

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 475**

51 Int. Cl.:

C12N 5/09 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2004 E 04764266 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1654353**

54 Título: **Líneas de células tumorales NM-F9 (DSM ACC2606) y NM-D4 (DSM ACC2605), usos de las mismas**

30 Prioridad:

18.08.2003 EP 03018576

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

15.10.2013

73 Titular/es:

**GLYCOTOPE GMBH (100.0%)
ROBERT-RÖSSLE-STRASSE 10
13125 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

**GOLETZ, STEFFEN;
BAUMEISTER, HANS;
SCHLANGSTEDT, MARION y
SCHÖBER, UTE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 425 475 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

Líneas de células tumorales NM-F9 (DSM ACC2606) y NM-D4 (DSM ACC2605), usos de las mismas

La presente invención se refiere a una línea celular seleccionada del grupo que consiste en (a) una línea celular denominada NM-F9 que tiene el número de registro de DSMZ, DSM ACC2606; (b) una línea celular denominada NM-D4 que tiene el número de registro de DSMZ, DSM ACC2605; y subclones de (a) o (b). Adicionalmente, la presente invención proporciona un lisado de las líneas celulares o una molécula o mezcla de moléculas obtenido a partir de estas líneas celulares así como células dendríticas cargadas con dicho lisado, cultivadas conjuntamente o fusionadas con células de las líneas celulares, o una molécula o mezcla de moléculas obtenido a partir de estas líneas celulares de la presente invención. Además, se proporcionan composiciones, preferiblemente composiciones farmacéuticas o de vacuna que comprenden las líneas celulares, el lisado, las moléculas, la mezcla de moléculas o las células dendríticas de la presente invención. En otro aspecto, la presente invención se refiere a métodos para producir las composiciones mencionadas anteriormente. Además, la línea celular se usa en métodos y usos para la vacunación contra o el tratamiento o la prevención de cánceres y/o enfermedades tumorales.

El concepto de inmunidad del huésped frente a tumor se desarrolló por Ehrlich (Ehrlich P. *Über den jetzigen Stand der Karzinom-forschung*. En: Himmelweit F., ed. *The collected papers of Paul Ehrlich - Vol. II Immunology and cancer research*. Londres: Pergamon Press, 1957:559) aproximadamente hace un siglo y se reforzó más tarde a principios de los años 1900 por varios laboratorios que estudiaron líneas celulares tumorales trasplantables en ratones. En 1910, Cantamin (Cantamin MA. *Immunización contre le cancer de la souris inoculé avec des tumeurs modifiés par les rayons*. *Academie Des Sciences* 1910; 150: 128) demostró el desarrollo de inmunidad protectora frente a células tumorales trasplantables en ratones inmunizados con las mismas células tumorales irradiadas. En 1935, Besredtka y Gross (Besredtka A, Gross L. *Du rôle de la peau dans la sarcomatose de la souris*. *Ann Inst Pasteur* 1935;55:402-416) mostraron que algunos animales inoculados con homogeneizado de células tumorales experimentaron regresión tumoral, así como protección frente a exposiciones de reinoculación tumoral. Desde estos primeros tiempos, la vacunación antitumoral ha visto resultados alentadores así como inconvenientes decepcionantes. Recientemente, la teoría de inmunovigilancia frente a células cancerosas ha pasado por un resurgimiento. La heterogeneidad en la expresión de antígenos asociados a tumores (AAT) se ha documentado totalmente en diversos tumores (Natalie PG, Giacomini P, Bigotti A, *et al.* *Heterogeneity in the expression of HLA and tumour-associated antigens by surgically removed and cultured mama carcinoma cell*. *Cancer Res* 1983;43:660-666; Houghton AN, Davis LJ, *Fenotypic heterogeneity of melanoma*. En: Bagnara JT, ed. *Advances in pigment cell research*, Nueva York: Alan R. Liss Inc. 1988:333-342) y desempeña claramente un papel en el escape de células tumorales de la inmunovigilancia (Jager E., Ringhoffer M, Altmannsberger M, *et al.* *Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma*. *Int J Cancer* 1997;71:142-147). Por tanto, se ha realizado un enfoque sobre el desarrollo de vacunas de lisados celulares tumorales (TCLV, *tumor cell lysate vaccines*) y vacunas de células enteras (WCV, *whole cell vaccines*) con el fin de generar vacunas polivalentes. Hoy en día, se usan dos o más líneas celulares del mismo tipo histológico para el desarrollo de vacunas contra el cáncer con el fin de compensar cualquier antígeno perdido potencialmente. Éstas se usan para enfrentarse a tumores del mismo tipo tisular o de diferente tipo tisular. Las células tumorales autólogas o alogénicas son los componentes principales de TCLV o WCV.

