptídico o peptídico puede ser ventajosamente una variante conservada de una proteína apomucina, o de un fragmento o sub-fragmento de apomucina, teniendo retenida dicha variante conservada dicha capacidad de inducir anticuerpos, y más particularmente anticuerpos IgG y/o IgA, que reconocen al menos una célula tumoral humana, tales como células de Jurkat.

Dicho aceptor proteínico o polipeptídico o peptídico puede ser ventajosamente una cadena principal de apomucina producida sintéticamente o recombinantemente que comprende al menos dos proteínas apomucinas, y/o al menos dos fragmentos y/o sub-fragmentos y/o variantes de apomucina.

Cada uno de dichos al menos dos fragmentos y/o sub-fragmentos y/o variantes de apomucina puede tener secuencias idénticas o diferentes.

Cada uno de dichos al menos dos fragmentos y/o sub-fragmentos y/o variantes de apomucina puede proceder del mismo grupo mucina (por ejemplo, MUC6 o MUC3 o MUC4 o MUC5).

Cada uno de dichos al menos dos fragmentos y/o sub-fragmentos y/o variantes de apomucina puede proceder de diferentes grupos mucina (por ejemplo, MUC6 y MUC3, MUC6 y MUC4, MUC6 y MUC5, MUC3 y MUC4, MUC4 y MUC5, MUC3 y MUC5). Por tanto, dichas al menos dos proteínas de apomucina pueden ser la apomucina de mucinas que pertenecen a diferentes grupos de mucinas. Dichos al menos dos fragmentos o sub-fragmentos de apomucina pueden ser los fragmentos o sub-fragmentos de apomucina de mucinas que pertenecen a diferentes grupos de mucinas.

La cadena principal de la proteína o polipéptido o péptido usada como aceptor proteínico o polipeptídico o peptídico en el proceso de la invención tiene las mismas características que la cadena principal de la proteína o polipéptido o péptido de los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn de la invención.

Las características dadas para los productos de la invención se aplican al proceso de la invención.

Hasta la fecha, se han identificado quince ppGalNAc-Ts en mamíferos y se han establecido los perfiles funcionales de cada miembro de la familia mostrando que estas enzimas no sólo tiene diferentes especificidades de sustrato, sino también modelos específicos de expresión en tejidos (Cheng et al. 2004, Ten Hagen et al. 2003).

5 De acuerdo con la invención, la ppGalNAc-Ts apropiada incluye notablemente las que están implicadas en patologías tumorales.

Las ppGalNAc-Ts ventajosas comprenden las ppGalNAc-Ts relacionadas con tumores que se seleccionan de ppGalNAc-T1, ppGalNAc-T2, ppGalNAc-T3, ppGalNAc-T6, ppGalNAc-T7 y ppGalNAc-T13.

Las ppGalNAc-Ts muy ventajosas comprenden las ppGalNAc-Ts que se seleccionan de ppGalNAc-T1, ppGalNAc-T3, ppGalNAc-T6, ppGalNAc-T7 y ppGalNAc-T13.

10 Dicha al menos una ppGalNAc-T puede ser proporcionada en forma pura o purificada o en la forma de un extracto a celular.

15 Dicha al menos una ppGalNAc-T puede ser proporcionada disponiendo de un extracto que contiene enzimas de una célula cancerosa, tal como un extracto de microsomas o un extracto de proteína o proporcionando ppGalNAc-T(s) purificadas de dicho extracto. Se puede emplear cualquier célula cancerosa que el experto en la técnica considere apropiada.

Las células cancerosas preferidas incluyen células de cáncer de mama, tales como la línea celular de cáncer de mama MCF7 (ATCC número HTB-22), células de cáncer de colon, de pulmón, de ovario y de próstata.

20 Dicha al menos una ppGalNAc-T puede ser una ppGalNAc-T producida recombinantemente, por ejemplo una ppGalNAc-T obtenible por expresión y purificación a partir de células de levadura manipuladas por ingeniería genética, tales como un cepa de *Pichia pastoris* (por ejemplo, la cepa KM71 H disponible de Invitrogen) o de células de insectos infectadas por vectores de baculovirus.

25 Dicha transferencia *in vitro* se realiza ventajosamente en condiciones de cantidad de ppGalNAc-T, cantidad de UDP-GalNAc y tiempo de incubación, que sean favorables para el máximo número de transferencias de GalNAc. En efecto, los glicosilados de mucina que tengan los niveles de glicosilación más altos son probablemente los que dan la respuesta inmunitaria más alta, y por tanto son agentes activos muy ventajosos y para la producción de vacunas, y notablemente de vacunas anti-tumorales.

30 Para una cadena principal de apomucina como complejo como una de la apomucina MUC6 (que tiene una unidad repetitiva en tándem de 169 aa), dichas condiciones óptimas incluyen la provisión de dicha al menos una ppGalNAc-T aportando una cantidad al menos 0,1 microgramos de dicha ppGalNAc-T o de extracto celular que contenga dicha ppGalNAc-T por 10 microgramos de dicha apomucina.

35 Dicha cantidad de ppGalNAc-T o de extracto celular que contiene dicha ppGalNAc-T por 10 microgramos de dicha apomucina, preferiblemente es al menos 0,2 microgramos, más preferiblemente al menos 0,3 microgramos, más preferiblemente al menos 0,4 microgramos, aún más preferiblemente al menos 0,5 microgramos, por ejemplo menos que 2 microgramos, preferiblemente menos que 1,5 microgramos, más preferiblemente no superior a 1 microgramo (estando explícitamente abarcado cualquier intervalo de valores que resulte de las combinaciones de estos valores).

Si se desea, se pueden usar diversos ppGalNAc-Ts (preferiblemente una de sus mezclas).

Para una cadena principal de apomucina como complejo, como una de la apomucina MUC6, dichas condiciones óptimas pueden incluir notablemente la provisión de dicho al menos un GalNAc en una cantidad molar equivalente a de 0,5 a 2 equivalentes de UDP-GalNAc, en comparación con los sitios de O-glicosilación potenciales.

40 El tiempo de incubación es dependiente de las cantidades de los reaccionantes (apomucina o fragmentos de apomucina, ppGalNAc-T(s), UDG-GalNAc).

Los tiempos de incubación pueden ser de al menos 10 horas, preferiblemente de al menos 20 horas, por ejemplo de al menos 24 horas.

45 Los reaccionantes, tales como UDP-GalNAc y ppGalNAc-T(s), pueden ser añadidos durante el curso de la reacción, por ejemplo después de 24 horas de reacción.

Dicha transferencia de GalNAc puede ser monitorizada por cualquier medio conocido por la persona experta, tal como por ejemplo HPLC.

De acuerdo una característica muy ventajosa de la presente invención, dicha transferencia de GalNAc es monitorizada por espectrometría de masas SELDI-TOF.

50 SELDI-TOF como se ha indicado antes son las iniciales en inglés de *Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight* es decir, desorción/ionización láser potenciada en la superficie – con analizador del tiempo de vuelo. La espectrometría de masas SELDI-TOF es especialmente ventajosa, cuando la mezcla de reacción tiene una

composición compleja, que es notablemente el caso cuando uno o varios de los reaccionantes se proporcionados como un extracto biológico, tal como un extracto celular que contiene una o varias ppGalNAc-T(s).

Que sepan los inventores, es la primera vez que la espectrometría SELDI-TOF es usada para monitorizar la conjugación en mucina, particularmente cuando la mezcla tiene una composición compleja.

- 5 La solicitud se refiere por tanto al uso de espectrometría de masas SELDI-TOF para monitorizar el curso de la una bioconjugación de GalNAc en una mezcla que contiene un extracto celular.

Cuando la transferencia de GalNAc ha sido conseguida hasta el nivel deseado, los glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn pueden ser purificados en la mezcla de reacción, si se desea, y/o se requiere.

- 10 La purificación se puede realizar, por ejemplo, en una columna de afinidad (por ejemplo, si el glicoconjugado ha sido provisto de una cola de His, por adsorción sobre Ni-NTA-agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania)), y/o por HPLC inversa.

- 15 Por ejemplo, los glicoconjugados resultantes pueden ser purificados usando Ni-NTA-agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania) y luego ser sometidos a HPLC de fase inversa usando un sistema de bombeo Perkin-Elmer con un detector de UV a 230 nm. La columna puede ser una Symmetry 300™ C18 (5 µm, 300 Å, 3,9 x 250 mm) (Waters, Francia). La elución se puede llevar a cabo con un gradiente lineal de acetonitrilo al 10-60% en ácido trifluoroacético al 0,1% en agua a un caudal de 1 mL/min (durante 30 min). El pico puede ser recogido y liofilizado. Las glicoproteínas así obtenidas pueden ser caracterizadas por análisis de aminoácidos (abreviadamente AAA) y espectroscopía de masas.

- 20 Como se ilustra por los ejemplos 1 y 2 más adelante, en todos los ensayos/análisis realizados por los inventores sobre fragmento de apomucina MUC6 en condiciones de GalNAc óptimas, el polipéptido de partida fue totalmente convertido a glicoconjugados (100%). El proceso de la invención, por tanto, tiene una producción de muy alta eficiencia.

Que sepan los inventores, es la primera vez que un polipéptido recombinante glicosilado con el antígeno Tn es obtenido en cantidades semi-preparativas, por el uso de al menos una ppGalNAc-T.

- 25 El proceso de la invención puede ser realizado hasta cualquier % deseado de transferencia de GalNAc. Como se ha mencionado antes, se usa preferiblemente espectrometría de masas SELDI-TOF para monitorizar las reacciones de conjugación.

Una característica ventajosa del proceso de la invención es que facilita la producción de glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn que tienen una alta densidad global de antígenos Tn (= alta densidad de carbohidratos).

- 30 Cuando la cadena principal que ha de ser glicosilada tiene un pequeño número de residuos de Ser y Thr, se puede conseguir naturalmente una muy alta tasa de transferencia de GalNAc, tal como por ejemplo al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 98%, incluso más preferiblemente al menos 99%, por ejemplo 100%.

- 35 Una característica ventajosa de la invención es que facilita además conseguir alta densidad de Tn en las cadenas principales de los polipéptidos complejos, tales como las que se derivan de MUC6. En la unidad repetitiva en tándem de MUC6, el número total de residuos de Ser y Thr (= sitios de O-glicosilación potencial) es aproximadamente 83.

- 40 De acuerdo con la invención, al menos 40% del número total de residuos de Ser y Thr contenidos en una cadena principal de apomucina, tal como una cadena principal de apomucina tal como una cadena principal de MUC6 o derivada de MUC6 a MUC6, pueden estar O-enlazados directamente a al menos una N-acetilgalactosamina (GalNAc).

Más preferiblemente, el número de residuos de Ser y Thr que están O-enlazados directamente a un resto GalNAc es al menos 41%, aún más preferiblemente al menos 42%, incluso más preferiblemente al menos 43%, lo más preferiblemente al menos 45%.

- 45 Dicho número de residuos de Ser y Thr O-enlazados a GalNAc puede ser incluso al menos 50% del número total de residuos de Ser y Thr, preferiblemente al menos 51%, más preferiblemente al menos 52%, incluso más preferiblemente al menos 53%, aún incluso más preferiblemente al menos 54%, lo más preferiblemente al menos 57%.

- 50 El proceso de la invención facilita además producción de glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn, en donde el número de residuos de Ser y Thr O-enlazados a GalNAc es al menos 58% del número total de residuos de Ser y Thr, más preferiblemente al menos 60%, incluso más preferiblemente al menos 61 %, aún incluso más preferiblemente de al menos 62%, lo más preferiblemente de al menos 64%.

Cada intervalo en % que resulta de la combinación de dos valores diferentes de los valores de % de GalNAc está abarcado explícitamente por la invención.

La invención también se refiere a glicoconjugados de mucina basados en el antígeno Tn obtenibles por el proceso de la invención, para sus usos como inmunógenos.

La presente solicitud describe ácidos nucleicos que codifican la apomucina de glicoconjugado basado en el antígeno Tn de la invención.

- 5 Dicha secuencia codificadora puede por ejemplo codificar el fragmento del polipéptido de apomucina de las SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15 (véase la Fig. 1A).

Dicha secuencia codificadora puede codificar, por ejemplo, el fragmento del polipéptido de apomucina de las SEQ ID NO:9 o NO:12 (véanse las Fig. 10A y 10B). Dicha secuencia codificadora puede ser entonces la secuencia de SEQ ID NO:8 o NO:11 (véase la Fig. 10).

- 10 Dicho ácido nucleico puede comprender además un codón de parada en el extremo 3'-terminal de dicha secuencia de glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn.

Dicho ácido nucleico comprende además una secuencia que codifica una cola para purificación y/o detección, tal como una cola de His. Por ejemplo, dicho ácido nucleico puede codificar el fragmento del polipéptido de apomucina con cola His de la SEQ ID NO:4 o NO:5 (véase la Fig. 1A); por ejemplo, puede ser la secuencia de la SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:13 (véanse las Fig. 10A y 10B).

- 15 Dicho ácido nucleico puede comprender además una secuencia delantera (que codifica un péptido señal).

Dicho ácido nucleico puede comprender además una secuencia delantera (que codifica un péptido señal).

La solicitud describe vectores que comprenden al menos uno de dichos ácidos nucleicos codificadores, tales como por ejemplo un plásmido que comprende un origen de replicación y al menos uno de dichos ácidos nucleicos.

Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión.

- 20 La solicitud describe células hospedantes manipuladas por ingeniería genética, que expresan un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn de acuerdo con la invención, como resultado de dicha manipulación por ingeniería genética y/o que han sido manipuladas genéticamente para comprender al menos uno de dichos ácidos nucleicos codificadores y/o al menos uno de dichos vectores.

- 25 Dicha célula hospedante puede ser una célula hospedante transfectada, una célula hospedante infectada o una célula hospedante transformada.

Dicha célula hospedante puede ser cualquier célula hospedante que los expertos en la técnica puedan considerar apropiada. Por ejemplo, puede ser una célula eucariota (por ejemplo, célula de levadura o de mamífero) o una célula procariota (por ejemplo *E. coli*) o una célula de insecto infectada por baculovirus.

- 30 Las células hospedantes ventajosas de la invención comprenden notablemente las células hospedantes *E. coli* depositadas con el número de depósito CNCM I-3491 y con el número de depósito CNCM I-3492, el 10 de agosto de 2005, de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest.

La invención también se refiere por tanto a cualquier glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn expresado por dicha célula hospedante, tal como el glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn de las SEQ ID NO:9 o NO:12 (véanse las Fig. 10A y 10B), para sus usos como inmunógeno.

- 35 La solicitud describe compuestos, que comprenden al menos un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn y al menos una entidad distinta de una mucina, una apomucina, un fragmento de apomucina (como se define en la presente memoria), un antígeno Tn o un carbohidrato. La invención se refiere más particularmente a un complejo inmunitario soluble, que comprende:

- al menos un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn de acuerdo con la invención, y

- 40 - al menos una estructura de inmunoglobulina o al menos un fragmento de inmunoglobulina que es un fragmento Fc, un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)'2, una cadena ligera o una cadena pesada.

El fragmento de apomucina contenido en dicho complejo inmunitario puede ser ventajosamente un fragmento de la apomucina de MUC6 y notablemente un fragmento polipeptídico de apomucina MUC6 (complejo inmunitario de MUC6-Tn soluble).

- 45 El fragmento de apomucina contenido en dicho complejo inmunitario puede ser ventajosamente un fragmento de la apomucina de MUC6 y notablemente un fragmento polipeptídico de apomucina MUC6 (complejo inmunitario de MUC6-Tn soluble).

Por administración *in vivo*, los glicoconjugados de mucina, que son hechos accesibles por la invención tienen las características de ser capaces de inducir anticuerpos, y más particularmente anticuerpos IgG, que son capaces de reconocer células tumorales humanas a través de un mecanismo dependiente del antígeno Tn.

- 50 La inducción de IgG es una característica particularmente útil cuando se consideran una composición inmunógena o un fármaco inmunógeno y vacunas, puesto que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es altamente útil para obtener una respuesta inmunitaria eficiente, notablemente contra células tumorales o pre-

tumorales. Por tanto, la característica de ser capaz de inducción de IgG es una característica muy ventajosa de los glicoconjugados de mucina, y más particularmente los conjugados de glicopolipéptidos de mucina de la invención.

5 Como otra característica muy ventajosa, los glicoconjugados de mucina de la invención son también capaces de dicha inducción de anticuerpos (incluyendo IgG), en ausencia de un vehículo proteínico. La eficiencia de la inmunogenicidad se mejora por tanto, comparada con los glicoconjugados de mucina de la técnica anterior.

También la ausencia de un vehículo proteínico requerida es muy ventajosa, notablemente cuando se contempla la administración a seres humanos.

La solicitud se refiere por tanto a la prevención y/o alivio y/o tratamiento de un estado o enfermedad en el cual están implicadas células tumorales, tales como una condición o estado canceroso o pre-canceroso.

10 Un método de prevención y/o alivio y/o tratamiento comprende la administración de un producto de la invención a un paciente que lo necesite.

La solicitud describe composiciones (por ejemplo, adjuvante, composiciones farmacéuticas, composiciones inmunógenas, fármacos, fármacos inmunógenos y vacunas).

15 El adjuvante, las composiciones, las composiciones farmacéuticas, las composiciones inmunógenas, los fármacos, los fármacos inmunógenos y las vacunas de la solicitud comprenden al menos un producto de la solicitud, es decir al menos uno entre los siguientes elementos:

- dichos glicoconjugados de mucina a base del antígeno Tn,

- dichos ácido nucleicos,

- dichos vectores,

20 - dichas células hospedantes manipuladas por ingeniería genética,

- dichos complejos inmunitarios solubles.

La invención se refiere más particularmente a composiciones, que comprenden al menos un glicoconjugado de mucina basado en el antígeno Tn de la invención y/o al menos un complejo inmunitario soluble de la invención, para sus usos como composiciones inmunógenas.

25 Dichas composiciones están destinadas más particularmente a la prevención y/o alivio y/o tratamiento de un estado o enfermedad en el cual están implicadas células tumorales, tales como notablemente una condición o estado canceroso o pre-canceroso.

30 El adjuvante, las composiciones, las composiciones farmacéuticas, las composiciones inmunógenas, los fármacos, los fármacos inmunógenos y las vacunas de la invención pueden comprender además al menos un vehículo farmacéuticamente y/o fisiológicamente aceptable (vehículo, diluyente, excipiente, aditivo, ajustador del pH, agente emulsionante o dispersante, conservante, tensioactivo, agente gelificante, así como tampones y otros agentes estabilizantes y solubilizantes, etc.).

35 Los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables apropiados incluyen todos los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables conocidos, tales como los descritos en "*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*", 20th edición, Mack Publishing Co.; y "*Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*", Ansel, Popovich and Allen Jr., Lippincott Williams and Wilkins.

40 En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales comprenderán usualmente, además de uno o más agentes de contraste, fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables, incluyendo agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, tampones, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, aceite de sésamo y sus combinaciones, o similares como vehículo. El medio puede contener también materiales auxiliares farmacéuticos convencionales, tales como por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes y similares. El vehículo y la composición pueden ser estériles y la formulación se adapta al modo de administración.

45 Para composiciones sólidas (por ejemplo, las formas polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que han de ser administradas pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes amortiguadores del pH (tampones) y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

La composición pueden ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación prolongada o polvo. La composición puede ser formulada con aglutinantes y vehículos tradicionales y,

tal como triglicéridos.

La invención se refiere más particularmente a composiciones inmunógenas, fármacos inmunógenos y vacunas. Las composiciones inmunógenas, fármacos inmunógenos y vacunas se pueden usar en terapia y/o profilaxis. El término vacuna por tanto en la presente memoria abarca vacunas terapéuticas, así como profilácticas.

- 5 Las composiciones inmunógenas, los fármacos inmunógenos y las vacunas de la invención pueden estar destinados al tratamiento y/o prevención y/o alivio de una condición o estado tumoral o pre-tumoral.

La invención se refiere notablemente a composiciones inmunógenas anti-tumorales, fármacos inmunógenos anti-tumorales y vacunas anti-tumorales de la invención.

En la invención, el término "tumor" significa que abarca "cáncer".

- 10 Dichas condiciones o estados tumorales comprenden notablemente cualquier tipo de carcinoma, adenoma, adenocarcinoma, metaplasia o cualquier tipo de cáncer, y más particularmente los que afectan o pueden afectar a pulmones, mamas, el conducto intestinal, y aún más particularmente los que afectan a un ser humano, tales como:

- Adenocarcinoma de Barret,
- Carcinoma y adenoma intestinal,
- 15 - Carcinoma pulmonar,
- Pólipos colorrectales,
- Carcinoma de mama,
- Colangiocarcinoma de páncreas, riñón, estómago, próstata, ovario.

- 20 ATCC es el acrónimo de *American Type Culture Collection*; P.O. Box 1549; Manassas, VA 20108; U.S.A. (véase, <http://www.lgcpromochem-atcc.com>).

CNCM es el acrónimo de *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes*; Institut Pasteur; 25, rue du Docteur Roux; F-75724 PARIS CEDEX 15; Francia (véase <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Cncm/>).

- 25 La expresión "que comprende", que es sinónima de "que incluye" o "que contiene", se debe entender en sentido amplio y no incluye elemento(s), ingrediente(s) o etapa(s) de métodos adicionales no citados, mientras que el término "que consiste en" es un término restringido, que excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente que no esté explícitamente citado.

La expresión "que consiste esencialmente en" es un término parcialmente amplio, que no excluye elemento(s), etapa(s) o ingrediente(s) adicionales no citados, siempre y cuando estos elemento(s), etapa(s) o ingrediente(s) - no afecten materialmente las propiedades nuevas y básicas de la invención.

- 30 La expresión "que comprende" (o "comprende") por tanto incluye la expresión "que consisten en" ("consiste en"), así como la expresión "que consiste esencialmente en" ("consiste esencialmente en"). Por consiguiente, la expresión "que comprende" (o "comprende") significa, en la solicitud, que más particularmente abarca la expresión "consisten en" ("consiste en"), y la expresión "que consiste esencialmente" ("consiste esencialmente en").

EJEMPLOS

- 35 **EJEMPLO 1: Síntesis enzimática a gran escala de glicoconjugados MUC6-Tn para vacunación anti-tumoral**

RESUMEN

- En el cáncer, las mucinas están O-glicosiladas anómalamente y en consecuencia expresan antígenos tumorales asociados, tales como el determinante Tn (α -GalNAc-OSer/Thr). Dichos antígenos exhiben también un modelo diferente de expresión en comparación con los tejidos normales. En particular, la MUC6, que se expresa normalmente en tejidos gástricos, ha sido detectada en carcinomas intestinales, pulmonares, colorrectales y de mama. Recientemente, el laboratorio de los inventores ha mostrado que la línea celular cancerosa de mama MCF7 expresa *in vivo* glicoproteínas MUC6-Tn. Las mucinas asociadas al cáncer muestran diferencias antigénicas de mucinas normales y, como tales, pueden ser usadas como dianas potenciales para inmunoterapia. Con el fin de desarrollar vacunas anti-cancerosas basadas en el antígeno Tn, los inventores preparamos varios glicoconjugados MUC6-Tn. Para este fin los inventores realizamos la transferencia enzimática GalNAc a dos proteínas MUC6 recombinantes expresada en *E. coli* usando UDP-N-acetilgalactosamina: polipéptido-N-acetilgalactosaminiltransferasas (ppGalNAc-Ts), que catalizan *in vivo* la síntesis del antígeno Tn. Los inventores usamos una mezcla de ppGalNAc-Ts de extractos de células cancerosas MCF7 o una ppGalNAc-T1 recombinante. En ambos casos, los inventores conseguimos la síntesis de glicoconjugados MUC6-Tn a una escala semi-preparativa (cantidades de mg). Estas glicoproteínas exhibieron un alto nivel de antígenos Tn, aunque la densidad global

depende tanto de la fuente de la enzima como del aceptor proteínico. Estos glicoconjugados MUC6-Tn fueron reconocidos por dos anticuerpos monoclonales anti-Tn que son específicos para células cancerosas humanas. Además, el glicoconjugado MUC6-Tn glicosilado que usa extractos de MCF7 como fuente de la ppGalNAc-T fue capaz de inducir anticuerpos IgG que reconocieron una línea celular tumoral humana. En conclusión, la producción en grandes cantidades de MUC6 con glicoformas relevantes para los tumores mantiene una promesa considerable de desarrollar vacunas anti-cancerosas eficientes y están garantizados estudios adicionales de sus propiedades inmunológicas.

INTRODUCCIÓN

En el presente ejemplo, usamos una ppGalNAc-T1 recombinante o un extracto de microsoma de células cancerosas de mama MCF7 que contienen ppGalNAc-Ts, para mimetizar mejor la glicosilación de células cancerosas.

Demostremos que el método enzimático *in vitro* de la invención para la preparación de glicoconjugados MUC6-Tn (transferencia enzimática *in vitro* de GalNAc a los residuos de serina y treonina de la mucina, usando ppGalNAc-Ts) es muy eficiente y permitió la preparación de cantidades semi-preparativas de diferentes glicoproteínas MUC6-Tn con alta densidad de carbohidratos. Los glicoconjugados de MUC6 resultantes demostraron ser antigénicos según se juzga por el reconocimiento por dos anticuerpos (mAb) monoclonales anti-Tn específicos para células cancerosas humanas. Además, el glicoconjugado MUC6-Tn glicosilado que usa extractos de MCF7 como fuente de ppGalNAc-T fue capaz de inducir anticuerpos IgG que reconocen una línea celular tumoral humana.

RESULTADOS

Producción de la proteína MUC6 recombinante en *E. coli* y síntesis enzimática de mucinas MUC6 que expresan Tn.

Para obtener cantidades semi-preparativas de glicoproteínas de MUC6 que expresan el antígeno Tn, diseñamos dos proteínas MUC6 recombinantes, clonadas de la línea celular de cáncer de mama MCF7, y que contenían:

- una unidad repetitiva en tándem completa (MUC6-1; secuencia proteínica de SEQ ID NO:4, en donde los primeros 34 a N-terminales son una secuencia de cola His y los 169 aa siguientes son la secuencia de una unidad repetitiva en tándem de MUC6) o

- una media unidad repetitiva en tándem (MUC6-2; secuencia proteínica de SEQ ID NO:5, en donde los primeros 34 aa N-terminales son una secuencia de cola His y los 85 aa siguientes son la secuencia de una media unidad repetitiva en tándem de MUC6);

Véase la Figura 1A.

Se seleccionaron estas dos diferentes construcciones para estudiar la glicosilación de dos proteínas relacionadas de diferentes tamaños, con diferentes sitios de O-glicosilación potencial (85 para MUC6-1 y 48 para MUC6-2). Se detectaron ligeros cambios de aminoácidos entre los dos cDNA de las MUC6 clonados y los cDNA de MUC6 descritos (hacer concordar la SEQ ID NO:6 y NO:7 con TR1 y TR2) clonados de tejidos gástricos (Toribara *et al.*, 1993) (véase el alineamiento en la Figura 1A). Esto podría atribuirse al alto polimorfismo encontrado en las unidades repetitivas en tándem de mucina.

Los polipéptidos MUC6-1 y MUC6-2 se expresaron en *E. coli* y se purificaron usando Ni-NTA-agarosa (Figura 1B y C).

Un clon de *E. coli* que produce MUC6-1 y un clon de *E. coli* done que expresa MUC6-2 han sido depositados el 10 de agosto de 2005 en el CNCM con los números de acceso I-3491 y I-3492, respectivamente.

Para MUC6-1 fue necesaria una etapa adicional de purificación usando una columna C18 (Figura 1B). Como resultado se obtuvieron las proteínas MUC6-1 y MUC6-2 con un nivel de pureza >95%, según se estimó por HPLC, con un rendimiento de 2 mg y 3,4 mg de proteína por litro de caldo de cultivo, respectivamente.

Estas proteínas mucinas purificada (MUC6-1 o MUC6-2) se sometieron a reacciones de transglicosilación *in vitro* a partir de UDP-GalNAc usando bppGalNAc-T1 recombinante o un extracto celular de MCF7 (Figura 6). Las reacciones se realizaron a escala analítica en condiciones diferentes (tiempo de incubación, equivalentes de UDP-GalNAc y cantidad de enzima). El curso de la transferencia se monitorizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas con desorción/ionización láser potenciada en la superficie con detector de tiempo de vuelo (SELDI-TOF MS) y se seleccionaron los parámetros de reacción que dan la densidad más alta de Tn (véase el ejemplo 2 siguiente). Estas condiciones (véase la Tabla 1 siguiente) se usaron para realizar la síntesis a escala semi-preparativa de MUC6-Tn (~0,3-3 mg).

Tabla 1. Condiciones usadas para los ensayos de transglicosilación y características de los glicoconjugados resultantes

	Equivalentes de UDP-GalNAc ¹	Cantidad de extracto o enzima/ μ g de mucina	Cantidad obtenida (mg)	Rendimiento en producto, (%) ²	Masa molecular experimental (Da) ³	Número medio de GalNAc ³	Tn (%) en peso)	Sitios glicosilados (%) ⁴
MUC6-1	-	-	-	-	20833,7	-	-	-
MUC-61:Tn(T1)	1 eq: 24 h/37°C	0,1 μ g	2,5	59	31778,5	54	34	64
MUC6-1:Tn(MCF7)	(0,5 eq: 24 h/37°C x $\frac{2}{5}$)	(6 μ g) x 2	0,35	25	30718,5	49	32	58
MUC6-2	-	-	-	-	12157,5	-	-	-
MUC6-2:Tn(T1)	1 eq: 24 h/37°C	0,1 μ g	2,5	69	16220,5	20	25	42
MUC6-2:Tn(MCF7)	(0,5 eq: 24 h/37°C x $\frac{2}{5}$)	(6 μ g) x 2	0,5	34	17473,4	26	30	54

En la Tabla 1 anterior:

¹La cantidad equivalente se expresa en comparación con los sitios de O-glicosilación potenciales (es decir, los residuos totales de serina y treonina).

²Los rendimientos de los productos aislados se refieren al rendimiento obtenido después de la reacción de glicosilación y la purificación de la glicoproteína resultante. Los glicoconjugados MUC6-Tn se analizaron respecto a los niveles de endotoxinas y se encontró que eran inferiores a 2 UE/mg de glicoproteína en todos los casos.

³La masa molecular media y el número de GalNAc del glicoconjugado se calcularon a partir del pico medio.

⁴El % de sitios glicosilados obtenidos se calculó teniendo en cuenta el número de GalNAc obtenidos para cada glicoconjugado en comparación con el número total de residuos de serina y treonina en las proteínas (85 para MUC6-1 y 48 para MUC6-2) (100 %)

⁵Se añadieron las mismas cantidades de equivalentes de UDP-GalNAc y enzima al comienzo de la reacción y luego a las 24 horas.

Se consiguió una transferencia máxima de GalNAc puesto que los glicoconjugados de MUC6-Tn no fueron más glicosilados después de ser sometidos de nuevo a las mismas condiciones de reacción de glicosilación. Las glicoproteínas resultantes se analizaron por HPLC (Figuras 2A y 2B), se purificaron y luego se caracterizaron por SELDI-TOF MS (Figuras 2C y 2D). En todos los análisis, la proteína de partida estaba totalmente convertida en glicoconjugados. Los perfiles de SELDI-TOF MS mostraron diferentes niveles de glicosilación de GalNAc de la proteína (pico principal $\pm$ 3 GalNAc) (Figuras 2C y 2D). Una polidispersidad similar se observó en las mezclas brutas y en los glicoconjugados purificados, independientemente del aceptor proteínico y de la fuente de enzima usada.

Caracterización físico-química de los glicoconjugados sintetizados.

Se sintetizaron cuatro diferentes glicoconjugados de MUC6 mediante esta transglicosilación enzimática y se purificaron por Ni-NTA agarosa y HPLC. Luego, se sometieron a análisis por SDS-PAGE (Figura 3) que confirmó la presencia de glicoproteínas purificadas con los pesos moleculares esperados. Las glicoproteínas MUC6 presentaron diferentes contenidos del antígeno Tn, dependiendo de la cadena principal de mucina y de la diferente fuente de ppGalNAc-T usada (Tabla 1). Cuando se usó el extracto de células cancerosas de mama de la línea MCF7, se glicosiló una media de 54-58% de los sitios de O-glicosilación potenciales, lo que representa 30-32% de la masa molecular total, independiente del aceptor de mucina usado. Se obtuvo una densidad de Tn diferente cuando las proteínas mucina fueron glicosiladas por la bppGalNAc-T1 purificada. La MUC6-2 fue menos glicosilada (20 GalNAc, lo que representa 42% de los sitios de O-glicosilación totales). Por otra parte, la MUC6-1 fue mucho más glicosilada por bppGalNAc-T1 puesto que fueron glicosilados 64% de los sitios de O-glicosilación potenciales (54 GalNAc).

Los glicoconjugados MUC6-Tn son reconocidos por los mAb anti-Tn.

Las glicoproteínas MUC6 se identificaron por transferencia Western usando mAb anti-Tn (83D4) y anti-His (Figura 4). Como era de esperar, el mAb anti-His reconoció todas las proteínas MUC6 (incluyendo las MUC6 no glicosiladas) (Figura 4A). Por el contrario, el mAb 83D4 anti-Tn solo reconoció los glicoconjugados de MUC6-Tn (Figura 4B).

La antigenicidad de estos glicoconjugados de MUC6 fue analizada por ELISA usando dos mAb anti-Tn producidos contra células cancerosas humanas (MLS128 y 83D4) y un suero policlonal anti-MUC6. La Figura 4C-D muestra que

ambos MAb anti-Tn, aunque a diferentes tasas, reconocieron los glicoconjugados MUC6-Tn, mientras que no fueron reconocidas las proteínas MUC6 correspondientes no glicosiladas. El mAb 83D4 anti-Tn similarmente reconoció los glicoconjugados de MUC6-1 y MUC6-2 (Figura 4C), mientras que el MLS128 mostró menos reactividad con el glicoconjugado de MUC6-2:Tn(T1), que fue el de menor densidad de Tn (Figura 4D). Todas las proteínas MUC6 glicosiladas y no glicosiladas fueron reconocidas diferentemente por el suero anti-MUC6 (Figura 4E). Las proteínas MUC6 no glicosiladas fueron ligeramente más reactivas que los glicoconjugados de MUC6-Tn, debido probablemente a la falta de accesibilidad a la cadena principal de la proteína en proteínas altamente glicosiladas.

El glicoconjugado MUC6-2:Tn(MCF7) induce anticuerpos que reconocen células tumorales

Se estudió la inmunogenicidad de uno de los glicoconjugados MUC6-Tn. Se inmunizaron ratones BALB/c con el glicoconjugado MUC6-2:Tn(MCF7) o con la proteína MUC6-2 no glicosilada en alumbre más CpG, y los sueros se analizaron respecto a su capacidad de reconocer la línea celular tumoral humana de Jurkat (Figura 5). Los ratones de control sólo recibieron CpG en alumbre. Merece la pena advertir que las glicoproteínas MUC6 mostraron muy bajos niveles de endotoxinas (<2 UE/mg de proteína). La inmunización con el glicoconjugado MUC6-2:Tn(MCF7), pero no con la proteína MUC6-2 no glicosilada, indujo anticuerpos IgG que reconocían la línea celular tumoral humana de Jurkat (Figura 5A).

Para confirmar que estos anticuerpos reconocían el antígeno Tn en estas células, los inventores llevamos a cabo ensayos de inhibición usando asialo-OSM (que lleva el antígeno Tn) u OSM desglucosilado. Como se muestra en la Figura 5B, solamente el asialo-OSM inhibió el reconocimiento de las células de Jurkat por sueros obtenidos después de la inmunización con MUC6-2:Tn(MCF7) y por el mAb 83E14 anti-Tn (usado como control). En contraste, la unión de un anticuerpo anti-CD4 a células de Jurkat no fue afectada en ningún de los dos casos (Figura 5B). Estos experimentos muestran claramente que MUC6-2:Tn(MCF7) puede inducir anticuerpos anti-Tn que reconocen células tumorales Tn+.

DISCUSIÓN

El objetivo de la inmunoterapia del cáncer es producir una inmunidad protectora contra las células cancerosas sin causar daño autoinmunitario colateral. Una aproximación está basada en la inducción de respuestas inmunitarias específicas de tumores por antígenos asociados al cáncer. Para este fin, las mucinas se pueden usar como inmunógenos en vacunas diseñadas para producir inmunidad anti-tumoral terapéutica.

Los cambios asociados al cáncer no sólo ocurren en la expresión de las proteínas mucinas entre tejidos normales y anormales, sino también en el modelo de O-glicosilación que distingue mucinas de cáncer de mucinas normales. En efecto, las mucinas están normalmente muy glicosiladas y por tanto, el núcleo peptídico antigénico está físicamente inaccesible al sistema inmunitario, y particularmente a los anticuerpos. Sin embargo, en células tumorales, las mucinas presentan truncamiento, asociado al cáncer, de las cadenas de carbohidrato O-enlazadas creando los antígenos TF, Tn y sialil-Tn específicos de tumores (Hollingsworth and Swanson 2004). Esto sugiere que dichas mucinas glicosiladas puedan ser usadas para tratamiento de cánceres específicos.

Se han desarrollado diversas vacunas basadas en la estructura del antígeno Tn y se ensayaron en modelos preclínicos o clínicos. La mucina submaxilar ovina desialilada (que expresa altos niveles de Tn) (Singhal *et al.*, 1991) y conjugados de la proteína Tn (Kuduk *et al.*, 1998; Longenecker *et al.*, 1987; solicitud de patente de EE.UU. 2003/0083235 A1; Toyokuni *et al.*, 1994; patente de EE.UU. 5.660.834) indujeron altos títulos de anticuerpos específicos de Tn en ratones dando como resultado la protección contra la amenaza tumoral. En seres humanos, glóbulos rojos desialilados (ricos en antígenos Tn y T) permitieron una protección contra la recidiva de cáncer de mama avanzado (Springer *et al.* 1993). Más recientemente, una prueba clínica con un conjugado de la proteína Tn dio como resultado un efecto anti-tumoral según se determinó por una disminución en la pendiente de PSA (Slovin *et al.*, 2003). Nuestro laboratorio también describió la preparación de una vacuna completamente sintética basada en el antígeno Tn, el glicopéptido antigénico múltiple (abreviadamente MAG por la expresión inglesa *Multiple Antigenic Glycopeptide*) (Bay *et al.* 1997). Las vacunas de MAG:Tn son capaces de inducir, en ratones y en primates no humanos, potentes anticuerpos anti-Tn específicos de tumores que pueden media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos contra células tumorales humanas (Lo-Man *et al.*, 2004). Sin embargo, la preparación a gran escala de dichos conjugados está limitada por la complejidad del proceso completo de síntesis.

Para ampliar más en alcance de nuestra aproximación a las pruebas clínicas, proponemos unir enzimáticamente el antígeno Tn a una proteína de núcleo de mucina. En el presente ejemplo, elegimos la mucina MUC6 que se expresa de un modo anómalo en diferentes cánceres y puede constituir el antígeno diana propiamente dicho. En efecto, la MUC6 ha sido detectada en adenocarcinomas intestinal, pulmonar, de colon y mamario, aunque no se expresa en los tejidos normales respectivos (Bartman *et al.*, 1999, De Bolos *et al.*, 1995, Guillem *et al.*, 2000, Hamamoto *et al.*, 2005, Nishiumi *et al.*, 2003, Pereira *et al.*, 2001). Además, nuestros datos preliminares sugieren que la MUC6 lleva el antígeno Tn en las células cancerosas de mama MCF7 (Freire *et al.* 2005).