El inconveniente principal de estos enfoques es que ha de usarse una mezcla de diversas líneas celulares, lo que hace que la generación de estas vacunas sea laboriosa y cara. Una desventaja adicional es que las células de carcinoma no son, en un sentido biotecnológico, adecuadas debido a sus características y requerimientos de crecimiento y proliferación. En particular, los requerimientos de crecimiento y proliferación para tales células de carcinoma habitualmente son muy específicos y necesitan establecerse y mantenerse cuidadosamente, lo que conduce a un proceso de producción laborioso y costoso. Otro problema con las células de carcinoma usadas para la producción de TCLV y WCV es que a menudo tienen una carga viral endógena, es decir tales células pueden albergar virus (por ejemplo, retrovirus) que plantean problemas en la producción de vacunas autólogas o alogénicas y, de manera más importante cuando se usan células (o lisados de las mismas) que contienen virus para fines de vacunación. Adicionalmente, las células de carcinoma usadas hasta la fecha para la producción de TCLV o WCV crecen con una velocidad de duplicación comparativamente muy lenta y/o crecen como cultivo adherente, lo que no permite el crecimiento en densidades celulares elevadas así como una fácil recogida. Sin embargo se desea producir una gran cantidad del mismo lote de células con el fin de asegurarse de que las TCLV y WCV obtenidas tienen un nivel de calidad elevado y continuo.

Además de los problemas técnicos con las células usadas hasta la fecha para la producción de TCLV y WCV, también existen inconvenientes importantes con la inmunogenicidad de dichas células. Esto se debe a que dichas células a menudo albergan sólo antígenos muy específicos de tumores específicos. Por tanto, la generación de una TCLV o WCV pan-carcinómica multivalente que sea adecuada para diversos carcinomas con varios antígenos tumorales compartidos es una tarea impredecible y difícil. Adicionalmente, también se conoce que la mayoría de los antígenos tumorales altamente específicos que se expresan en la superficie de células tumorales y frente a los que es altamente deseable obtener una respuesta inmunitaria durante la inmunización son antígenos de hidrato de carbono. Debido a la naturaleza compleja de la maquinaria de glicosilación, especialmente en células de mamífero en las que están implicadas más de 200 enzimas en la glicosilación de moléculas de membrana, la generación de líneas celulares que expresen de manera estable altas cantidades de antígenos tumorales de hidrato de carbono

deseados es muy difícil y no puede predecirse debido a la interacción compleja de esta gran cantidad de factores diferentes que se desconoce ampliamente y puede esperarse que tengan además bucles de retroalimentación y requerimientos de sustratos complejos dependiendo de la interacción compleja. Esto es especialmente cierto cuando quieren combinarse varios antígenos tumorales de hidrato de carbono en una única célula como es el caso para una vacuna WCV o TCLV polivalente pan-carcinómica. En cambio, la modificación de una célula con antígenos proteicos es una tecnología sencilla conocida por los expertos en la técnica. El extraordinario antígeno tumoral de membrana en cuanto a especificidad es el denominado antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF), una estructura disacárida de hidrato de carbono que prácticamente sólo se produce en células tumorales y en casi todos los tipos de carcinoma (Goletz S., Cao Y, Danielczyk A., Ravn P., Schöber U., y Karsten U. Thomsen-Friedenreich antigen: the "hidden" tumour antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003;535:147-62) 2003). De ese modo, es el antígeno tumoral unido a membrana de mayor especificidad tumoral o al menos se encuentra entre aquéllos con la mayor especificidad tumoral. Otro antígeno tumoral de hidrato de carbono con especificidad tumoral muy alta es Tn, un antígeno relacionado con TF. Otro epítipo tumoral pan-carcinómico es un epítipo novedoso especial de MUC1 (mucina epitelial polimórfica), que se denominará TA-MUC1 en el presente documento, y que es un epítipo conformacional en el que glicosilaciones particulares en la región PDTRP inducen una conformación que es específica de tumor tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2004/009632. Además, la propia MUC1 es un marcador tumoral pan-carcinómico bien conocido con epítopos peptídicos. Sin embargo, la expresión de dichos antígenos de hidrato de carbono o relacionados con hidrato de carbono, a menudo no es estable cuando se cultivan células tumorales de pacientes. Además, se prefieren mayores cantidades de los antígenos con el fin de aumentar las respuestas inmunitarias que hacen que la generación sea incluso más problemática. En conclusión, existen problemas o inconvenientes asociados con las células usadas para la producción de TCLV o WCV.