En el presente ejemplo, describimos la síntesis enzimática de glicoconjugados de MUC6 que expresan Tn. Para producir altas cantidades de glicoconjugados MUC6-Tn, realizamos la transferencia de GalNAc a la proteína MUC6 recombinante expresada en *E. coli* usando ppGalNAc-Ts. Esta gran familia de enzimas cataliza el enlazamiento *in vivo* de un residuo de GalNAc a serina o treonina (es decir, la síntesis del antígeno Tn). Hasta la fecha, se han

identificado en mamíferos quince ppGalNAc-Ts, y se han establecido los perfiles funcionales de cada miembro de la familia mostrando que estas enzimas no solo tienen diferentes especificidades de sustrato, sino también modelos específicos de expresión en tejidos (Cheng et al. 2004, Ten Hagen et al. 2003).

Las glicosiltransferasas se han usado extensivamente como herramientas para realizar reacciones de transglicosilación puesto que son una alternativa atractiva a la síntesis química total de grandes glicosil-aminoácidos (Marcaurelle and Bertozzi 2002). La síntesis de glicopéptidos y glicoconjugados con glicanos O-enlazados ha sido ya descrita, especialmente para los antígenos sialil-Tn (George et al., 2001) y sialil-T (Ajisaka and Miyasato 2000, George et al., 2001). Las ppGalNAc-Ts se han usado también con éxito para la síntesis *in vitro* de glicopéptidos. La mayoría de los estudios estuvieron dirigidos a investigar las especificidades de estas diferentes enzimas (bien sea recombinantes o procedentes de extractos celulares) para diversos sustratos peptídicos de la MUC1 (Takeuchi et al. 2002) o MUC2 (Irimura et al., 1999, Kato et al., 2001), y fueron realizados a escala analítica (intervalo 0,1-10 µg). Sin embargo, interesantemente las ppGalNAc-T2 y -T4 recombinantes permitieron la preparación de glicopéptidos MUC1-Tn que se usaron para fines de inmunización (Kagan et al., 2005, Sorensen et al., 2005).

En el presente ejemplo, usamos bien sea ppGalNAc-Ts de extractos de células cancerosas o bien ppGalNAc-T1 bovina recombinante purificada para conseguir la transferencia máxima de GalNAc a los residuos de serina y treonina de una proteína recombinante MUC6. Estas dos fuentes de ppGalNAc-T fueron elegidas por dos razones.

Por un lado, se usaron los extractos de células de cáncer de mama para imitar mejor los sitios de O-glicosilación *in vivo* de la MUC6 en células cancerosas.

Por otro lado, la bppGalNAc-T1 recombinante tiene una muy amplia especificidad y se espera que los ensayos de glicosilación *in vitro* usando una proteína recombinante purificada den resultados más reproducibles y permitan una purificación más fácil.

En efecto, el producto obtenido usando ambas fuentes de ppGalNAc-T fue diferente, siendo superior cuando se usa la bppGalNAc-T1 recombinante (59-69 % para bppGalNAc-T1 frente a 25-34 % para extractos de MCF7). Esta diferencia es debida a una etapa adicional necesaria para purificar glicoconjugados MUC6-Tn de la mezcla de reacción que contiene el extracto celular de MCF7.

Aunque recientemente se ha logrado un progreso significativo en la síntesis de glicoconjugados, el acceso a este tipo de macromoléculas sigue siendo muy difícil, particularmente cuando se requieren grandes cantidades. Por lo que sabemos los inventores esta es la primera vez que se obtiene en cantidades semi-preparativas una proteína recombinante glicosilada en el antígeno Tn, mediante el uso de ppGalNAc-Ts. Seleccionando las mejores condiciones para lograr la máxima transferencia de GalNAc, obtuvimos glicoconjugados de MUC6 que llevaban altas densidades del antígeno Tn. Estas diferentes densidades de Tn (54 GalNAc para MUC6-1:Tn(T1), 49 GalNAc para MUC6-1:Tn(MCF7), 20 GalNAc para MUC6-2:Tn(T1) y 26 GalNAc para MUC6-2:Tn(MCF7)) son el resultado de experimentos independientes y reproducibles. Dependiendo de la fuente de la enzima, produjimos glicoconjugados con diferentes niveles del antígeno Tn. Esto podría ser explicado por la especificidad de las ppGalNAc-Ts (no todos los residuos de treonina y serina son reconocidos por una ppGalNAc-T) (Ten Hagen et al., 2003).

También estudiamos la glicosilación de dos proteínas recombinantes MUC6 de diferentes tamaños (203 aa para MUC6-1, y 119 aa para MUC6-2), para evaluar si la transferencia de GalNAc está influenciada por la longitud de la proteína. Cuando usamos una bppGalNAc-T1 recombinante obtuvimos una media de 54 y 20 residuos de GalNAc incorporados de 85 y 48 sitios de O-glicosilación potenciales (número total de residuos de Thr y Ser) para MUC6-1 y MUC6-2 respectivamente, lo que representa aproximadamente 64% y 43 % de sitios de O-glicosilación. Estudios estructurales ayudarían a determinar si estas distintas tasas de glicosilación son debidas a una falta de accesibilidad de bppGalNAc-T1 para los sitios aceptores en la proteína mucina.

Es de principal importancia en el diseño de vacunas contra el cáncer que el antígeno de la vacuna imite al antígeno del tumor. Para sintetizar estructuras próximas a las agrupaciones de Tn naturales presentes en las células cancerosas, también realizamos la transferencia de GalNAc usando extractos de células cancerosas de mama de la línea MCF7, que pueden expresar diversas isoformas de ppGalNAc-T, como ya habían mostrado otras líneas de células cancerosas humanas (Freire et al., 2005, Mandel et al., 1999, Marcos et al., 2003). En este caso, se obtuvieron densidades similares de GalNAc, siendo 49 para MUC6-1 y 26 para MUC6-2, lo que representa 58% y 54%, respectivamente, de los sitios de O-glicosilación potenciales. Por tanto, el grado de glicosilación obtenido con la bppGalNAc-T1 recombinante purificada y los extractos de células de MCF7 es diferente y, sorprendentemente, la densidad de Tn no es necesariamente más alta en el segundo caso. Esto podría ser explicado por la presencia de diferentes ppGalNAc-Ts en el extracto celular, que actúan de una manera coordinada y secuencial y pueden contribuir positivamente o negativamente a la glicosilación global de la proteína.

La mayoría de los anticuerpos anti-Tn producidos contra las células o tejidos cancerosos reconocen grupos de epítomos de Tn adyacentes denominados usualmente agrupaciones de Tn. En efecto, los MAb 83D4 y MLS128 anti-Tn requieren la presencia de al menos dos residuos de Tn consecutivos para el reconocimiento del sustrato (Nakada et al., 1993, Osinaga et al., 2000). Teniendo en cuenta que el 2/3 de los residuos de Thr y Ser en MUC6-1 y MUC6-2 están dispuestos en agrupaciones, es altamente probable que la mayoría de los antígenos Tn estarán presentados, al menos, como agrupaciones de dos Tn. La relevancia potencial de los glicoconjugados MUC6-Tn para la

inmunoterapia tumoral es puesta de manifiesto por análisis de su antigenicidad. En efecto, el antígeno Tn de MUC6 fue reconocido por anticuerpos monoclonales específicos de Tn, tales como MLS128 y 83D4 y confirma la presencia de agrupaciones de Tn. Están en curso análisis de la O-glicosilación en proteínas MUC6 para determinar los sitios de glicosilación en los diferentes glicoconjugados MUC6-Tn.

- 5 Como ejemplo, hemos mostrado que uno de los glicoconjugados MUC6-Tn es inmunógeno. En efecto, MUC6-2:Tn(MCF7) indujo anticuerpos IgG en ratones, que fueron capaces de reconocer células tumorales humanas a través de un mecanismo dependiente de Tn. Que sepamos los inventores este es el primer trabajo que describe la inducción de anticuerpos específicos de células tumorales humanas después de inmunización con una proteína derivada de mucina que lleva el antígeno Tn, sin un vehículo proteínico. En efecto, los glicopéptidos derivados de mucina usado en calidad de inmunógenos son conjugados de KLH (Kagan *et al.*, 2005, Sorensen *et al.*, 2005).

En conclusión, el método de transglicosilación de una proteína mucina recombinante presentado en la presente solicitud es muy conveniente y eficaz, puesto que el 100% de la proteína de partida se convirtió en especies glicosiladas.

- 15 Además, se consigue una alta relación de glicosilación. La capacidad de producir MUC6 recombinante con glicoformas relevantes para tumores en grandes cantidades es única y será extremadamente valiosa para estudios preclínicos, inmunológicos y de protección frente a tumores. La potencia anti-tumoral de los glicoconjugados MUC6-Tn está actualmente en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación de MUC6 y expresión in *E. coli*.

- 20 Se aisló un clon de cDNA, que contenía una unidad repetitiva en tándem de MUC6 humana, del cDNA total de células de cáncer de mama MCF7 por RT-PCR y se clonó en pGem-T (Promega, Francia). Los productos de la PCR se diseñaron para codificar una unidad repetitiva en tándem de MUC6 humana (MUC6-1, 169 aminoácidos) o una mitad de la unidad repetitiva en tándem (MUC6-2, 85 aminoácidos) que fueron amplificados con DNA polimerasa Pfu y los cebadores:

- 25 - MUC6-F, 5'-cgggatccTCCACCTCCTTGGTGA-3' (SEQ ID NO:1), y
- MUC6-1R (para MUC6-1) de secuencia 5'-ggaagcttTAGAAAGGTGGAACGTG-3' (SEQ ID NO:2), o MUC6-2R (para MUC6-2) de secuencia 5'-ggaagcttATTAGGATGGTGTGTGGA-3' (SEQ ID NO:3),

(los caracteres en letra minúscula indican sitios de restricción para *Bam*HI y *Hind*III en los cebadores delantero e inverso, respectivamente).

- 30 Después de la digestión con *Bam*HI y *Hind*III, cada producto se clonó en el vector pET28a(+)(Novagen, Fontenay-sous-Bois, Francia), de modo que codificara una proteína que lleva una cola de seis histidinas en el extremo N. Se seleccionaron transformantes de *E. coli* DH5 α (ATCC 53868) en placas LB que contenían 50 μ g/ml de kanamicina y los clones positivos se conformaron por PCR y secuenciación.

- 35 Se purificaron los plásmidos de clones seleccionados y se usaron para transformar *E. coli* células químicamente competentes BLi5 (Novagen, Fontenay-sous-Bois, Francia). Los recombinantes se expresaron en *E. coli* BLi5 por inducción con IPTG 1 mM y se purificaron sobre columnas de ácido nitriloacético Ni²⁺ en condiciones de desnaturalización de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Alemania). La proteína MUC6-1 se purificó además por HPLC usando un sistema de bombeo Perkin-Elmer con un detector UV a 230 nm. La columna fue una Symmetry 300TM C18 (5 μ m, 300 Å, 3,9 x 250 mm) (Waters, Francia). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de acetonitrilo al 10-60% en ácido trifluoroacético al 0,1% en agua a un caudal de 1 mL/min (en 30 min). Las proteínas MUC6 se caracterizaron por análisis de aminoácidos (AAA) y SELDI-TOF MS. Estos análisis, junto con una secuenciación N-terminal mostraron que ambas proteínas carecen de un residuo de metionina N-terminal.

Extracto de línea celular de cáncer de mama

- 45 La línea de células cancerosas MCF7 (ATCC número HTB-22) fue hecha crecer hasta 90% de confluencia en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Inc., Cergy Pontoise, Francia) con suero de bovino fetal al 10%, piruvato 1 mM, glutamina 2 mM y CO₂ al 5% a 37°C. Después de tripsinización, las células fueron lavadas tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se volvieron a suspender en sacarosa 250 mM y se homogeneizaron. Luego las células se centrifugaron a 3.000 g durante 10 min a 4°C. El líquido sobrenadante se centrifugó de nuevo a 100.000 g durante 1 h a 4°C. El sedimento se volvió a suspender en imidazol 0,1 M, pH 7,2 y Triton X-100 al 0,1%. El extracto celular se repartió en partes alícuotas y se conservó a -80°C. La concentración de proteína se determinó por el método BCA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

ppGalNAc-T1 recombinante bovina

Una forma soluble de la ppGalNAc-T1 bovina (bppGalNAc-T1) se expresó en la levadura *Pichia pastoris* cepa

KM71H (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) y se purificó del cultivo sobrenadante (véase Duclos *et al.*, 2004).

La región codificadora del cDNA para la forma soluble de la bppGalNAc-T1 (desde el aminoácido 52 hasta el 559) fue introducida en 3' de la región codificadora de la secuencia señal del factor α de un vector de expresión pPICZ α A (Invitrogen) modificado para introducir una cola de 6 His N-terminal y una cola FLAG C-terminal. La cepa KM71H se hizo competente usando el kit *Pichia EasyComp*TM (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) y se transformó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 120 horas de inducción en metanol al 0,5%, la bppGalNAc-T1 secretada se purificó en Ni-NTA-agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania) como se ha descrito (Duclos *et al.*, 2004). Las fracciones que contenían actividad enzimática se reunieron y dializaron contra agua ultra-pura, la proteína se liofilizó y conservó a -20°C hasta su uso. La actividad específica de la bppGalNAc-T1 recombinante se analizó como se ha descrito previamente (Duclos. *et al.*, 2004) y se estimó en 3 U/mg de proteína (1 unidad transfiere 1 μ mol de GalNAc por minuto a 37°C al péptido aceptor [STP]5).

Transferencia *in vitro* de GalNAc a proteínas MUC6

1. Usando extractos de MCF7

Se seleccionaron las condiciones óptimas para la glicosilación *in vitro* de ambas proteínas MUC6 después de analizar diferentes condiciones de ensayo en una escala analítica y caracterizar las glicoproteínas resultantes por SELDI-TOF MS (Ciphergen Biosystems, California) como se describe en el ejemplo 2. Explicado brevemente, un extracto de microsoma de células de cáncer de mama MCF7 se incubaron a 37°C con UDP-GalNAc y se purificaron MUC6-1 o MUC6-2 en imidazol 50 mM pH 7,2 que contenía MnCl₂ 15 mM y Triton-X100 al 0,1%. Se tomaron partes alícuotas en diferentes momentos y se congelaron a -20°C. Se activaron las superficies de una matriz de chips IMAC30 con NiCl₂ 100 mM a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se lavaron con agua y PBS. Se incubaron manchas con partes alícuotas de la mezcla bruta de glicosilación durante 40 minutos a temperatura ambiente usando el adaptador del bio-procesador, y luego se lavaron con Triton-X100 al 0,1% en PBS (2 x 5 min), PBS (3 x 2 min) y 5 mM HEPES (2 x 5 min). Los chips se leyeron luego en el instrumento (Ciphergen ProteinChip Reader, PBS II), y de cada mancha en el chip se tomó una muestra para análisis por láser. Los espectros se trataron usando el programa informático Ciphergen ProteinChip 3.2.1.

Como resultado, se eligieron y usaron las siguientes condiciones para ensayos de transferencia de glicosilación a escala semi-preparativa. La MUC6-1 o MUC6-2 purificada (40-80 μ M) se incubó con extracto de MCF7 (6 μ g de proteína/ μ g de mucina) y UDP-GalNAc (2 equivalentes por equivalente de Thr/Ser en glicoproteínas de mucina) en imidazol 50 mM pH 7,2 que contenían MnCl₂ 50 mM y Triton-X100 al 0,1% a 37°C. Después de 24 horas de incubación, se añadieron las mismas cantidades de extracto de MCF7 y UDP-GalNAc y se incubaron durante otras 24 horas los glicoconjugados MUC6-1:Tn o MUC6-2:Tn resultantes fueron purificados usando Ni-NTA-agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania) y luego se sometieron HPLC en fase inversa usando un sistema de bombeo Perkin-Elmer con un detector UV a 230 nm. La columna fue una Symmetry 300TM C18 (5 μ m, 300 A, 3,9 x 250 mm) (Waters, Francia). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de acetonitrilo al 10-60% en ácido trifluoroacético al 0,1% a un caudal de 1 mL/min (en 30 minutos). El pico se recogió y luego se liofilizó. Las glicoproteínas MUC6-1:Tn y MUC6-2:Tn fueron caracterizadas por AAA y espectrometría de masas.

2. Usando bppGalNAc-T1

Las condiciones semi-preparativas óptimas de transferencia de GalNAc usando bppGalNAc-T1 se establecieron usando la tecnología Ciphergen® como se ha descrito para los extractos de MCF7. La proteína MUC6-1 o la MUC6-2 purificada (40-80 μ M) se incubó con UDP-GalNAc (2 equivalentes por equivalente de Thr/Ser en glicoproteínas de mucina) y bppGalNAc-T1 (0,1 μ g/ μ g de mucina) en MES 50 mM, pH 6,5 que contenía MnCl₂ 15 mM durante 24 horas a 37°C. El glicoconjugado MUC6-1:Tn o MUC6-2:Tn fue sometido directamente a HPLC de fase inversa y se purificó como se ha explicado antes. El pico fue recogido, liofilizado y caracterizado por AAA y espectrometría de masas.

Anticuerpos

El mAb 83D4 (IgM) (Pancino *et al.*, 1991) que reconoce específicamente el antígeno Tn (Osinaga *et al.*, 2000) se produjo en un ratón inmunizado con suspensiones de células obtenidas de cortes embebidos en parafina y fijados con formol de un cáncer de mama humano invasivo (Pancino *et al.*, 1990). Luego se precipitó en fluidos ascíticos por diálisis contra agua desmineralizada a 4°C, se disolvió en un pequeño volumen de NaCl 0,5 M en PBS, y se purificó cromatografía de precipitación en gel sobre Sephacryl S-200.

El mAb anti-Tn MLS128 (IgG1) y el mAb MLS128 (p50): Numata *et al.*, 1990) se obtuvieron de un ratón inmunizado con células de cáncer de colon humano (LS180) (Numata *et al.*, 1990) y se purificaron por cromatografía de afinidad sobre proteína A-Sepharose. Ambos mAb anti-Tn reconocieron residuos Tn organizados en agrupaciones (Nakada *et al.*, 1993, Osinaga *et al.*, 2000).

Se obtuvo un anti-suero MUC6-2 por inyección de ratones BALB/c con 10 μ g de MUC6-2 purificada (véase más adelante) en alumbre (1 mg) y CpG (10 μ g). Los ratones fueron inyectados i.p. los días 0, 21 y 42 y sangrados los días 20, 28 y 49. La reactividad del anti-suero MUC6-2 contra MUC6-1 y MUC6-2 fue confirmada por ensayos ELISA

y el suero se conservó a -20°C hasta su uso.

Reconocimiento de MUC6-1:Tn y MUC6-2:Tn por mAb anti-Tn y suero anti-MUC6

Se revistieron placas de microtitulación (Nunc, Dinamarca) con glicoproteínas sintetizadas *in vitro* (0,1 µg/ml) y se secaron durante la noche. Las placas se lavaron tres veces con Tween 20 al 0,1% en PBS (PBS/T) y se bloquearon los sitios de unión no específicos con gelatina al 1% en PBS (PBSIG) durante 2 horas a 37°C. Después de lavar, se añadieron los mAb anti-Tn (83D4 o MLS128) o un suero policlonal anti-MUC6 y se incubó durante 2 horas a 37°C. Después de tres lavados con PBS/T, las placas se incubaron con conjugados de IgM anti-ratón de cabra o de anti-IgG peroxidasa (Sigma, St. Louis, Mo) diluidos en PBS/TG durante 1 hora a 37°C. Las placas se revelaron usando o-fenilendiamina/H₂O₂ y se leyeron fotométricamente a 492 nm en un auto-lector de ELISA (Dynatech, Marnes la Coquette, Francia).

Análisis de transferencia Western de glicoconjugados MUC6-Tn

Se analizaron glicoproteínas MUC6-Tn por transferencia Western usando un mAb anti-His (Qiagen, Hilden, Alemania) y el mAb anti-Tn 83D4. Los (glico)conjugados se separaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 13% y se transfirieron a hojas de nitrocelulosa (Amersham, Saclay, Francia) a 30 voltios durante una noche, Tris-HCl 20 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, etanol al 10% como ya se ha descrito (Towbin et al. 1992). Los sitios de unión de proteínas residuales fueron bloqueados por incubación con seroalbúmina bovina (BSA) al 3% en PBS a 37°C durante 2 horas. La nitrocelulosa se incubó luego con el mAb anti-His o el mAb anti-Tn 83D4 durante 2 horas a 37°C. Después de tres lavados con PBS que contenía Tween 20 al 0,1% y BSA al 1%, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con inmunoglobulinas anti-ratón de cabra conjugadas a peroxidasa (Sigma, St. Louis, Mo) diluidas en PBS que contenían Tween-20 al 0,1% y BSA al 1,5%, y las reacciones se revelaron con quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham, Saclay, Francia). El mismo método se realizó omitiendo los anticuerpos como control negativo.

Determinación del nivel de endotoxinas

Se determinó el nivel de endotoxinas en todas las proteínas MUC6 glicosiladas y no glicosiladas de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el lisado de amebocitos *Limulus*, kit QCL-1000 (Cambrex, Francia).

Immunización de ratones

Se adquirieron ratones BALB/c hembras de seis a ocho semanas a Janvier (Le Genest Saint-Isle, Francia). A los ratones se les inyectó i.p. tres veces MUC6-2 o MUC6-2:Tn(MCF7) (10 µg) mezclado con alumbre (1 mg) (Serva, Heidelberg, Alemania) más CpG (10 µg) (Prologo, Francia) a intervalos de tres semanas (5 ratones por grupo). Los ratones de control recibieron alumbre más CpG solo. Después de cada inmunización se recogieron sueros y se analizaron respecto a la presencia de anticuerpos anti-MUC6 y anti-Tn por ELISA y FACS.

Citometría de flujo

Se analizaron sueros de ratón a una dilución 1:500 mediante citometría de flujo en la línea celular tumoral humana de Jurkat (ATCC TIB-152). Las células se incubaron primeramente durante 15 minutos con sueros a 4°C en PBS que contenía suero de bovino fetal al 5% y azida de sodio al 0,1 %. Luego, se incubaron 15 minutos con un anticuerpo de cabra IgG anti-ratón conjugado a PE (Caltag, Burlingame, CA). Se analizaron células fijadas con paraformaldehído en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA) y los análisis se realizaron con el programa informático *CellQuest* (Becton Dickinson). Para los ensayos de inhibición las células se incubaron con sueros mezclados con diluciones seriadas de asialo-OSM [ovine submaxillary mucin = mucina submaxilar ovina] u OSM desglucosilada preparada como se ha descrito previamente en Tettamanti- G, Pigman W. (1968), Mendicino J, Sangadala S. (1998), Freire T., Casaravilla C., Carmona C., Osinaga E., (2003), durante 15 minutos a 4°C. Luego se reveló la unión de los anticuerpos a las células usando un anticuerpo de cabra IgG anti-ratón conjugado a PE. El mAb anti-Tn 8304 se usó como control positivo. También se usó un mAb anti-CD4 (Caltag, Burlingame, CA) para verificar que la unión de este mAb a las células no fue afectada por las proteínas OSM.

EJEMPLO 2: Monitorización eficiente de una reacción de conjugación enzimática por espectrometría de masas por desorción/ionización láser potenciada en la superficie con detección del tiempo de vuelo (SELDI-TOF MS) para optimización del proceso

Resumen

El análisis eficiente de las reacciones de bioconjugación es una de las tareas más desafiantes para optimizar y finalmente conseguir la producción reproducible de grandes cantidades de conjugados. En particular, la complejidad de algunas mezclas de reacción impide el uso de la mayoría de los métodos existentes, debido a la presencia de grandes cantidades de contaminantes. Como un método alternativo, usamos la espectrometría de masas con desorción/ionización láser potenciada en la superficie con indicador de tiempo de vuelo (SELDITOF MS) para monitorizar una transglucosilación enzimática *in vitro* de residuos de N-acetilgalactosamina a una proteína mucina recombinante MUC6. Para esta reacción, catalizada por la uridina-5'-difosfo-N-acetilgalactosamina:polipéptido-N-acetilgalactosaminiltransferasas (ppGalNAcT), usamos ppGalNAcT1 recombinante o una mezcla de ppGalNAcTs

contenida en extractos de células tumorales MCF-7.

En el presente ejemplo, mostramos como la técnica SELDI-TOF MS ofrece ventajas únicas sobre las metodologías tradicionales. Es un método analítico rápido, preciso, sensible, reproducible y muy conveniente para monitorizar el curso de una bioconjugación, incluso en muestras heterogéneas, tales como extractos celulares. La técnica SELDI-TOF MS demostró ser muy útil para optimizar los parámetros de reacción de transglicosilación y para conseguir la preparación a gran escala de mucinas glicosiladas en el antígeno Tn para aplicaciones en inmunoterapia anti-tumoral.

INTRODUCCIÓN

La tecnología de la bioconjugación se ha usado ampliamente en casi todas las disciplinas de investigación en las ciencias de la vida (Niemeyer *et al.*, 2004, Hermanson 1996). Una de las zonas de aplicación es la preparación de conjugados hapteno-vehículo para fines de inmunización, producción de anticuerpos e investigación sobre vacunas. En efecto, pequeñas moléculas de haptenos, tales como carbohidratos no pueden producir una respuesta inmunitaria por sí mismas. Para hacerlas inmunógenas deben ser acopladas a una molécula vehículo adecuada, típicamente una proteína

Las características del conjugado resultante desempeñan un papel crítico en la intensidad y la calidad de la respuesta inmunitaria. En particular, varios grupos han descrito la influencia de la densidad de haptenos sobre el nivel, la especificidad y la afinidad de los anticuerpos producidos (Hubbard *et al.*, 1993, Singh *et al.*, 2004). Por tanto, es muy importante un seguimiento estricto de la conjugación para la producción de reproducible de conjugados.

Usualmente se emplean diferentes aproximaciones para analizar estos conjugados y asegurar su preparación óptima. La elección del método depende de las propiedades físico-químicas tanto del hapteno como del vehículo, así como de la estrategia de reticulación. Los métodos más frecuentemente usados implican espectrometría de masas, asociada con cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o no (Oda *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 2004, Welter *et al.*, 2003, Weller *et al.*, 2003, Adamczyk *et al.*, 1996-9), filtración por gel (Hermanson *et al.*, 1993), absorción (Pauillac *et al.*, 2002) y fluorescencia (Singh *et al.*, 2004, Weller *et al.*, 2003), espectroscopía, electroforesis en gel (Pawlowski *et al.*, 2000, Singh *et al.*, 2004, Adamczyk *et al.*, 1996), ensayos colorimétricos para reacciones que implican grupos sulfhidrilo (Riddles *et al.*, 1979), grupos amino (Sashidhar *et al.*, 1994) o residuos de carbohidratos (Manzi *et al.*, 1993).

Aunque estos métodos existentes son eficientes adolecen de varios inconvenientes. Primeramente, dichos métodos requieren frecuentemente más tratamiento de las muestras, consumen mucho tiempo, y no son fáciles de realizar cuando se han de analizar muchas muestras. Además, corrientemente no son muy precisos y solo dan una estimación aproximada del peso molecular y de la integridad de los conjugados. Finalmente, la complejidad de algunas mezclas de reacción (extractos celulares, sueros, homogeneizados de tejidos, etc) puede afectar adversamente a la eficacia del análisis, debido a la presencia de grandes cantidades de otros compuestos (lípidos, detergentes, sales, otras proteínas, etc).

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos analíticos rápidos y sensibles para monitorizar las reacciones de bioconjugación, particularmente con muestras heterogéneas y complejas. Adicionalmente, dichos métodos eficientes son esenciales en el desarrollo, para optimizar procesos y aumento de escala en la producción de los conjugados, al mismo tiempo que aseguren una consistencia de un lote a otro.

La tecnología de matrices *ProteinChip*® o la espectrometría de masas con desorción/ionización láser potenciada en superficie con detector de tiempo de vuelo (SELDI-TOF MS) permite el análisis de mezclas de proteínas complejas combinando dos técnicas potentes, la cromatografía y la espectrometría de masas. Después de la retención selectiva sobre una superficie de chip, los compuestos de interés son subsiguientemente analizados por un espectrómetro de masas con desorción/ionización por láser. Esta técnica ha sido satisfactoriamente usada en muchos campos, por ejemplo, descubrimiento de biomarcadores, estudio de interacciones biomoleculares, determinación de perfiles de proteínas, análisis de modificaciones pos-traducción, etc (Tang *et al.*, 2004, Issaq *et al.*, 2002).

En comparación con estas aplicaciones, se han descrito muy pocos ejemplos hasta ahora que muestren el uso de SELDI-TOF para la monitorización de una reacción (química o enzimática) o para el análisis del producto resultante. Recientemente, se ha realizado satisfactoriamente en un chip el análisis directo de péptidos o proteínas después digestión enzimática (Caputo *et al.*, 2003, Merchant *et al.*, 2000) o hidrólisis ácida limitada (Lin *et al.*, 2001), con el fin de identificar secuencias de proteínas. Se han realizado también reacciones enzimáticas en un chip y subsiguiente caracterización para estudiar modificaciones pos-traducción. Usando este método, el grado de glicosilación de un anticuerpo recombinante ha sido monitorizado con un método de desglicosilación que usa PNGasa F (Cleverley *et al.*, 2003) y se ha evaluado el estado de fosforilación de un péptido o una proteína después de la acción de una quinasa (Cardone *et al.*, 1998) o una fosfatasa (Voderwülbecke *et al.*, 2005). Este último ejemplo incluyó un estudio en el curso del tiempo.

En otro estudio de caracterización, Hubalek *et al.*, han descrito el análisis de péptidos tripticos biotinilados después de digestión de monoamina-oxidasas recombinantes humanas, y subsiguiente purificación en una columna de

afinidad. Similarmente, fue identificado por SELDI-TOF MS un péptido liberado enzimáticamente de un péptido sintético relacionado con el receptor 2 activado por proteinasa (Dulon *et al.*, 2005). Interesantemente, SELDI-TOF MS ha permitido también seguir el curso del proceso de auto-activación de una proteína bacteriana, directamente del sobrenadante del cultivo (Boyle *et al.*, 2001).

- 5 Finalmente, la utilidad de SELDI-TOF MS ha sido demostrada para monitorizar la unión de oligosacáridos bacterianos a una proteína, por un método de conjugación que usa química del diéster del ácido escuárico (Cherniak *et al.*, 2001, Saksena *et al.*, 2003). Sin embargo, la reacción fue un ligamiento químico en una mezcla sencilla compuesta del oligosacárido derivatizado con el enlazador sintético, el vehículo proteínico y el tampón.

- 10 Que sepamos los inventores, SELDI-TOF MS nunca se ha usado para monitorizar una reacción de conjugación enzimática *in vitro* en una mezcla compleja.

- Entre las moléculas de haptenos, los carbohidratos tienen un interés particular puesto que son parte de determinantes bacterianos y son también antígenos asociados a tumores (TAA). Como resultado de ello, se han desarrollado un gran número de conjugados carbohidrato-proteína como vacunas contra enfermedades infecciosas y cáncer (Lo-Man *et al.*, 2004). Se ha descrito la preparación de varios conjugados que presentan el antígeno Tn (α -D-GalNAc-Ser/Thr) (Lo-Man *et al.*, 2004, Kuduk *et al.*, 1998, Slovin *et al.*, 2003) que es un carbohidrato TAA sobre-
15 expresado en cánceres de mama, pulmón, próstata y colon (Springer 1984, Freire *et al.*, 2003). Los glicopéptidos resultantes (Lo-Man *et al.*, 2004) o glicoproteínas (Kuduk *et al.*, 1998, Slovin *et al.*, 2003) han demostrado ser candidatos a vacunas altamente prometedores para abordar cánceres.

- 20 Sin embargo, la preparación de dichos conjugados implica tediosas síntesis multi-etapa y/o purificaciones que llevan mucho tiempo. Para superar estas dificultades, los inventores desarrollamos un método enzimático para producir un glicoconjugado de proteína con una alta densidad de Tn.

- Los conjugados Tn-mucinas son dianas atractivas para inmunoterapia anti-tumoral puesto que los carbohidratos han demostrado ser una parte esencial de las estructuras asociadas a los tumores dentro de las mucinas (Grinstead *et al.*, 2002). Como cadena principal de la proteína los inventores elegimos la mucina gástrica MUC6 (Toribara *et al.*, 1993) que ha sido descrita en diferentes tumores, incluyendo carcinomas de pulmón (Hamamoto *et al.*, 2005, Nishiumi *et al.*, 2003) y de mama (De Bolos *et al.*, 1995, Pereira *et al.* 2001). Esta mucina es un sustrato natural de las uridina-5'-difosfo-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc):polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasas (ppGalNAcTs, EC 2.4.1.41) que son las enzimas responsables para la síntesis del antígeno Tn *in vivo*.
25

- 30 Con el fin de conseguir la preparación a gran escala de los conjugados MUC6-Tn para inmunoterapia anti-tumoral los inventores realizamos la transferencia enzimática *in vitro* del antígeno Tn al aceptor mucina. En la presente memoria los inventores describimos la monitorización de los conjugación por SELDI-TOF MS y mostramos que este método es muy rápido y eficiente para optimizar los parámetros de reacción incluso en mezclas complejas.

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Clonación de MUC6 y expresión en E. coli.

- 35 Se aisló por RT-PCR un clon de cDNA que contenía una unidad repetitiva en tándem de MUC6 del cDNA total de células de cáncer de mama MCF7 y se clonó en pGem-T (Promega, Francia). Los productos de la PCR se diseñaron para codificar una mitad de la unidad repetitiva en tándem (87 aminoácidos) que fueron amplificados como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los recombinantes se expresaron en *E. coli* Bli5 por inducción con IPTG 1 mM y se purificaron sobre columnas de Ni^{2+} -ácido nitriloacético en condiciones de desnaturalización de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Alemania).
40

Extractos de líneas celulares de cáncer de mama.

- Se hizo crecer la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATCC número HTB-22) hasta 90% de confluencia en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Inc.) con suero de bovino fetal al 10%, piruvato 1 mM y glutamina 2 mM y CO_2 al 5% a 37°C. Después de tripsinización, las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se re-suspendió en PBS y se homogeneizó. Las células se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C y a 100.000 g durante 1 hora a 4°C. El sedimento resultante se volvió a suspender en imidazol 0,1 M, pH 7,2 y Triton X-100 al 0,1%. Los extractos celulares se repartieron en partes alícuotas y se conservaron a -80°C. La concentración de proteína se determinó por el método BCA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).
45

- 50 *Ga/NAc transferasa 1 de polipéptido recombinante de bovino*

Una forma soluble de ppGalNAc-T1 bovina (Duclos *et al.*, 2004) se expresó en la cepa de levadura *Pichia pastoris* KM71H (Invitrogen) y se purificó como se ha descrito en el ejemplo 1.

Transferencia in vitro de GalNAc a proteínas MUC6.

Se incubaron fracciones de microsoma de células cancerosas de MCF7 a 37°C con UDP-GalNAc y se purificó la

MUC6 recombinante en imidazol 50 mM pH 7,2 que contenía MnCl₂ 50 mM y Triton-X100 al 0,1%. Cuando se usó la ppGalNAc-T1 recombinante, la proteína purificada MUC6 se incubó con UDP-GalNAc en MES 50 mM, pH 6,5 durante 24 horas a 37°C. Se tomaron partes alícuotas a diferentes tiempos y se congeló a -20°C. Las diferentes condiciones de reacción se detallan en la Tabla 2 siguiente.

5 **Tabla 2:**

Condiciones de la reacción de transglucosilación, y cantidad media de GalNAc de los conjugados resultantes

Fig.	Cantidad de UDP-GalNAc (eq) ^a	Cantidad de enzima (µg de proteína / 10 µg de mucina)	Tiempo de reacción (h)	Masa molecular media observada (Da) ^c	Cambio en masa (ΔM)	Cantidad media de GalNAc/mucina (µm/Mg) ^d
7A	0	1 (ppGalNAcT1)	24	12144,3	-	-
7B	2	0,01 (ppGalNAcT1)	24	13170,0	1025,7	5 (5,05)
7C	2	0,04 (ppGalNAcT1)	24	13778,8	1634,5	8 (8,04)
7D	2	0,2 (ppGalNAcT1)	24	15018,2	2873,9	14 (14,14)
7E	2	1 (ppGalNAcT1)	24	16036,1	3891,8	19 (19,15)
7F	1	1 (ppGalNAcT1)	24	15806,6	3662,3	18 (18,02)
7G	0,5	1 (ppGalNAcT1)	24	15598,8	3454,5	17 (17,0)
8A	0	65 (extractos celulares de MCF-7)	24	12144,8	-	-
8B	2	130 (extractos celulares de MCF-7) ^b	48	17037,3	4892,5	24 (24,08)

En la Tabla 2 anterior:

^a La cantidad equivalente molar se expresa en comparación con los sitios potenciales de O-glicosilación (47 residuos de serina y treonina);

10 ^b Se añadieron 65 µg al comienzo de la reacción y se repitió la adición de 65 µg a las 24 horas;

^c La masa molecular media del neo-glicoconjugado se calculó a partir del pico medio que está marcado con una flecha en las Figuras 1 y 2;

^d Masa de GalNAc M_g = 203,19.

15 El conjugado MUC6-Tn resultante se purificó usando Ni-NTA-agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania) y luego se sometió a HPLC de fase inversa usando un sistema de bombeo Perkin-Elmer con un detector UV a 230 nm. La columna fue una Symmetry 300TM C18 (5 µm, 300 Å, 3,9 x 250 mm) (Waters, Francia). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de acetonitrilo al 10-60% en ácido trifluoroacético al 0,1% en agua a un caudal de 1 ml/min (durante 30 minutos). El pico se recogió y luego se liofilizó. La glicoproteína MUC6-Tn se caracterizó por análisis de aminoácidos y espectrometría de masas.

20 **Monitorización de la reacción por SELDI-TOF**

Se activaron las superficies de las matrices de chips IMAC30 con NiCl₂ 100 mM a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se lavaron con agua y PBS. Se incubaron manchas con una mezcla de glicosilación total durante 40 minutos a temperatura ambiente usando el adaptador del bio-procesador, y luego se lavaron con al Triton-X100 0,1% en PBS (2 x 5 min), PBS (3 x 2 min) y HEPES 5 mM (2 x 5 min). Luego se leyeron los chips en el instrumento PBS II, y de cada mancha en la matriz se tomó una muestra para análisis por láser. Los espectros se trataron usando el programa informático Ciphergen ProteinChip 3.2.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La proteína recombinante MUC6 se sometió a la reacción de transglucosilación del donador activado por carbohidratos UDP-GalNAc en presencia de la enzima, una ppGalNAcT1 recombinante (Duclos *et al.*, 2004), o una

mezcla de ppGalNAcTs contenida en los extractos celulares tumorales de MCF-7 (FIG. 6). Se retiraron pequeñas partes alícuotas de la mezcla de reacción y se analizaron directamente por SELDI-TOF MS después de inmovilización en la superficie de la matriz del *ProteinChip* a través de la captura por afinidad al metal inmovilizado (IMAC30).

5 Como se muestra en las Figuras 7A-7G, la ppGalNAcT1 puede catalizar muy eficientemente la transferencia *in vitro* de residuos GalNAc a la proteína MUC6. El progreso de la reacción se monitoriza por el desplazamiento a masas superiores, causado por la transferencia de los residuos GalNAc, en comparación con la masa del material de partida (Figura 7A). Los espectros presentan un conjunto de picos que muestran las masas moleculares incrementales de los conjugados y que permiten determinar la estequiometría media hapteno-proteína, así como la
10 distribución/polidispersidad de los conjugados.

La reacción de transglicosilación se estudió bajo diversas condiciones experimentales (véase la Tabla 2).