Ichiyama *et al.* (2000), Karei Igaku Kenkyusho Zasshi, JP 51(n.º 3-4): 93-110 describen células K562 cotransfectadas con MUC1 humana y B7 humana y su uso como vacuna contra el cáncer. El documento WO97/40182 da a conocer una vacuna que consiste en células dendríticas autólogas, humanas transfectadas con una secuencia parcial del gen de MUC1 humana. Karsten *et al.* (1998), *Cancer Res.* 58(12): 2541-2549 describe anticuerpos que reconocen el motivo DTR glicosilado en MUC1. Cao *et al.* (1997), *Virchows Arch* 431:159-166 describe la inmunodetección de glicótopos de mucina epitelial y asociados a mucina (TF, Tn y sialosil-Tn) en lesiones benignas y malignas del epitelio colónico y observa que la localización apolar corresponde a transformación maligna.

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de vacunas de células tumorales multivalentes que puedan producirse fácilmente en grandes cantidades y de manera altamente reproducible y que también expresen de manera estable los antígenos tumorales altamente específicos compartidos por muchos carcinomas (antígenos pan-carcinómicos).

La solución a este problema técnico que subyace a la presente invención se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una línea celular que expresa TF en la superficie celular y que expresa MUC1, preferiblemente TA-MUC1 en la superficie celular y que expresa glicoforina, preferiblemente como asialoglicoforina (AGPA) en la superficie celular. Preferiblemente, la presente invención se refiere a una línea celular seleccionada del grupo que consiste en (a) una línea celular denominada NM-F9 que tiene el número de registro de DSMZ, DSM ACC2606; (b) una línea celular denominada NM-D4 que tiene el número de registro de DSMZ, DSM ACC2605; y (c) subclones de (a) o (b) que expresan en la superficie celular TF, MUC1 y glicoforina.

Dicha línea celular que expresa TF en la superficie celular y que expresa MUC1, preferiblemente TA-MUC1 en la superficie celular y que expresa glicoforina, preferiblemente como asialoglicoforina en la superficie celular, puede generarse a partir de cualquier línea celular que exprese de manera endógena o recombinante MUC1 y glicoforina, preferiblemente células K562. El procedimiento se describe en detalle para células K562 en los ejemplos 2 y 3. En resumen, se analizan las células para determinar la expresión de TF mediante cualquier método disponible para los expertos en la técnica, preferiblemente mediante citometría de flujo (descrito en el ejemplo 2 A4) o inmunocitoquímica (descrito en el ejemplo 3 A-1). Se seleccionan células positivas para TF usando los anticuerpos monoclonales A78-G/A7 o PankoMab tal como se describe en el ejemplo 2 A-2. En caso de que el número de células positivas para TF sea demasiado bajo, se trata la línea celular negativa para TF con un mutágeno, preferiblemente un mutágeno químico, preferiblemente metanosulfonato de etilo (EMS) tal como se describe en el ejemplo 2 A-1. Tras esto, se seleccionan las células positivas para TF tal como se describió anteriormente. Es necesario repetir la selección de células positivas para TF y, tras esto, es necesario que se clonen las células positivas para TF para recibir células que son positivas para TF de manera estable tal como se describe en el ejemplo 2 A-2.

Debe observarse que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/o", "una" y "el/la", incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos habituales en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

Sorprendentemente, fue posible generar líneas celulares (tal como las NM-F9 y NM-D4 depositadas) a partir de

células K562 (ATCC CCL-243) que expresan varios antígenos de hidrato de carbono asociados a tumores altamente específicos, concretamente el TF en cantidades muy altas, y asialoglicoforina (AGPA) que consisten en la proteína transportadora glicoforina y grupos de TF en altas cantidades, y LeX en altas cantidades, y TA-MUC1 en cantidades moderadas y Tn en cantidades comparativamente bajas. Adicionalmente, fue sorprendente que dichas líneas celulares sean altamente inmunoestimuladoras y puedan activar respuestas inmunitarias frente a dichos antígenos tumorales.

La generación de grupos de TF expuestos y expresados de manera estable en densidades adecuadas en las células de las líneas celulares de la presente invención es un descubrimiento no previsto, puesto que TF es un azúcar del núcleo en la O-glicosilación que normalmente está escondido crípticamente en cadenas de hidrato de carbono más largas que se forman mediante un patrón complejo de glicosiltransferasas. Debido a la compleja maquinaria de O-glicosilación en la que están implicadas grandes cantidades de diferentes enzimas que dependen unas de otras y de propiedades de sustratos complejos, los requisitos previos para una expresión del azúcar de núcleo interior Core-1, que es igual a TF cuando está expuesto, fueron muy difíciles. Además, la expresión combinada de altas cantidades de TF y glicoforina en las células de las líneas celulares de la presente invención es altamente ventajosa. TF está presente en la glicoforina (GPA) que apenas puede aumentarse mediante tratamiento con neuramidasa, lo que muestra que GPA existe como asialoglicoforina (AGPA) en la membrana de NM-F9 y NM-D4. La glicoforina A es un marcador para eritrocitos. Otras células carecen normalmente de glicoforina. La ventaja de TF en forma de AGPA es que se conoce a partir de estudios de Springer (Springer GF; Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. J. Mol. Med. 1997; 75:594-602) que AGPA en una preparación en bruto obtenida a partir de un procedimiento en bruto a partir de glóbulos rojos en combinación con desialilación enzimática da como resultado una vacunación contra el cáncer eficaz que otros tratamientos apenas cumplen o no cumplen. La presente invención usa esta gran ventaja de AGPA en forma de una línea celular que expresa de manera estable AGPA. Esto tiene muchas ventajas en comparación con la preparación convencional de AGPA a partir de células sanguíneas. Por ejemplo, 1) no existe la necesidad de ningún tratamiento enzimático para la producción de AGPA puesto que las líneas celulares presentadas en esta invención sintetizan la AGPA positiva para TF a diferencia de los glóbulos rojos que sintetizan la GPA negativa para TF. 2) No necesita preparación a partir de muestras de sangre, que pueden contaminarse con virus y priones y que son de composición heterogénea, altamente variables de un lote a otro, ni un procedimiento de purificación difícil basado en la extracción con fenol. 3) Estas ventajas se combinan con otros antígenos potentes, por ejemplo, Tn, TA-MUC1, MUC1 y LeX. Los grupos de TF en las moléculas de la estructura principal de glicoforina en forma de AGPA son en sí mismas altamente inmunogénicas cuando se purifican, lo que también se muestra mediante estos estudios históricos. Se sabe que la línea celular K562 (es decir, el origen de las líneas celulares de la presente invención) expresa glicoforina pero no TF. Por consiguiente, se supone que las líneas celulares de la presente invención contienen un defecto genético (por ejemplo, un defecto en glicosiltransferasas específicas) lo que conduce a una expresión de TF, que normalmente no está presente en células K562. Ahora es posible proporcionar una línea celular que expresa además de glicoforina también el antígeno de TF sin la necesidad de ninguna modificación adicional. Además, se identificó que NM-D4 eran particularmente adecuadas para la generación de MUC1 con el epítipo conformacional específico de tumor TA-MUC1, el epítipo tumoral de MUC1 que es aparentemente un epítipo conformacional inducido por modificaciones de glicosilación particulares en la región inmunodominante de MUC1 que comprende el péptido secuencia PDTRP. NM-F9 y NM-D4 expresan TA-MUC1 en una cantidad de aproximadamente $1-1,5 \times 10^5$ sitios de unión para anticuerpos específicos contra TA que no es una cantidad baja y que hasta ahora no se conocía. En cambio, se mostró que MUC1 se expresa en general en K562 en una cantidad apenas detectable o no detectable (Zhang K, Sikut R, Hansson GC. A MUC1 mucin secreted from a colon carcinoma cell line inhibits target cell lysis by natural killer cells. Cellular Immunology, 1997;176:158-165) y por tanto no se esperaba descubrir cantidades adecuadas de MUC1 y TA-MUC1 en estas células o células derivadas a partir de K562. Además, se conoce que MUC1 es inmunosupresora inhibiendo la proliferación de células T (Agrawal B, Krantz MJ, Reddish MA, Longenecker BM. Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. Nat Med. enero de 1998;4 (1):43-9) y la destrucción de células NK (Zhang K, Sikut R, Hansson GC. A MUC1 mucin secreted from a colon carcinoma cell line inhibits target cell lysis by natural killer cells. Cellular Immunology, 1997;176:158-165). Sin embargo, MUC1 expresada en células NM-F9 o NM-D4 no era inmunoinhibidora (véanse los resultados de los ejemplos adjuntos; en particular los datos *in vivo*). Además, se encontró que las células NM-F9 o NM-D4 expresan los antígenos tumorales de hidrato de carbono Tn pero en cantidades bajas y altas cantidades de LeX (igual a Lewis X o Le^x), que son otros antígenos de hidrato de carbono expresados en células de carcinoma. Por tanto, la acumulación de diversos antígenos pan-carcinómicos, incluyendo TF, en altas densidades adecuadas combinada con las capacidades ventajosas desde el punto de vista biotecnológico de K562 (en particular por ser una línea celular bien establecida y adecuada desde el punto de vista biotecnológico) hace que la línea celular NM-F9 y/o NM-D4 de la presente invención sea una línea celular maestra adecuada que puede usarse para todos o muchos tipos de tumor y carcinoma diferentes según los antígenos relevantes, en particular TF (incluyendo TF en una forma inmunogénica particular en la GPA transportadora como AGPA), TA-MUC1, MUC1, Tn y/o LeX así como otros antígenos tumorales que son parte de manera natural de NM-D4, originándose NM-F9 principalmente a partir del fenotipo de K562, y que no se investigaron adicionalmente en el presente documento, por ejemplo el gen de fusión BCR-ABL.