La extensión de la transferencia se analizó con 2 eq. de donador de UDP-GalNAc (la cantidad equivalente molar se refiere a los sitios de O-glicosilación potenciales, es decir, los residuos totales de serina y treonina) y cantidades variables de la ppGalNAcT1 recombinante, después de 24 horas de incubación. Como se muestra en la Figura 7B-
15 7E, la adición de la enzima da como resultado un desplazamiento pronunciado y progresivo de los espectros que muestran un aumento significativo en glicosilación con una cantidad media de Tn de 5 (FIG. 7B) a 19 (FIG. 7E).

Más adición de enzima sola o enzima junto con UDP-GalNAc no mejoró significativamente la transferencia. Análogamente, un periodo de incubación mayor de 24 horas no produjo un aumento observable en la masa molecular, mostrando que se había alcanzado un nivel máximo de Tn, al menos en estos tipos de condiciones.

20 El efecto de la cantidad de donador se presenta en los Paneles E-G (Figura 7). Cuando se usaron cantidades inferiores de UDP-GalNAc, se encontró que el perfil por SELDI-TOF MS era comparable, aunque se observó una ligera disminución en la transferencia con 0,5 eq. de donador (FIG. 7G).

Para producir grandes cantidades de conjugados mientras se ahorra el costoso donador UDP-GalNAc, los inventores elegimos las condiciones experimentales de la FIG. 7F para el aumento de escala de esta reacción (1 eq. de UDP-GalNAc y 1 µg de enzima/ 10 µg de MUC6). Cuando la transglicosilación se realizó en cantidades semi-preparativas (intervalo en mg de mucina), se encontró que el número de residuos GalNAc transferidos era
25 virtualmente el mismo que el obtenido en el nivel analítico. Como resultado se ha conseguido la preparación de multi-miligramos de neo-glicoconjugados y la evaluación de sus propiedades inmunológicas se recoge en el ejemplo 1.

30 La ampliación del espectro representativo con las condiciones seleccionadas (FIG. 7F) muestra los detalles del incremento de masa (FIG. 8A). La diferencia entre cada pico corresponde a la masa media esperada de un solo residuo de GalNAc (203,193), lo que demuestra que SELDI-TOF MS es un método resolutorio, al menos en este intervalo de masa molecular. En contraste, el perfil por HPLC en fase inversa no muestra ninguna separación de las diferente especies (FIG. 8B).

35 La técnica SELDI-TOF cuando se aplicó luego al análisis de la transglicosilación en mezclas más complejas, es decir con los catalizadores (enzimas) ppGalNAcTs contenidos en los extractos de células tumorales MCF-7 (Figura 9). La distribución de masas obtenida con la mezcla bruta es similar a la observada con la enzima recombinante. Sin embargo, la tasa de transferencia es mejor puesto que después de 50 horas de reacción se ha conseguido una densidad media de 24 Tn/molécula de proteína y dos adiciones de extractos celulares (FIG. 9B). El hecho de que la
40 estequiometría Tn-proteína máxima resultante sea superior en el caso de ppGalNAcT1 indica que la transferencia no solo está limitada por la conformación de la proteína (falta de accesibilidad de residuos de serina y treonina) sino también por la especificidad de las enzimas.

Interesantemente, la presencia de numerosos contaminantes en los extractos celulares afecta acusadamente a la relación señal-a-ruido, mostrando que la técnica SELDI-TOF puede ser útil para dichos análisis complejos.

45 Por tanto, aunque la monitorización de una reacción de conjugación química ha sido descrita previamente por P. Kováč y colaboradores (Chemyak *et al.*, 2001, Saksena *et al.*, 2003), los inventores mostramos en el presente texto que dicha monitorización se puede hacer también para una reacción enzimática en una mezcla compleja (extractos celulares) sin interferencia de los contaminantes. Estos resultados implican que SELDI-TOF MS es una poderosa herramienta para monitorizar una reacción de bioconjugación. Esta técnica proporciona una alternativa muy eficaz a
50 los métodos de análisis tradicionales.

Primeramente, es un método sensible y preciso puesto que los conjugados podían ser analizados eficientemente desde tan poca cantidad 10 ng (intervalo de 1 pmol), al menos en el intervalo de masa molecular de 10.000 – 20.000 con incrementos de masa de aproximadamente 203. Los vehículos proteínicos tradicionales que se usan para fines de inmunización tienen usualmente una masa molecular superior, desde aproximadamente 60.000 [(seroalbúmina bovina (BSA), toxoide de la difteria) a varios millones (hemocianina de lapa bocallave (KLH)]. La precisión y
55 resolución de SELDI-TOF MS estará definitivamente limitada en el intervalo de masa molecular superior, en particular para la KLH. Esto dependerá también de la masa molecular del hapteno. Para superar estos problemas

puede considerarse el uso de puntas de pipetas ZipTip®. Este método implica una limpieza a micro-escala de la muestra que luego se puede aplicar al espectrómetro de masas de alta resolución (MALDI o electropulverización) permitiendo análisis eficaces en el intervalo de alto peso molecular. Sin embargo, es digno de mención que para bajos pesos moleculares, la tecnología de matrices *ProteinChip*® sigue siendo más sencilla puesto que permite la etapa de purificación y el análisis de la masa en el mismo dispositivo. Esto elimina la necesidad de una etapa de transferencia y da como resultado una recuperación óptima de la muestra.

En segundo lugar, el método es muy rápido, puesto que puede realizarse sobre la mezcla de reacción bruta sin necesidad de purificar o derivatizar la muestra antes del análisis. Además, el hecho de que varias muestras puedan ser analizadas fácilmente en paralelo puede ser muy valioso para estudiar el impacto de diversas condiciones sobre la eficiencia de la conjugación. Por tanto, SELDI-TOF MS es potencialmente muy útil para las estrategias de optimización a alta producción.

Finalmente, los hallazgos de los inventores indican que SELDI-TOF MS es adecuado para analizar muestras en bruto complejas de conjugaciones enzimáticas *in vitro*.

La técnica puede ser también aplicable directamente para monitorizar reacciones intracelulares realizadas *in vivo*. Dichos análisis ya han sido descritos en fuentes de cultivos de fermentación o cultivos celulares para optimizar la producción de proteína recombinante (Clverley *et al.*, 2003, Savage *et al.*, 2004) o para analizar la secreción y auto-activación de una proteína bacteriana (Boyle *et al.* 2001). Estudios similares sobre proteínas mucinas están actualmente en curso en el laboratorio.

ABREVIATURAS (se facilitan las correspondientes en inglés por ser universalmente conocidas)

BCA: ácido bicinónico; BSA: seroalbúmina bovina; HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etano-sulfónico; HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución ; IPTG: isopropil-β-D-tiogalactósido; mAb: anticuerpo(s) monoclonal(es); MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; PBS: solución salina tamponada con fosfato; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; ppGalNAc-T: UDP-N-acetilgalactosamina: polipéptido-N-acetilgalactosaminil-transferasa; SDS-PAGE: electroforesis en gel de dodecil-sulfato sódico-poliacrilamida; SELDI-TOF MS: espectrometría de masas con desorción/ionización láser potenciada en la superficie – con analizador del tiempo de vuelo; UDP-GalNAc: uridina-5'-difosfo-N-acetilgalactosamina

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Motal, U.M., Berg, L., Rosen, A., Bengtsson, M., Thorpe, C.J., Kihlberg, J., Dahmen, J., Magnusson, G., Karlsson, K.A., and Jondal, M. (1996) *Eur J Immunol* 26, 544-551.

Adamczyk, M.; Gebler, J. C.; Mattingly, P. G. (1996) Characterization of protein-hapten conjugates. 2. Electrospray mass spectrometry of bovine serum albumin-hapten conjugates. *Bioconjug. Chem.* 7, 475-481.

Agrawal, B., Gendler, S.J. and Longenecker, B.M. (1998) The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today*, 4, 397-403.

Ajisaka, K. and Miyasato, M. (2000) Efficient synthesis of a sialyl T-antigen-linked glycopeptide by the chemoenzymatic method. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 1743-1746.

Amigorena, S. and Bonnerot, C. (1999) Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunol Rev*, 172, 279-284.

Apostolopoulos, V., McKenzie, I.F.C. and Pietersz, G.A. (1996) Breast cancer immunotherapy: Current status and future prospects. *Immunol Cell Biol*, 74, 457-464

Apostolopoulos, V., Yuriev, E., Ramsland, P.A., Halton, J., Osinski, C., Li, W., Plebanski, M., Paulsen, H., and McKenzie, I.F. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15029-15034.

Bartman, A.E., Sanderson, S.J., Ewing, S.L., Niehans, G.A., Wiehr, C.L., Evans, M.K. and Ho, S.B. (1999) Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. *Int J Cancer*, 80, 210-218

Bay, S., Lo-Man, R., Osinaga, E., Nakada, H., Leclerc, C. and Cantacuzene, D. (1997) Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine. *J Peptide Res*, 49, 620-625.

Boyle, M. D.; Romer, T. G.; Meeker, A. K.; Sledjeski, D. D. (2001) Use of surface-enhanced laser desorption ionization protein chip system to analyze streptococcal exotoxin B activity secreted by *Streptococcus pyogenes*. *J. Microbiol. Methods* 46, 87-97.

Caputo, E.; Moharram, R.; Martin, B. M. (2003) Methods for on-chip protein analysis. *Anal. Biochem.* 321, 116-124.

Cardone, M. H.; Roy, N.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Franke, T. F.; Stanbridge, E.; Frisch, S.; Reed, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

- Chen, Y., Zhao, Y.H., Kalaslavadi, T.B., Hamati, E., Nehrke, K., Le, A.D., Ann, D.K. and Wu, R. (2004) Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30, 155-165.
- 5 Cheng, L., Tachibana, K., Iwasaki, H., Kameyama, A., Zhang, Y., Kubota, T., Hiruma, T., Kudo, T., Guo, J.M. and Narimatsu, H. (2004) Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15. *FEBS Lett*, 566, 17-24.
- Chemyak, A.; Karavanov, A.; Ogawa, Y.; Kovac, P. (2001) Conjugating oligosaccharides to proteins by squaric acid diester chemistry: rapid monitoring of the progress of conjugation, and recovery of the unused ligand. *Carbohydr. Res.* 330, 479-486.
- 10 Cleverley, S.; Bengio, S.; Boschetti, E.; Spencer, J. (2003) Direct "on-chip" protein-expression monitoring. *Genet. Eng. News* 23,
- Cool, D. R.; Hardiman, A. (2004) C-terminal sequencing of peptide hormones using carboxypeptidase Y and SELDI-TOF mass spectrometry. *Biotechniques* 36, 32-34.
- 15 Danishefsky, S. J.; Allen, J. R. (2000) From the laboratory to the clinic : a retrospective on fully synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 836-863.
- De Bolos, C., Garrido, M. and Real, F.X. (1995) MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology*, 109, 723-734.
- Duclos, S., Da Silva, P., Vovelle, F., Piller, F. and Piller, V. (2004) Characterization of the UDP-N-acetylgalactosamine binding domain of bovine polypeptide alphaN-acetylgalactosaminyltransferase T1. *Protein Eng Des Sel*, 17, 635-646.
- 20 Dulon, S.; Leduc, D.; Cottrell, G. S.; D'Alayer, J.; Hansen, K. K.; Bunnett, N. W.; Hollenberg, M. D.; Pidard, D.; Chignard, M. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables PAR2 in respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* in press,
- 25 Filshie, R.J., Zannettino, A.C., Makrynika, V., Gronthos, S., Henniker, A.J., Bendall, L.J., Gottlieb, D.J., Simmons, P.J. and Bradstock, K.F. (1998) MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. *Leukemia*, 12, 414-421.
- Finn, O.J., Jerome, K.R., Henderson, R.A., Pecher, G., Domenech, N., Magarian-Blander, J. and Barratt-Boyes, S.M. (1995) MUC-1 epithelial tumour mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev*, 145, 61-89.
- 30 Freire, T., Bay, B., von Mensdorff-Pouilly, S. and Osinaga, E. (2005) Molecular basis of incomplete O-glycan synthesis in MCF-7 breast cancer cells: putative role of MUC6 in Tn antigen expression. *Cancer Res*, 65, 7880-7887.
- Freire, T.; Osinaga, E. (2003) Immunological and biomedical relevance of the Tn antigen. *Immunology (Spain)* 22, 27-38.
- Freire T, Casaravilla C, Carmona C, Osinaga E. (2003) *Int J Parasitol.* 33, 47-56
- Gendler, S.J. and Spicer, A.P. (1995) Epithelial Mucin Genes. *Annu Rev Physiol*, 57, 607-634.
- 35 George, S.K., Schwientek, T., Holm, B., Reis, C.A., Clausen, H. and Kihlberg, J. (2001) Chemoenzymatic synthesis of sialylated glycopeptides derived from mucins and T-cell stimulating peptides. *J Am Chem Soc*, 123, 11117-11125.
- Gilewski, T., Adluri, S., Ragupathi, G., Zhang, S., Yao, T.J., Panageas, K., Moynahan, M., Houghton, A., Norton, L. and Livingston, P.O. (2000) Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin Cancer Res*, 6, 1693-1701.
- 40 Glithero, A., Tormo, J., Haurum, J.S., Arsequell, G., Valencia, G., Edwards, J., Springer, S., Townsend, A., Pao, Y.L., Wormald, M., Dwek, R.A., Jones, E.Y., and Elliot, T. (1999) *Immunity* 10, 63-74.
- Grinstead, J. S.; Koganty, R. R.; Krantz, M. J.; Longenecker, B. M.; Campbell, A. P. (2002) Effect of glycosylation on MUC1 humoral immune recognition: NMR studies of MUC1 glycopeptide-antibody interactions. *Biochemistry* 41, 9946-9961.
- 45 Grinstead, J.S., Schuman, J.T. and Campbell, A.P. (2003) Epitope mapping of antigenic MUC1 peptides to breast cancer antibody fragment B27.29: a heteronuclear NMR study. *Biochemistry*, 42, 14293-14305.
- Guillem, P., Billeret, V., Buisine, M.P., Flejou, J.F., Lecomte-Houcke, M., Degand, P.R., Aubert, J.P., Triboulet, J.P. and Porchet, N. (2000) Mucin gene expression and cell differentiation in human normal, premalignant and malignant esophagus. *Int J Cancer*, 88, 856-861.

- Gum, J.R., Jr., Crawley, S.C., Hicks, J.W., Szymkowski, D.E. and Kim, Y.S. (2002) MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochem Biophys Res Commun*, 291, 466-475.
- Hamamoto, A., Abe, Y., Nishi, M., Fujimori, S., Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Oida, Y., Miyazaki, N., Inada, K.I., Ueyama, Y., Iwasaki, M., Inoue, H. and Nakamura, M. (2005) Aberrant expression of the gastric mucin MUC6 in human pulmonary adenocarcinoma xenografts. *Int J Oncol*, 26, 891-896
- Haurum, J.S., Arsequell, G., Lellouch, A.C., Wong, S.Y., Dwek, R.A., McMichael, A.J., and Elliot, T. (1994) *J Exp Med* 180, 739-944.
- Haurum, J.S., Hoier, I.B., Arsequell, G., Neisig, A., Valencia, G., Zeuthen, J., Neefjes, J., and Elliot, T. (1999) *J Exp Med* 190, 145-150.
- Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate techniques*. Academic Press.
- Higuchi, T., Orita, T., Nakanishi, S., Katsuya, K., Watanabe, H., Yamasaki, Y., Waga, I., Nanayama, T., Yamamoto, Y., Munger, W., Sun, H.W., Falk, R.J., Jennette, J.C., Alcorta, D.A., Li, H., Yamamoto, T., Saito, Y. and Nakamura, M. (2004) Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. *J Biol Chem*, 279, 1968-1979.
- Hilkens, J., Ligtenberg, M.J.L., Vos, H.L. and Litvinov, S.V. (1992) Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property. *Trends Biochem Sci*, 17, 359-363.
- Ho, S.B., Robertson, A.M., Shekels, L.L., Lyftogt, C.T., Niehans, G.A. and Toribara, N.W. (1995) Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology*, 109, 735-747.
- Hollingsworth, M.A. and Swanson, B.J. (2004) Mucins in cancer: Protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*, 4, 45-60.
- Houen, G.; Olsen, D. T.; Hansen, P. R.; Petersen, K. B.; Barkholt, V. (2003) Preparation of bioconjugates by solid-phase conjugation to ion exchange matrix-adsorbed carrier proteins. *Bioconjug. Chem.* 14,75-79.
- Hubbard, A. K.; Lohr, C. L.; Hastings, K.; Clarke, J. B.; Gandolfi, A. J. (1993) Immunogenicity studies of a synthetic antigen of alpha methyl dopa. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15, 621-637.
- Irimura, T., Denda, K., Iida, S., Takeuchi, H. and Kato, K. (1999) Diverse glycosylation of MUC1 and MUC2: potential significance in tumour immunity. *J Biochem (Tokyo)*, 126, 975-985.
- Issaq, H. J.; Veenstra, T. D.; Conrads, T. P.; Felschow, D. (2002) The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 587-592.
- Kagan, E., Ragupathi, G., Yi, S.S., Reis, C.A., Gildersleeve, J., Kahne, D., Clausen, H., Danishefsky, S.J. and Livingston, P.O. (2005) Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn. *Cancer Immunol Immunother*, 54, 424-430.
- Kato, K., Takeuchi, H., Miyahara, N., Kanoh, A., Hassan, H., Clausen, H. and Irimura, T. (2001) Distinct orders of GalNAc incorporation into a peptide with consecutive threonines. *Biochem Biophys Res Commun*, 287, 10-115.
- Kuduk, S.D., Schwarz, J.B., Chen, X.-T., Glunz, P.W., Sames, D., Ragupathi, G., Livingston, P.O. and Danishefsky, S.J. (1998) Synthetic and immunological studies on clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens: the preparation of a glycopeptide-based vaccine for clinical trials against prostate cancer. *J Am Chem Soc*, 120, 12474-12485.
- Lin, S.; Tomatore, P.; King, D.; Orlando, R.; Weinberger, S. R. (2001) Limited acid hydrolysis as a means of fragmenting proteins isolated upon ProteinChip array surfaces. *Proteomics* 1, 1172-1184.
- Lo-Man, R., Vichier-Guerre, S., Bay, S., Deriaud, E., Cantacuzene, D. and Leclerc, C. (2001) Anti-tumour immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope. *J Immunol*, 166, 2849-2854.
- Lo-Man, R., Vichier-Guerre, S., Perraut, R., Dériaud, E., Huteau, V., BenMohamed, L., Diop, O.M., Livingston, P.O., Bay, S. and Leclerc, C. (2004) A fully synthetic therapeutic vaccine candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces specific antibodies in non-human primates. *Cancer Res*, 64, 4987-4994.
- Longenecker, B.M., Willans, D.J., MacLean, G.D., Selvaraj, S., Suresh, M.R. and Noujaim, A.A. (1987) Monoclonal antibodies and synthetic tumour-associated glycoconjugates in the study of the expression of Thomsen-Friedenreich-like and Tn-like antigens on human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 78, 489-496.
- Mandel, U., Hassan, H., Therkildsen, M.H., Rygaard, J., Jakobsen, M.H., Juhl, B.R., Dabelsteen, E. and Clausen, H. (1999) Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas:

- immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology*, 9, 43-52.
- Manzi, A. E.; Varki, A. (1993) *Glycobiology. A Practical Approach*, Oxford University Press, New-York.
- Marcaurelle, L.A. and Bertozzi, C.R. (2002) Recent advances in the chemical synthesis of mucin-like glycoproteins. *Glycobiology*, 12, 69R-77R.
- 5 Marcos, N.T., Cruz, A., Silva, F., Almeida, R., David, L., Mandel, U., Clausen, H., Von Mensdorff-Pouilly, S. and Reis, C.A. (2003) Polypeptide GalNAc-transferases, ST6GalNAc-transferase I, and ST3Gal-transferase I expression in gastric carcinoma cell lines. *J Histochem Cytochem*, 51, 761-771.
- Mendicino J, Sangadala S. (1998) *Mol Cell Biochem*. 185, 135-45.
- 10 Merchant, M.; Weinberger, S. R. (2000) Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21, 1164-1177.
- Moniaux, N., Escande, F., Porchet, N., Aubert, J.P. and Batra, S.K. (2001) Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci*, 6, D1192-D1206.
- 15 Nakada, H., Inoue, M., Numata, Y., Tanaka, N., Funakoshi, I., Fukui, S., Mellors, A. and Yamashina, I. (1993) Epitopic structure of Tn glycophorin A for an anti-Tn antibody (MLS 128). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2495-2499.
- Niemeyer, C. M. (2004) *Bioconjugation protocols : Strategies and methods*. *Methods in Molecular Biology*, Volume 283, Humana Press, Totowa.
- 20 Nishiumi, N., Abe, Y., Inoue, Y., Hatanaka, H., Inada, K., Kijima, H., Yamazaki, H., Tatematsu, M., Ueyama, Y., Iwasaki, M., Inoue, H. and Nakamura, M. (2003) Use of 11 p15 mucins as prognostic factors in small adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res*, 9, 5616-5619.
- Nishiumi, N.; Abe, Y.; Inoue, Y.; Hatanaka, H.; Inada, K.; Kijima, H.; Yamazaki, H.; Tatematsu, M.; Ueyama, Y.; Iwasaki, M.; Inoue, H.; Nakamura, M. (2003) Use of 11p15 mucins as prognostic factors in small adenocarcinoma of the lung. *Clin. Cancer Res*. 9, 5616-5619.
- 25 Numata, Y., Nakada, H., Fukui, S., Kitagawa, H., Ozaki, K., Inoue, M., Kawasaki, T., Funakoshi, I. and Yamashina, I. (1990) A monoclonal antibody directed to Tn antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, 170, 981-985.
- Oda, M.; Sato-Nakamura, N.; Azuma, T. (2004) Molecular characterization of monovalent and multivalent hapten-protein conjugates for analysis of the antigen-antibody interaction. *Anal. Biochem*. 333, 365-371.
- 30 Osinaga, E., Bay, S., Tello, D., Babino, A., Pritsch, O., Assemet, K., Cantacuzene, D., Nakada, H. and Alzari, P. (2000) Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. *FEBS Lett*, 469, 24-28.
- Pallesen, L.T., Berglund, L., Rasmussen, L.K., Petersen, T.E. and Rasmussen, J.T. (2002) Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *Eur J Biochem*, 269, 2755-2763.
- 35 Pancino, G.F., Osinaga, E., Vorauer, W., Kakouche, A., Mistro, D., Charpin, C. and Roseto, A. (1990) Production of a monoclonal antibody as immunohistochemical marker on paraffin embedded tissues using a new immunization method. *Hybridoma*, 9, 389-395.
- Pancino G, Osinaga E, Charpin C, Mistro D, Barque JP, Roseto A. (1991) Purification and characterisation of a breast-cancer-associated glycoprotein not expressed in normal breast and identified by monoclonal antibody 83D4. *Br J Cancer*. 63, 390-8
- 40 Pauillac, S.; Naar, J.; Mouratou, B.; Guesdon, J. L. (2002) Application of a modified version of Habeeb's trinitrophenylation method for the characterization of hapten-protein conjugates in a reversed micellar medium. *J. Immunol. Methods* 263, 75-83.
- Pawlowski, A.; Kallenius, G.; Svenson, S. B. (2000) Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines utilizing new fragmentation and conjugation technologies. *Vaccine* 18, 1873-1885.
- 45 Pereira, M.B., Dias, A.J., Reis, C.A. and Schmitt, F.C. (2001) Immunohistochemical study of the expression of MUC5AC and MUC6 in breast carcinomas and adjacent breast tissues. *J Clin Pathol*, 54, 210-213.
- Podolsky D. K. (1985) Oligosaccharide structures of isolated human colonic mucin species. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(29): 15510-15515.
- 50 Reis, C.A., David, L., Carvalho, F., Mandel, U., de Bolos, C., Mirgorodskaya, E., Clausen, H. and Sobrinho-Simoes, M. (2000) Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. *J Histochem Cytochem*, 48, 377-388

- Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zemer, B. (1979) Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination. *Anal. Biochem.* 94, 75-81.
- Robbe C. et al. (2004) Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochemical Journal* 384 (Pt 2): 307-316.
- 5 Rousseau, K., Byrne, C., Kim, Y.S., Gum, J.R., Swallow, D.M. and Toribara, N.W. (2004) The complete genomic organization of the human MUC6 and MUC2 mucin genes. *Genomics*, 83, 936-939.
- Saksena, R.; Chemyak, A.; Karavanov, A.; Kovac, P. (2003) Conjugating low molecular mass carbohydrates to proteins. 1. Monitoring the progress of conjugation. *Methods Enzymol.* 362, 125-139.
- 10 Sashidhar, R. B.; Capoor, A. K.; Ramana, D. (1994) Quantitation of epsilon-amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid. A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *J. Immunol. Methods* 167, 121-127.
- Savage, C. (2003) Ciphergen segments proteomics applications. *Genet. Eng. News* 23.
- Segal-Eiras, A. and Croce, M.V. (1997) Breast cancer associated mucin: a review. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 25, 176-181.
- 15 Singh, K. V.; Kaur, J.; Varshney, G. C.; Raje, M.; Suri, C. R. (2004) Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules. *Bioconjug. Chem.* 15, 168-173.
- Singhal, A., Fohn, M. and Hakomori, S. (1991) Induction of alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine (Tn) antigen-mediated cellular immune response for active immunotherapy in mice. *Cancer Res*, 51, 1406-1411.
- 20 Slovin, S.F., Ragupathi, G., Musselli, C., Olkiewicz, K., Verbel, D., Kuduk, S.D., Schwarz, J.B., Sames, D., Danishefsky, S., Livingston, P.O. and Scher, H.I. (2003) Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine. *J Clin Oncol*, 21, 4292-4298.
- 25 Sorensen, A.L., Reis, C.A., Tarp, M.A., Mandel, U., Ramachandran, K., Sankaranarayanan, V., Schwientek, T., Graham, R., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M.A., Burchell, J. and Clausen, H. (2005) Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. *Glycobiology*.
- Speir, J.A., Abdel-Motal, U.M., Jondal, M., and Wilson, I.A. (1999) *Immunity* 10, 51-61.
- Springer, G. F. (1984) T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 224, 1198-1206. Springer, G.F. (1984) T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*, 224, 1198-1206.
- 30 Springer, G.F. (1997) Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med*, 75, 594-602.
- Springer, G.F., Desai, P.R., Tegtmeier, H., Spencer, B.D. and Scanlon, E.F. (1993) Pancarcinoma T/Tn antigen detects human carcinoma long before biopsy does and its vaccine prevents breast carcinoma recurrence. *Ann N Y Acad Sci*, 690, 355-357.
- 35 Takeuchi, H., Kato, K., Hassan, H., Clausen, H. and Irimura, T. (2002) O-GalNAc incorporation into a cluster acceptor site of three consecutive threonines. Distinct specificity of GalNAc-transferase isoforms. *Eur J Biochem*, 269, 6173-6183.
- Tang, N.; Tomatore, P.; Weinberger, S. R. (2004) Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom. Rev.* 23, 34-44.
- 40 Ten Hagen, K.G., Fritz, T.A. and Tabak, L.A. (2003) All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptideN-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*, 13, 1 R-16R.
- Tettamanti G, Pigman W. (1968) *Arch Biochem Biophys.* 124, 41-50.
- 45 Toribara, N.W., Robertson, A.M., Ho, S.B., Kuo, W.L., Gum, E., Hicks, J.W., Gum, J.R., Jr., Byrd, J.C., Siddiki, B. and Kim, Y.S. (1993) Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *J Biol Chem*, 268, 5879-5885.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 24, 145-149.
- Toyokuni, T., Hakomori, S. and Singhal, A.K. (1994) Synthetic carbohydrate vaccines: synthesis and immunogenicity of Tn antigen conjugates. *Bioorg Med Chem*, 2, 1119-1132.

- Vinall, L.E., Hill, A.S., Pigny, P., Pratt, W.S., Toribara, N., Gum, J.R., Kim, Y.S., Porchet, N., Aubert, J.P. and Swallow, D.M. (1998) Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11 p15.5. *Hum Genet*, 102, 357-366.
- 5 von Mensdorff-Pouilly, S., Kinarsky, L., Engelmann, K., Baldus, S.E., Verheijen, R.H., Hollingsworth, M.A., Pisarev, V., Sherman, S. and Hanisch, F.G. (2005) Sequence-variant repeats of MUC1 show higher conformational flexibility, are less densely O-glycosylated and induce differential B lymphocyte responses. *Glycobiology*, 15, 735-746.
- Vordenwülbecke, S.; Cleverley, S.; Weinberger, S. C.; Wiesner, A. (2005) Protein quantification by the SELDI-TOF-MS-based ProteinChip System® system. *Nature Methods* 2, 393-395.
- 10 Weller, M. G.; Diemer, M.; Wersching, C.; Niessner, R.; Sochor, H. (2003) Development of antibodies for the detection of N-acetyl-glufosinate. *J Agric Food Chem* 51, 6668-6675.
- Williams, S.J., Wreschner, D.H., Tran, M., Eyre, H.J., Sutherland, G.R. and McGuckin, M.A. (2001) Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem*, 276, 18327-18336.
- Xu, Y., Gendler, S.J., and Franco, A. (2004) *J Exp Med* 199, 707-716.
- 15 Yin, B.W. and Lloyd, K.O. (2001) Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*, 276, 27371-27375.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

5 <120> Síntesis enzimática a gran escala de glicoconjugados de mucina y sus aplicaciones en inmunología.
<130> B6586-FP/KP
<140> EP 06 290 091.5
<141> 13-01-2006
<160> 32

10 <170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador de sentido MUC6-F para una unidad repetitiva en tándem MUC6
<400> 1
cgggacctc cacctccttg gtgact

20 <210> 2
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador inverso MUC6-R para una unidad repetitiva en tándem MUC6

25 <400> 2
ggaagctttt agaaagggtgg aacgtg
<210> 3
<211> 26
<212> DNA
30 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso MUC6-2R para ½ unidad repetitiva en tándem MUC6
<400> 3
ggaagcttat taggatggtg tgtgga

35 <210> 4
<211> 203
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
20 25 30

40

Gly Ser Ser Thr Ser Leu Val Thr Pro Ser Thr His Thr Val Ile Thr
35 40 45

Pro Thr His Ala Gln Met Ala Thr Ser Ala Ser Asn His Ser Ala Pro
50 55 60

Thr Gly Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Leu Lys Ala Thr Gly Ser Thr
65 70 75 80

His Thr Ala Pro Pro Ile Thr Pro Thr Thr Ser Gly Thr Ser Gln Ala
85 90 95

His Ser Ser Phe Ser Thr Asn Lys Thr Pro Thr Ser Leu His Ser His
100 105 110

Thr Ser Ser Thr His His Pro Glu Val Thr Pro Thr Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Ile Thr Pro Asn Pro Thr Ser Thr Arg Thr Arg Thr Pro Val Ala His
130 135 140

Thr Asn Ser Ala Thr Ser Ser Arg Pro Pro Pro Phe Thr Thr His
145 150 155 160

Ser Pro Pro Thr Gly Ser Ser Pro Phe Ser Ser Thr Gly Pro Met Thr
165 170 175

Ala Thr Ser Phe Lys Thr Thr Thr Thr Tyr Pro Thr Pro Ser Leu Pro
180 185 190

Gln Thr Thr Pro Leu Thr His Val Pro Pro Phe
195 200

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
20 25 30

Gly Ser Ser Thr Ser Leu Val Thr Pro Ser Thr His Thr Val Ile Thr
35 40 45

Pro Thr His Ala Gln Met Thr Thr Ser Ala Ser Ile His Ser Met Pro
50 55 60

Thr Gly Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Leu Met Ala Thr Gly Ser Thr
65 70 75 80
His Thr Ala Pro Leu Ile Thr Val Thr Thr Ser Arg Thr Ser Gln Val
85 90 95
His Ser Ser Phe Ser Thr Ala Lys Thr Ser Thr Ser Leu Leu Ser His
100 105 110
Ala Ser Ser Thr His His Pro
115

<210> 6

<211> 169

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Thr Ser Leu Val Thr Pro Ser Thr His Thr Val Ile Ala Pro Thr
1 5 10 15
His Ala Gln Met Ala Thr Ser Ala Ser Ile His Ser Ala Pro Thr Gly
20 25 30
Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Leu Lys Ala Thr Gly Ser Thr His Thr
35 40 45
Ala Pro Pro Ile Thr Pro Thr Thr Ser Gly Thr Ser Gln Ala His Ser
50 55 60
Ser Phe Ser Thr Asn Lys Thr Pro Thr Ser Leu His Ser His Thr Ser
65 70 75 80
Ser Thr His His Pro Glu Val Ala Pro Thr Ser Thr Thr Thr Ile Thr
85 90 95
Pro Asn Pro Thr Ser Thr Arg Thr Arg Thr Pro Val Ala His Thr Asn
100 105 110
Ser Ala Thr Ser Ser Arg Pro Pro Pro Pro Phe Thr Thr His Ser Pro
115 120 125
Pro Thr Gly Ser Ser Pro Phe Ser Ser Thr Gly Pro Met Thr Ala Thr
130 135 140
Ser Phe Lys Thr Thr Thr Tyr Pro Thr Pro Ser Leu Pro Gln Thr
145 150 155 160
Thr Pro Leu Thr His Val Pro Pro Phe
165

<210> 7

<211> 169

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Thr Ser Leu Val Thr Ile Ser Thr His Thr Val Ile Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 His Pro Gln Met Ser Thr Ser Ala Tyr Ile His Ser Thr Pro Thr Gly
 20 25 30
 Thr Ile Ala Ser Pro Thr Thr Val Lys Ala Thr Arg Ser Thr Tyr Thr
 35 40 45
 Ala Pro Leu Met Thr Ala Thr Thr Arg Ile Thr Ser Gln Ala His Ser
 50 55 60
 Ser Ile Ser Thr Ala Lys Thr Ser Thr Ser Leu His Ser His Ala Ser
 65 70 75 80
 Ser Thr His His Pro Glu Val Thr Pro Thr Ser Thr Thr Asn Val Thr
 85 90 95
 Pro Lys Ser Thr Ser Arg Asp Thr Ser Thr Pro Val Thr His Thr Thr
 100 105 110
 Ser Ala Thr Ser Ser Arg Pro Pro Thr Pro Ile Thr Thr His Ser Ser
 115 120 125
 Pro Thr Arg Ser Ser Pro Leu Ser Ser Thr Gly Pro Met Thr Ala Thr
 130 135 140
 Ser Ile Lys Thr Thr Thr Thr Tyr Pro Thr Pro Ser His Pro Gln Thr
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr Thr His Val Pro Pro Phe
 165

<210> 8

<211> 513

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tccacctcct tgggtgactcc aagtactcac acagtcatca cccctaccca cgcacagatg 60
 gccacatctg cctccaacca ctcagcgcca acaggtacca ttctccacc aacaacgctc 120
 aaggccacag ggtccacca cacagcccca ccaataacgc cgaccaccag tgggaccagc 180
 caagcccaca gctcattcag cacaacaaa acacctacct cgctacattc acacacttcc 240
 tccacacacc atcctgaagt caccccaact tctactacca cgattactcc caacccccact 300
 agtacacgca ccagaacccc tgtggccac accaactcag ccaccagcag cagcaggcca 360
 ccaccacctt tcaccacaca ctccccacct acagggagca gtcccttctc ttccacaggt 420
 cccatgacgg caacatcctt caagaccacc actacctatc caaccccatc actccctcag 480
 accacacctc tcaactcatgt tccacctttc taa 513

<210> 9
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 9

Ser Thr Ser Leu Val Thr Pro Ser Thr His Thr Val Ile Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 His Ala Gln Met Ala Thr Ser Ala Ser Asn His Ser Ala Pro Thr Gly
 20 25 30
 Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Leu Lys Ala Thr Gly Ser Thr His Thr
 35 40 45
 Ala Pro Pro Ile Thr Pro Thr Thr Ser Gly Thr Ser Gln Ala His Ser
 50 55 60
 Ser Phe Ser Thr Asn Lys Thr Pro Thr Ser Leu His Ser His Thr Ser
 65 70 75 80
 Ser Thr His His Pro Glu Val Thr Pro Thr Ser Thr Thr Thr Ile Thr
 85 90 95
 Pro Asn Pro Thr Ser Thr Arg Thr Arg Thr Pro Val Ala His Thr Asn
 100 105 110
 Ser Ala Thr Ser Ser Arg Pro Pro Pro Phe Thr Thr His Ser Pro
 115 120 125
 Pro Thr Gly Ser Ser Pro Phe Ser Ser Thr Gly Pro Met Thr Ala Thr
 130 135 140
 Ser Phe Lys Thr Thr Thr Thr Tyr Pro Thr Pro Ser Leu Pro Gln Thr
 145 150 155 160
 Thr Pro Leu Thr His Val Pro Pro Phe
 165

<210> 10
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<400> 10

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat 60
 atggctagca tgactgggtgg acagcaaatg ggtcgcggat cctccacctc cttggtgact 120

ccaagtactc acacagtcac cacccttacc cacgcacaga tggccacatc tgcctccaac 180
 cactcagcgc caacaggtac cattcctcca ccaacaacgc tcaaggccac aggggtccacc 240
 cacacagccc caccaataac gccgaccacc agtgggacca gccaaagcca cagctcattc 300
 agcacaaaaca aaacacctac ctcgctacat tcacacactt cctccacaca ccctcctgaa 360
 gtcaccccaa cttctactac cagcattact cccaacccca ctagtacacg caccagaacc 420
 cctgtggccc acaccaactc agccaccagc agcagcaggc caccaccacc cttcaccaca 480
 cactccccac ctacagggag cagtcccttc tcttccacag gtcccatgac ggcaacatcc 540
 ttcaagacca ccactaccta tccaacccca tcactccttc agaccacacc tctcactcat 600
 gttccacctt tctaa 615

<210> 11
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11

tccacctcct tgggtgactcc aagtactcac acagtcatca cccctaccca cgcacagatg 60
 accacttctg cctccatcca ctcaatgccac acaggcacca ttctccacc gacaacgctc 120
 atggccacag ggtccacaca cacagcccca ctaataacag tgaccaccag taggaccagc 180
 caagtccaca gctccttcag cacagccaaa acctctacat cctcctctc ccatgcttcc 240
 tccacacacc atccttaa 258

<210> 12
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ser Thr Ser Leu Val Thr Pro Ser Thr His Thr Val Ile Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 His Ala Gln Met Thr Thr Ser Ala Ser Ile His Ser Met Pro Thr Gly
 20 25 30
 Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Leu Met Ala Thr Gly Ser Thr His Thr
 35 40 45
 Ala Pro Leu Ile Thr Val Thr Thr Ser Arg Thr Ser Gln Val His Ser
 50 55 60
 Ser Phe Ser Thr Ala Lys Thr Ser Thr Ser Leu Leu Ser His Ala Ser
 65 70 75 80
 Ser Thr His His Pro
 85

<210> 13
 <211> 360
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggcgccgcg cggcagccat    60
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat cctccacctc cttggtgact    120
ccaagtactc acacagtcac caccctacc cacgcacaga tgaccacttc tgcctccatc    180
cactcaatgc caacaggcac cattcctcca ccgacaacgc tcatggccac aggggtccaca    240
cacacagccc cactaataac agtgaccacc agtaggacca gccaaagtcca cagctccttc    300
agcacagcca aaacctctac atccctcctc tcccatgctt cctccacaca ccattccttaa    360

```

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

Gly Thr Thr Pro Pro Pro Thr Thr Leu Lys
1          5          10

```

<210> 15

<211> 167

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

Ser Thr Ser Ser Val Thr Pro Ser Thr His Thr Val Ile Thr Pro Thr
1          5          10          15