Según la presente invención, el término "línea celular" significa una línea celular o células que pueden hacerse crecer en condiciones de cultivo *in vitro* tal como se indica, por ejemplo, en los ejemplos adjuntos. Adicionalmente, dicho término también abarca células de un único tipo que se han hecho crecer en el laboratorio durante varias

generaciones. El término "líneas celulares de la presente invención" se refiere a (una) línea(s) celular(es) que expresa(n) TF en la superficie celular y que expresa(n) MUC1, preferiblemente TA-MUC1 en la superficie celular y que expresa(n) asialoglicoforina en la superficie celular. Además, dicho término se refiere preferiblemente a los clones celulares específicos NM-F9 y/o NM-D4 así como a subclones de los mismos. El significado de "subclones" se describe en el presente documento en otra parte. El término "NM-F9" tal como se usa en el presente documento, es equivalente a términos como por ejemplo "F9"; "clon F9" o "K562-F9" y se refiere a células de una línea celular o a una línea celular depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) ("DSMZ") el 14 de agosto de 2003 y que tiene el número de depósito DSM ACC2606.

El término "NM-D4" tal como se usa en el presente documento es equivalente a términos como por ejemplo "D4"; "clon D4" o "K562-D4" y se refiere a células de una línea celular o a una línea celular depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) ("DSMZ") el 14 de agosto de 2003 y que tiene el número de depósito DSM ACC2605.

La DSMZ se ubica en Mascheroder Weg 1b, D-38124 Brunswick, Alemania. Los depósitos en la DSMZ mencionados anteriormente se realizaron conforme a los términos del Tratado de Budapest sobre reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes. Las líneas celulares NM-F9 y NM-D4 se han depositado por Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG, Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlín, Alemania (es decir, el depositante) quien autoriza al solicitante de la presente solicitud a referirse al material biológico depositado descrito en el presente documento y proporciona su consentimiento incondicional e irrevocable al solicitante de la presente solicitud para que el material biológico depositado descrito en el presente documento se ponga a disposición del público según la Regla 28(1)(d) del Convenio de Patente Europea de 1973.

El término "subclones" cuando se usa según la presente invención significa células o células de una línea celular que se derivan a partir NM-F9 o NM-D4 y que se producen debido a alteraciones que se producen de manera natural, por ejemplo, mutaciones, pero que tienen características similares a las de las líneas celulares mencionadas anteriormente. En particular, los subclones tal como se mencionan en el presente documento tienen al menos las siguientes características similares (a) a (c) que comparten con NM-D4 y NM-F9:

(a) expresan TF en la superficie celular;

(b) expresan MUC1 y preferiblemente TA-MUC1 en la superficie celular; y

(c) expresan asialoglicoforina en la superficie celular.

El término "TA-MUC1" tal como se usa en el presente documento, es un epítipo conformacional en el que glicosilaciones particulares en la región PDTRP inducen una conformación que es específica de tumor. Dicho TA-MUC1 se ha descrito en gran detalle, por ejemplo, en el documento WO 2004 009632 (PCT/EP03/08014). Se prefiere que los antígenos mencionados anteriormente sean detectables (por ejemplo, en FACS; ELISA o similares) con los siguientes anticuerpos: A78-G/A7, Nemod-TF1 y/o Nemod-TF2 (Goletz S., Cao Y, Danielczyk a., Ravn P., Schöber U., y Karsten U. Thomsen-Friedenreich antigen: the "hidden" tumour antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003;535:147-62, todos obtenibles de NEMOD Immuntherapie AG (que ahora es NEMOD Biotherapeutics GmbH & Co. KG, Berlín, www.nemod.com para TF; A76-A/C7, VU-11E2, VU-11D1, BC4E549, VU-12E1, VU-3D1 y b-12 para MUC1 y preferiblemente A76-A/C7 y más preferiblemente PankoMab para TA-MUC1). Además, los anticuerpos mencionados anteriormente se conocen en la técnica. El anticuerpo A76-A/C7 puede obtenerse de NEMOD Biotherapeutics GmbH & Co. KG. El anticuerpo PankoMab se describe en Christensen A P, Danielczyk A, Stahn R, Goletz S. Simple separation of ADN in antibody purification. *Protein Expr Purif*, en impresión, y preferiblemente A83-C/B12 para glicoforina y preferiblemente A63-C/A9 para asialoglicoforina www.nemod.com). Además, se prefiere que los subclones de la presente invención (d) crezcan en suspensión en las condiciones de laboratorio convencionales (por ejemplo, tal como se detalla por la DSMZ para K562).

El experto en la técnica conoce bien métodos para determinar la presencia de los antígenos de hidrato de carbono mencionados anteriormente en la superficie de líneas celulares (por ejemplo, las líneas celulares de la presente invención) e incluyen por ejemplo ELISA; FACS; técnicas de inmunotransferencia como inmunotransferencia de tipo Western y/o técnicas de análisis de glicosilación tal como se describe y proporciona, por ejemplo, por Oxford GlycoSystems o Glycotope GmbH. Además, los ejemplos adjuntos describen la caracterización de los antígenos de superficie de hidrato de carbono de las líneas celulares de la presente invención en gran detalle.

Caracterización de NM-F9 y NM-D4

TF, que está ausente en K562, se expresa fuertemente y de manera estable en NM-F9 y NM-D4 tal como se muestra mediante la unión de los anticuerpos específicos contra TF A78-G/A7 (figura 1), Nemod-TF1 y Nemod-TF2. El tratamiento con neuramidasa de NM-F9 fuertemente positivas para TF revela que la sialilación se reduce en gran medida pero parte del TF todavía está sialilado (figura 2). Este último hecho depende de las condiciones de los medios.