His Ala Gln Met Ser Thr Ser Ala Ser Ile His Ser Thr Pro Thr Gly
          20          25          30

Thr Val Pro Pro Leu Thr Thr Arg Met Pro Thr Gly Ser Thr Arg Thr
          35          40          45

Gly Pro Pro Met Thr Gly Thr Ile Ile Gln Thr Ser Lys Ala His Asn
50          55          60

Ser Phe Ser Thr Ala Lys Thr Ser Thr Ser Leu His Ser His Ala Ser
65          70          75          80

Ser Thr His His Pro Glu Thr Thr Pro Thr Ser Thr Thr Asn Ile Thr
          85          90          95

Pro Lys Ser Thr Ser Ala Gly Thr Ser Thr Pro Val Ala His Thr Thr
          100          105          110

Leu Ala Thr Ser Ser Arg Leu Pro Thr Thr Phe Thr Thr Phe Ser Pro
          115          120          125

```

Pro Thr Gly Ser Ser His Val Ser Ser Thr Gly Pro Met Thr Ala Thr
130 135 140

Ser Ser Gln Thr Thr Thr Thr His Pro Pro Pro Ser His Pro Gln Thr
145 150 155 160

Thr Pro Leu Thr His Val Pro
165

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

Leu Val Thr Pro Ser Thr His Thr Val
1 5

<210> 17

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gly Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Leu
1 5

<210> 18

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Thr Leu Lys Ala Thr Gly Ser Thr His
1 5

20 <210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Leu Lys
1 5

25

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 20

Glu Val Thr Pro Thr Ser Thr Thr Thr
1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 21

Thr Pro Ser Thr His Thr Val Ile Thr
1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

10

Ile Pro Pro Pro Thr Thr Leu Lys Ala
1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

15

Gly Arg Gly Ser Ser Thr Ser Leu Val
1 5

<210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

20

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
1 5 10 15

Arg Pro Ala Pro
20

<210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 25

25

Asp Ser Thr Ser Ser Pro Val His Ser Gly Thr Ser Ser Pro Ala Thr
1 5 10 15

Ser Ala Pro Glu
20

30

<210> 26
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 26

Pro Thr Thr Thr Pro Ile Thr Thr Thr Thr Thr Val Thr Pro Thr Pro
1 5 10 15

Thr Pro Thr Gly Thr Gln Thr
20

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 27

Pro Ser Thr Pro Ser Thr Pro Pro Pro Ser Thr
1 5 10

<210> 28

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

His Ser Thr Pro Ser Phe Thr Ser Ser Ile Thr Thr Thr Glu Thr Thr
1 5 10 15

Ser

<210> 29

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Thr Ser Ser Ala Ser Thr Gly His Ala Thr Pro Leu Pro Val Thr Asp
1 5 10 15

20 <210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro
1 5

25

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 31

Ser Ser Thr Pro Gly Thr Ala His Thr Leu Thr Val Leu Thr Thr Thr
1 5 10 15

Ala Thr Thr Pro Thr Ala Thr Gly Ser Thr Ala Thr Pro
20 25

<210> 32

<211> 23

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 32

Thr Thr Ala Ala Pro Pro Thr Pro Ser Ala Thr Thr Pro Ala Pro Pro
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ala Pro Pro Glu
20

REIVINDICACIONES

1. Un glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, con propiedades inmunógenas, para uso como un inmunógeno, que, en ausencia de un vehículo proteínico, es capaz de inducir anticuerpos IgG que reconocen células tumorales humanas, caracterizado porque:

- 5 – comprende restos de carbohidratos que están O-enlazados directamente a un residuo de Ser o Thr enlazado a una cadena principal de apomucina, y porque
- cada uno de los restos de carbohidratos que están O-enlazados directamente a un residuo de Ser o Thr de dicha cadena principal de apomucina es un resto GalNAc, y porque dicha cadena principal de apomucina comprende la secuencia de aminoácidos de:
 - 10 i. al menos una apomucina, y/o
 - ii. al menos un fragmento de apomucina, en donde dicho al menos un fragmento comprende al menos una unidad repetitiva en tándem de apomucina, y en donde dicho al menos un fragmento tiene retenida dicha capacidad inducir IgG anti-tumoral, y/o
 - 15 iii. al menos un sub-fragmento de apomucina, en donde dicho al menos un sub-fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la unidad repetitiva en tándem de apomucina, y en donde dicho al menos un sub-fragmento tiene retenida dicha capacidad de inducir IgG anti-tumoral, y/o
 - 20 iv. al menos una variante conservada de de apomucina o de un fragmento como el definido en el apartado ii. en donde la secuencia de dicho al menos una variante conservada tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de dicha apomucina o fragmento, en la longitud completa de esta proteína o secuencia de fragmento, y en donde dicha al menos una variante conservada tiene retenida dicha capacidad de inducir IgG anti-tumoral.

2. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC6.

25 3. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 2, caracterizado porque dicha proteína apomucina MUC6 comprende una secuencia de unidad repetitiva en tándem de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, or SEQ ID NO:15.

4. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque dicho al menos un sub-fragmento, como se ha definido en el apartado iii. de la reivindicación 1, comprende al menos 85 aminoácidos contiguos de dicha unidad repetitiva en tándem de apomucina.

30 5. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC3.

6. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha apomucina es a MUC4 apomucina.

35 7. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC5.

8. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno de la reivindicación 7, caracterizado porque dicha MUC5 apomucina es una apomucina MUC5AC.

40 9. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque dicho al menos un sub-fragmento definido en el apartado iii. de la reivindicación 1 comprende al menos 20 aminoácidos contiguos de dicha unidad repetitiva en tándem.

10. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dicho al menos un sub-fragmento, como el definido en el apartado iii. de la reivindicación 1, tiene retenido al menos un epítipo de CTL.

45 11. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 10, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC6, y porque la secuencia de dicho al menos un epítipo de CTL es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16-23.

12. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque al menos 40% de los residuos de Ser y Thr contenidos en dicha cadena principal de apomucina están O-enlazados directamente a un residuo de GalNAc.

50 13. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende además al menos un resto de carbohidrato enlazado a al menos uno

de los restos de GalNAc O-enlazados.

14. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 13, caracterizado porque dicho al menos un resto de carbohidrato enlazado a GalNAc es un resto de GalNAc, un grupo sialilo o un resto de galactosa.

- 5 15. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dicha cadena principal de apomucina comprende la secuencia de:

- al menos dos apomucinas, y/o
- al menos dos fragmentos como se los definidos en el apartado ii., de la reivindicación 1, y/o
- al menos dos sub-fragmentos como el definido en el apartado iii., de la reivindicación 1, y/o

- 10 - al menos una apomucina, y al menos un fragmento como el definido en el apartado ii., de la reivindicación 1, y/o
- al menos una apomucina, y al menos un sub-fragmento como el definido en el apartado iii., de la reivindicación 1, y/o
- al menos un fragmento como el definido en el apartado ii., de la reivindicación 1, y al menos un sub-fragmento como el definido en el apartado iii., de la reivindicación 1.

- 15 16. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno de la reivindicación 15, caracterizado porque cada uno de dichos al menos dos fragmentos, y/o de dichos al menos dos sub-fragmentos, y/o de dicho al menos un fragmento y al menos un sub-fragmento, contenido en dicha cadena principal de apomucina, es un fragmento o sub-fragmento, de una apomucina diferente.

- 20 17. El glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de la reivindicación 15 o 16, caracterizado porque la secuencia de cada uno de dichos al menos dos fragmentos es la secuencia de la unidad repetitiva en tándem de una proteína apomucina.

18. Un complejo inmunitario soluble, para uso como un inmunógeno, que comprende:

- al menos glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, y
- 25 - al menos una estructura de inmunoglobulina o al menos un fragmento de inmunoglobulina que es un fragmento Fc, un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)'2, una cadena ligera o una cadena pesada.

- 30 19. Un proceso para la producción *in vitro* de una composición inmunógena, caracterizado porque dicho proceso comprende la producción *in vitro* de un glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno que, en ausencia de un vehículo proteínico, puede inducir anticuerpos IgG que reconocen células tumorales humanas, permitiendo dicho proceso facilitar la producción de dicho glicoconjugado en al menos cantidades escala semi-preparativa, en donde proceso comprende transferir *in vitro* al menos una N-acetilgalactosamina (GalNAc) a al menos un residuo de Ser o Thr de una cadena principal de apomucina,

en donde dicha cadena principal de apomucina comprende la secuencia de aminoácidos de:

- 35 i. al menos una apomucina, y/o
- ii. al menos un fragmento de apomucina, en donde dicho al menos un fragmento comprende al menos una unidad repetitiva en tándem, y en donde dicho al menos un fragmento tiene retenida dicha capacidad de inducir IgG anti-tumoral, y/o
- 40 iii. al menos un sub-fragmento de apomucina, en donde dicho al menos un sub-fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la unidad repetitiva en tándem, y en donde dicho al menos un sub-fragmento tiene retenida dicha capacidad de inducir IgG anti-tumoral, y/o
- 45 iv. al menos una variante conservada de una apomucina o de un fragmento como el definido en el apartado ii. en donde la secuencia de dicho al menos una variante conservada tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de dicha apomucina o fragmento, en la longitud total de esta secuencia de proteína o fragmento, y en donde dicha al menos una variante conservada tiene retenida dicha capacidad de inducir IgG anti-tumoral,

y en donde dicha transferencia *in vitro* es una transferencia que se realiza enzimáticamente usando al menos una UDP-N-acetilgalactosamina:polipéptido-N-acetilgalactosaminiltransferasa (ppGalNAc-T).

20. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC6.

21. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC3.
22. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC4.
23. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC5.
24. El proceso de la reivindicación 23, caracterizado porque dicha apomucina es una apomucina MUC5AC.
- 5 25. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 19-24, caracterizado porque dicho al menos un sub-fragmento, como el definido en el apartado iii. de la reivindicación 19, comprende al menos 20 aminoácidos contiguos de dicha unidad repetitiva en tándem.
26. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 19-25, caracterizado porque dicha al menos una ppGalNAc-T es proporcionada disponiendo de un extracto que contiene enzimas de una célula cancerosa.
- 10 27. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 19-26, caracterizado porque dicha al menos una ppGalNAc-T es una ppGalNAc-T1, ppGalNAc-T3, ppGalNAc-T6, ppGalNAc-T7, ppGalNAc-T13
28. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 19-27, caracterizado porque dicha transferencia de GalNAc es monitorizada por espectroscopía de masas SELDI-TOF.
- 15 29. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-28, caracterizado porque dicho glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno, se purifica de la mezcla de reacción.
30. Un glicoconjugado de mucina basado en Tn, para uso como un inmunógeno, caracterizado porque se obtiene por el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 19-29, y porque al menos 40% de número total de residuos de Ser y Thr contenidos en su cadena principal de apomucina están O-enlazados directamente a un resto de GalNAc
31. Una composición, para uso como una composición inmunógena, que comprende:
20 - al menos un glicoconjugado de mucina, basado en el antígeno Tn, inmunógeno como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o 30, y/o
 - al menos un complejo inmunitario soluble como se ha definido en la reivindicación 18.
32. La composición inmunógena de la reivindicación 31, caracterizada porque es una vacuna anti-tumoral.
- 25 33. La composición de la reivindicación 31 o 32, caracterizada porque comprende además al menos un vehículo farmacéuticamente y/o fisiológicamente aceptable.

MUC6-1	MGSSHHHHHNSGLVPRGSHMASMTGGQOMGRGSSLSLVTPSTHVIIPTHAQMATAASNHSAPTGTIPPPPTLKA	76
MUC6-2	MGSSHHHHHNSGLVPRGSHMASMTGGQOMGRGSSLSLVTPSTHVIIPTHAQMATAASNHSAPTGTIPPPPTLMA	76
Q14395 TR1	-----STSLVTPSTHVIIPTHAQMATAASNHSAPTGTIPPPPTIKA	42
Q14395 TR2	-----STSLVTPSTHVIIPTHAQMATAASNHSAPTGTIPPPPTIKA	211
Q14395 TR3	-----STSSVTPSTHVIIPTHAQMATAASNHSAPTGTIPPPPTIRMP	380
	*** ** ***** ** ** ** **	
MUC6-1	TGSTHTAPPIIPPTTSGTISOAHSSSESTNKTPTSLHSHSTSTHHHPEVPTSTTITPNPTSTRTRIPVAHTNSATSS	151
MUC6-2	TGSTHTAPPIIPPTTSGTISOAHSSSESTNKTPTSLHSHSTSTHHHPEVPTSTTITPNPTSTRTRIPVAHTNSATSS	119
Q14395 TR1	TGSTHTAPPIIPPTTSGTISOAHSSSESTNKTPTSLHSHSTSTHHHPEVPTSTTITPNPTSTRTRIPVAHTNSATSS	117
Q14395 TR2	TRSTYTAPLMTATTRITSOAHSSSESTNKTPTSLHSHSTSTHHHPEVPTSTTITPNPTSTRTRIPVAHTNSATSS	286
Q14395 TR3	TGSTRITGPPMTGTLIIQTSKAHNSFSTAKTSTSLHSHSTSTHHHPEVPTSTTITPNPTSTRTRIPVAHTNSATSS	455
	* * * * *	
MUC6-1	RPPPPFTTHSPPTGSSPFSSTGPMATMSEKTTTTPPSLPQTPPLTHVPPF	203
MUC6-2	RPPPPFTTHSPPTGSSPFSSTGPMATMSEKTTTTPPSLPQTPPLTHVPPF	
Q14395 TR1	RPPPPFTTHSPPTGSSPFSSTGPMATMSEKTTTTPPSLPQTPPLTHVPPF	169
Q14395 TR2	RPPPTITHSSPTRSSPLSSTGPMATSIKTTTTPPSLPQTPPLTHVPPF	338
Q14395 TR3	RLPTTFTTSPPTGSSHVSSGPMATSSQTTTTHPPPSHPQTPPLTHVPPF	505
	* * * * *	

SEQ ID NO:4

SEQ ID NO:5

SEQ ID NO:6

SEQ ID NO:7

SEQ ID NO:15

FIGURA 1A

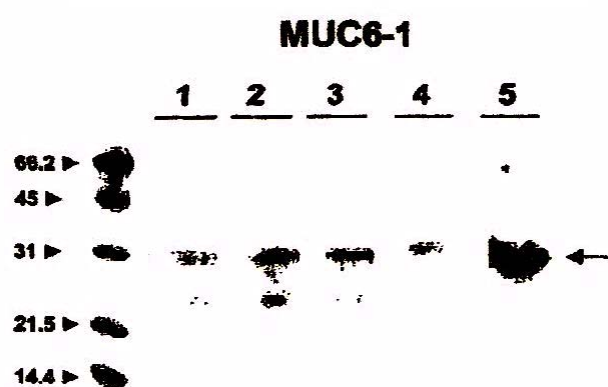


FIGURA 1B

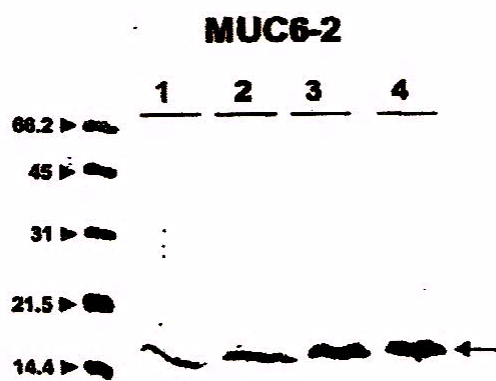


FIGURA 1C

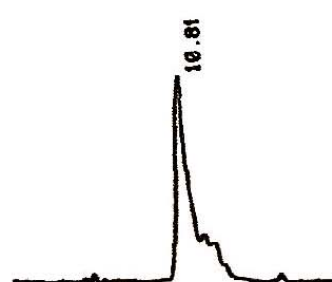


Figura 2A

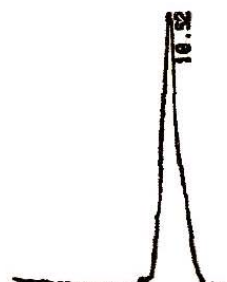


Figura 2B

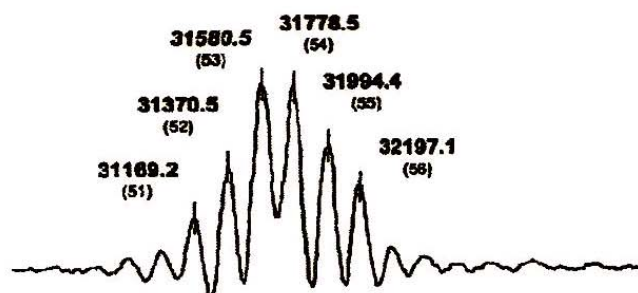


Figura 2C

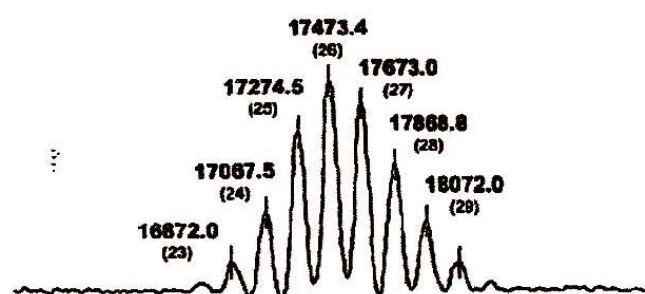


Figura 2D

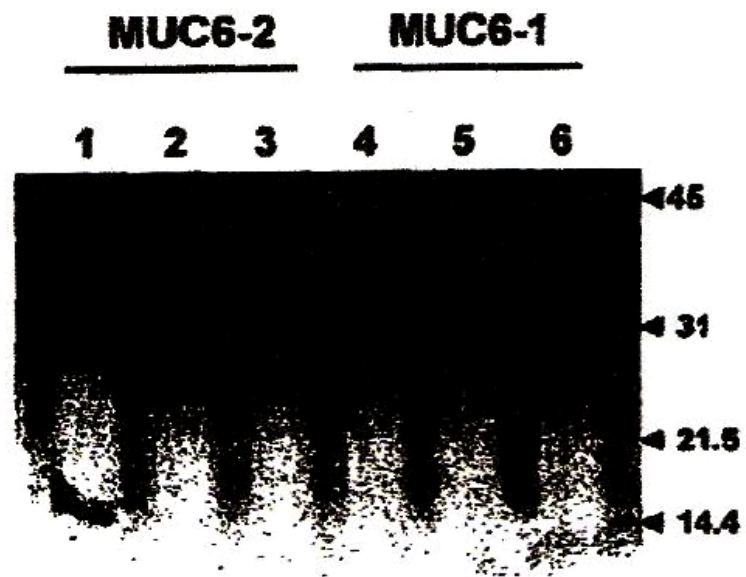


FIGURA 3

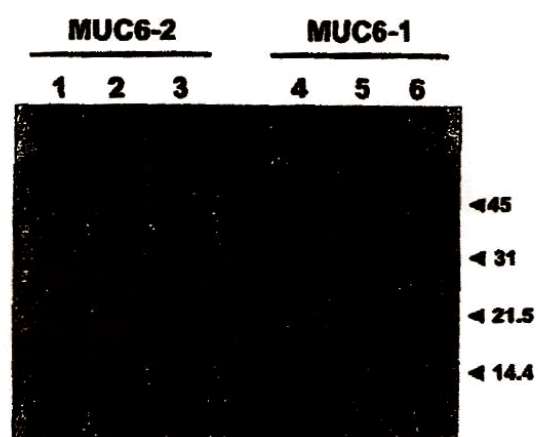


FIGURA 4A

Anti-Tn (83D4)

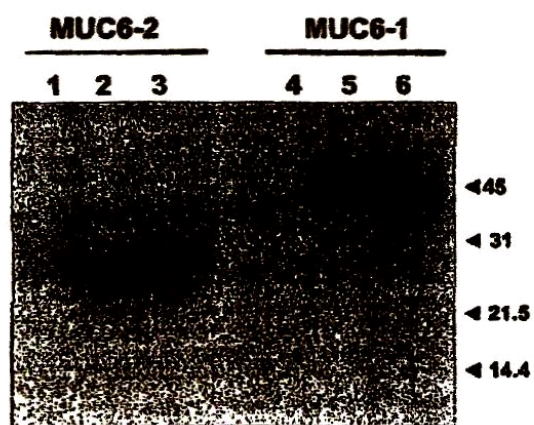


FIGURA 4B

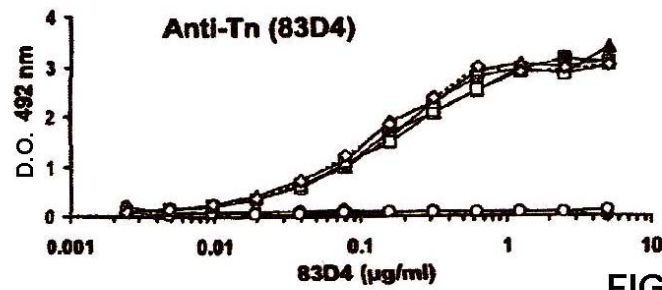


FIGURA 4C

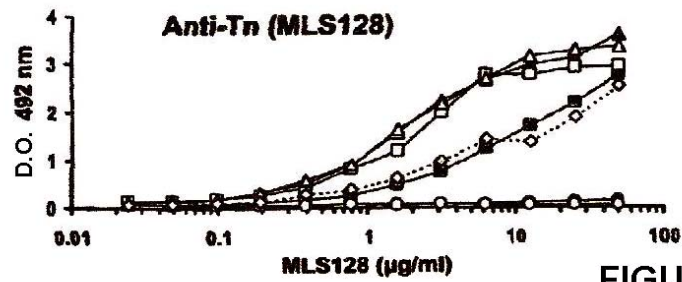


FIGURA 4D

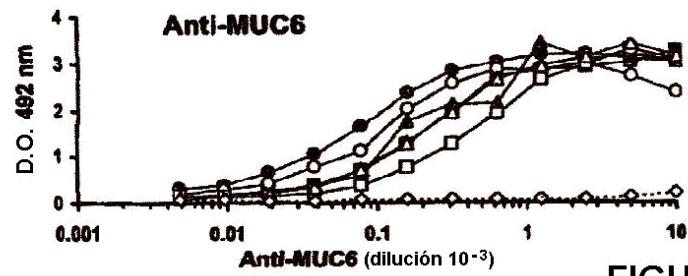
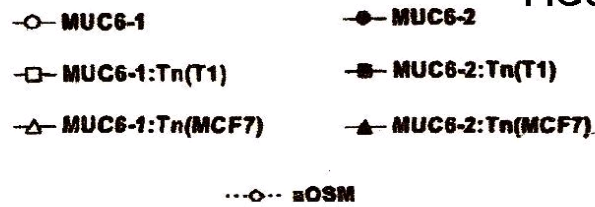


FIGURA 4E



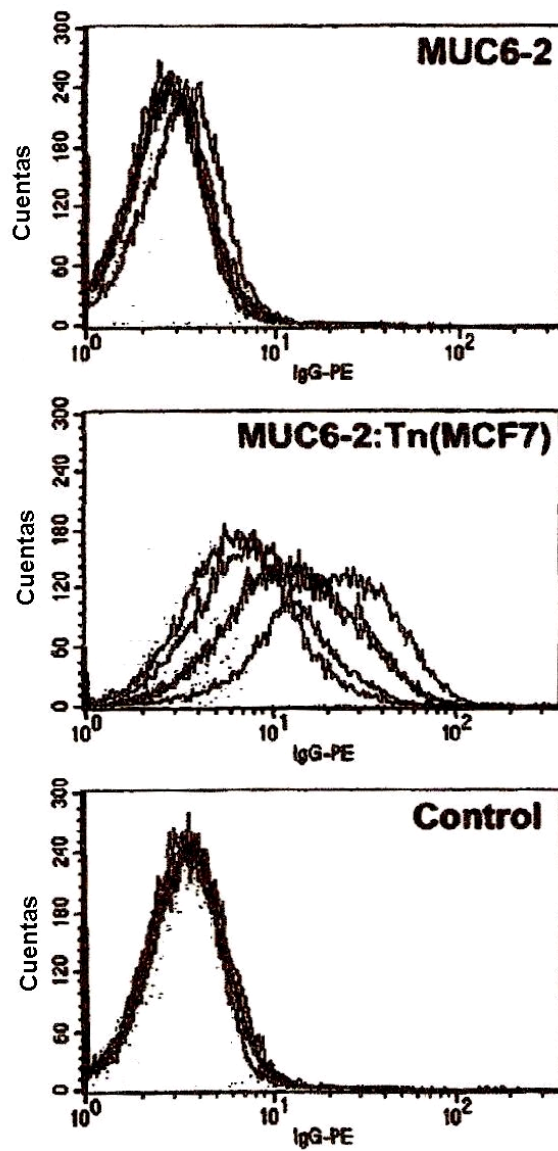


FIGURA 5A

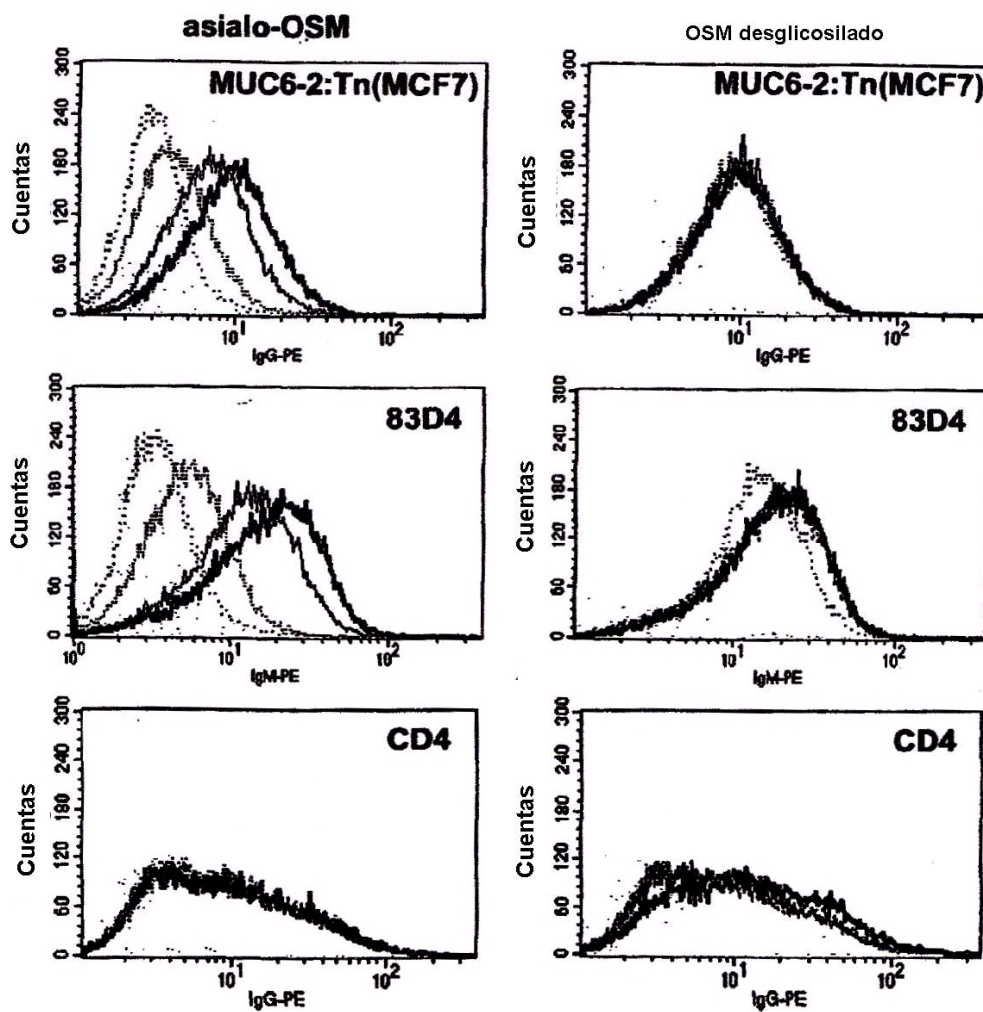


FIGURA 5B

Esquema

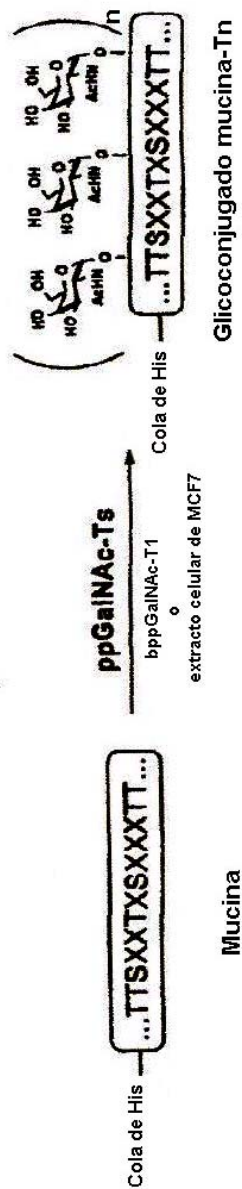
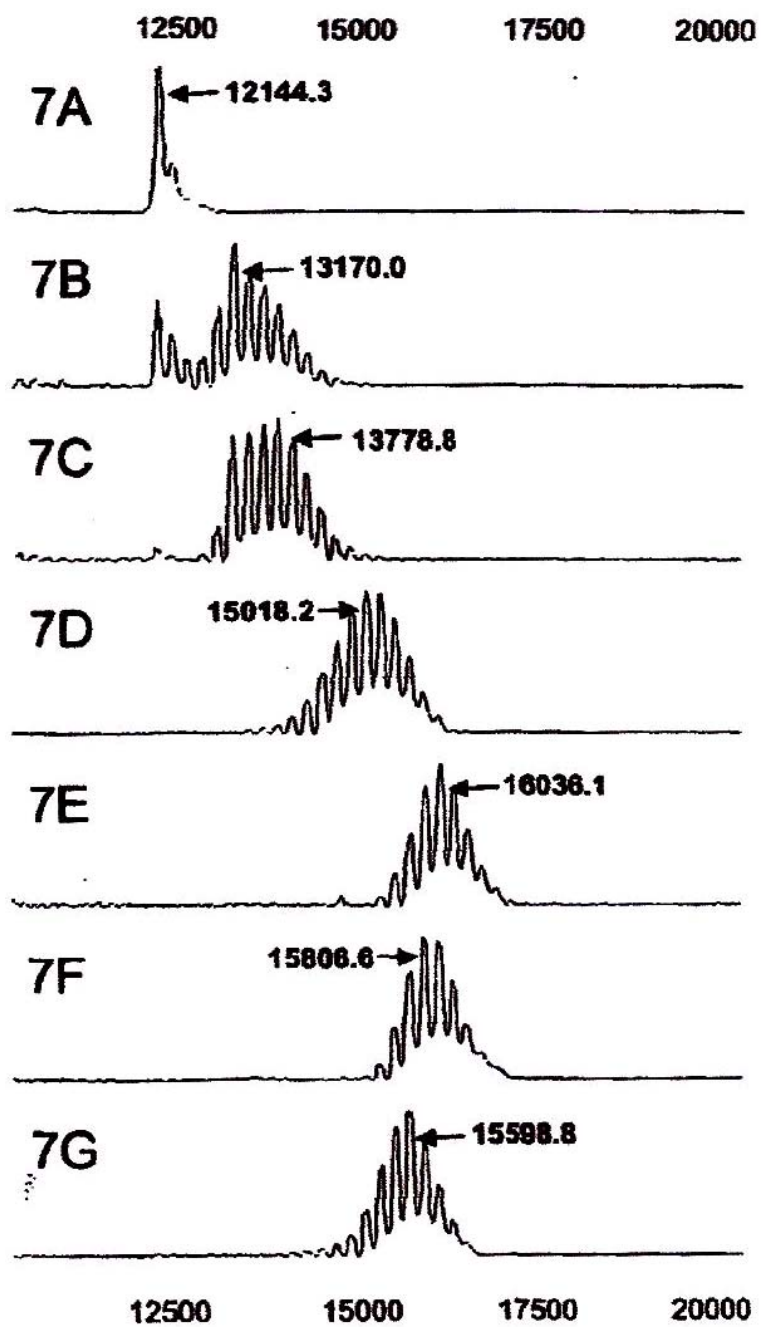


Figura 6



Figuras 7A - 7G

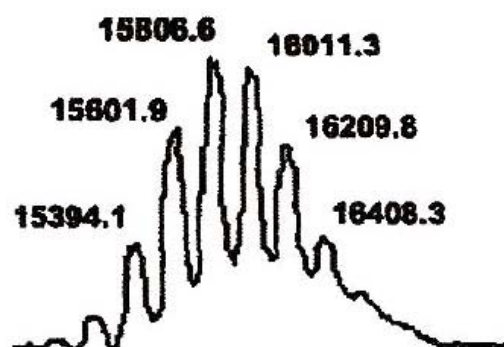


Figura 8A

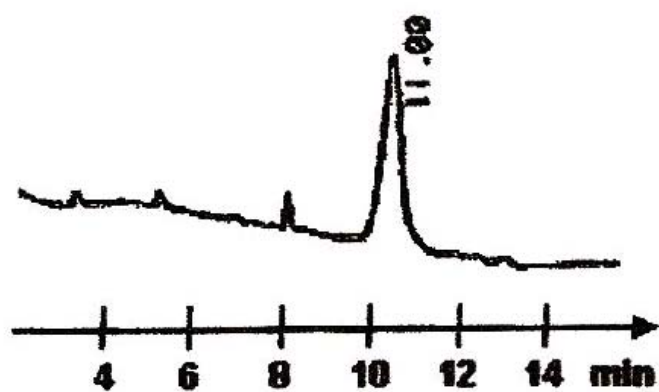
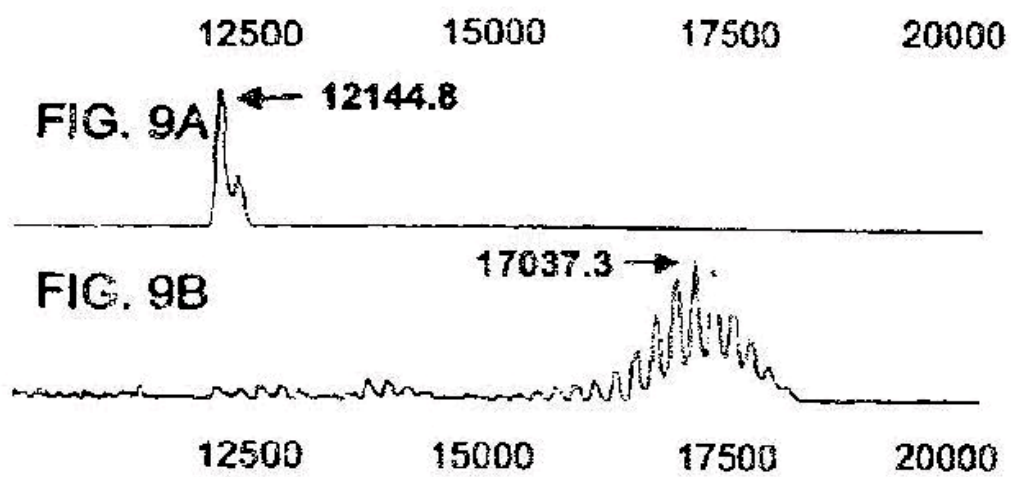


Figura 8B



FIGURAS 9A - 9B

MUC6-1

Secuencia de ácido nucleico de MUC6-1 (SEQ. ID NO:8)

TCCACCTCCTTGGTGAETCCAAGTACTCACACAGTCATCACCCCTACCCAC
GCACAGATGGCCACATCTGCCTCCAACCACTCAGCGCCAACAGGTACCAT
CCTCCACCAACAACGCTCAAGGCCACAGGGTCCACCCACACAGCCCCACCA
ATAACGCCGACCACCAGTGGGACCAGCCAAGCCCACAGCTCATTGAGCACA
AACAAAACACCTACCTCGCTACATTACACACTTCCTCCACACCATCCT
GAAGTCACCCCAACTTCTACTACCACGATTACTCCCAACCCCACTAGTACA
CGCACCAGAACCCCTGTGGCCACACCAACTCAGCCACCAGCAGCAGCAGG
CCACCACCACCCTTACCACACACTCCCCACCTACAGGGAGCAGTCCCTTC
TCTTCCACAGGTCCCATGACGGCAACATCCTTCAAGACCACCACTACCTAT
CCAACCCCATCACTCCCTCAGACCACACCTCTCACTCATGTTCCACCTTTCTAA

Secuencia de aminoácidos de MUC6-1 (SEQ. ID NO:9)

STSLVTPSTHTVITPHTHAQMATSASNHSAPTGTIPPPITLKTGSTHTAP
PIPTTSGTSQAHSSFSTNKTPTSLHSHTSSTHHPEVTPSTTTTTIPNPTST
RTRTPVAHTNSATSSRPPPPFTTHSPPTGSSPFSSTGPMIATSFKTTTTYP
TPSLPQTTPPLTHVPPF (169 aa)

Secuencia de ácido nucleico de MUC6-1 con cola de His (SEQ. ID NO:10)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGC
GGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCC
TCCACCTCCTTGGTGACTCCAAGTACTCACACAGTCATCACCCCTACCCAC
GCACAGATGGCCACATCTGCCTCCAACCACTCAGCGCCAACAGGTACCAT
CCTCCACCAACAACGCTCAAGGCCACAGGGTCCACCCACACAGCCCCACCA
ATAACGCCGACCACCAGTGGGACCAGCCAAGCCCACAGCTCATTGAGCACA
AACAAAACACCTACCTCGCTACATTACACACTTCCTCCACACACCATCCT
GAAGTCACCCCAACTTCTACTACCACGATTACTCCCAACCCCACTAGTACA
CGCACCAGAACCCCTGTGGCCACACCAACTCAGCCACCAGCAGCAGCAGG
CCACCACCACCCTTACCACACACTCCCCACCTACAGGGAGCAGTCCCTTC
TCTTCCACAGGTCCCATGACGGCAACATCCTTCAAGACCACCACTACCTAT
CCAACCCCATCACTCCCTCAGACCACACCTCTCACTCATGTTCCACCTTTCTAA

FIGURA 10A

MUC6-2

Secuencia de ácido nucleico de MUC6-2 (SEQ. ID NO:11)

TCCACCTCCTTGGTGACTCCAAGTACTCACACAGTCATCACCCCTACCCAC
GCACAGATGACCACTTCTGCCTCCATCCACTCAATGCCAACAGGCACCATT
CCTCCACCGACAACGCTCATGGCCACAGGGTCCACACACACAGCCCCACTA
ATAACAGTGACCACCAGTAGGACCAGCCAAGTCCACAGCTCCTTCAGCACA
GCCAAAACCTCTACATCCCTCCTCTCCCATGCTTCCTCCACACACCATCCT
TAA

Secuencia de aminoácidos de MUC6-2 (SEQ. ID NO:12)

STSLVTPSTHTVITPTHAQMITSASIHSMPTGTIPPPPTLTMATGSTHTAP
LITVTTSRTSQVHSSFSTAKTSTSLLSHASSTHHP (85aa)

Secuencia de ácido nucleico de MUC6-2 con cola de His (SEQ. ID No:13)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGC
GGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCC
TCCACCTCCTTGGTGACTCCAAGTACTCACACAGTCATCACCCCTACCCAC
GCACAGATGACCACTTCTGCCTCCATCCACTCAATGCCAACAGGCACCATT
CCTCCACCGACAACGCTCATGGCCACAGGGTCCACACACACAGCCCCACTA
ATAACAGTGACCACCAGTAGGACCAGCCAAGTCCACAGCTCCTTCAGCACA
GCCAAAACCTCTACATCCCTCCTCTCCCATGCTTCCTCCACACACCATCCT
TAA

FIGURA 10B