NM-F9: junto con la expresión muy fuerte de TF, Tn y sialil-Tn, que se expresan ambos débilmente en K562wt (K562

de tipo natural; equivale a K562 tal como se obtuvo de DSMZ), están regulados por incremento y regulados por disminución, respectivamente. (figura 1 y figura 2). Para determinar si el aumento de la expresión de proteína transportadora era responsable en parte de estos cambios en la expresión de TF, se analizó la expresión de glicoforina A (GPA) y MUC1, proteínas transportadoras conocidas principales de TF. Claramente, no se observó un nivel de expresión diferente para MUC1 y sólo un aumento menor en GPA (figuras 1E, F, I, J y figura 2). En cambio, la unión del anticuerpo A63-C/A9, que reconoce glicoforina A sólo si está glicosilada con TF en un determinado sitio actuando por tanto como marcador para asialoglicoforina A (AGPA), la versión glicosilada con TF de GPA, es muy fuerte en NM-F9 y no está por encima del fondo en K562wt. Estos resultados indican que el aumento en la expresión de TF en NM-F9 está provocado por una capacidad fuertemente reducida de la célula para sialilar, lo que está respaldado por los estudios de unión con las lectinas SNA, PNA y MAA (figura 3A) y la determinación del contenido en ácido siálico en la fracción de membrana de células K562wt y NM-F9 (figura 3B). La tinción de lectina con MAA y SNA reveló que la cantidad total de ácidos siálicos con enlaces α 2-3 y 2-6 en las proteínas y lípidos de membrana era aproximadamente cinco veces y dos veces, respectivamente, menor en células NM-F9 (figura 3A). La unión de la lectina PNA sensible a la sialilación que se une preferentemente a TF, pero también otros residuos de galactosa terminal desialilada aumentaron aproximadamente 33 veces en NM-F9 (figura 3A). Finalmente, el contenido determinado químicamente de ácidos siálicos en la membrana celular se redujo casi tres veces en NM-F9 (figura 3B).

De manera interesante, Le^x, un marcador tumoral de hidrato de carbono complejo en N- y O-glicanos, estaba presente en células K562-wt (es decir, células K562 de tipo natural, proporcionadas por ejemplo por la DSMZ) pero su síntesis estaba inducida fuertemente en células NM-F9 (figura 2). Sin embargo, la forma sialilada de Le^x (s-Le^x), así como otros antígenos de hidrato de carbono de Lewis (es decir, Le^a, s-Le^a, Le^y), estaban ausentes en células K562-wt y NM-F9. UEAI, que detecta la fucosa terminal en diversas uniones incluyendo fucosa en Le^x y sLe^x, sólo se unió débilmente a K562wt pero fuertemente a NM-F9. Esto supone que el aumento de Le^x se genera por una regulación por incremento de la fucosilación que no se investigó más.

NM-D4: El clon NM-D4 tiene propiedades similares a NM-F9. Muestran una expresión muy similar de, por ejemplo, TF y Le^x (muy fuerte), GPA (fuerte) y sialil-Tn y s-Le^x (muy baja o ausente). Se observan diferencias en un fuerte aumento en TA-MUC1 y cierta disminución en Tn y el epítipo de A63-C/A9, mediante lo cual este último se expresa fuertemente en NM-D4. Con el fin de observar si aumenta el número de epítopos TA-MUC1 en MUC1 unida a membrana, se determinó el número de sitios de unión de PankoMab en K562wt, NM-F9 y NM-D4 y la afinidad de la unión mediante análisis de Scatchard usando ¹¹¹In-PankoMab radiomarcado (tabla 1). El análisis de Scatchard permite la determinación del número máximo de moléculas de anticuerpo unidas por célula y de la constante de asociación aparente de la reacción de unión. La representación gráfica de la razón de anticuerpo unido específicamente y libre frente a la concentración de anticuerpo unido específicamente revela una línea recta. Se calculó la capacidad de unión por célula a partir del valor de la ordenada en el origen en el eje de abscisas y la constante de asociación a partir de la pendiente de la línea. Sorprendentemente, el número de sitios de unión de PankoMab no estaba elevado en NM-F9 o NM-D4. Por el contrario, NM-D4 y NM-F9 tienen aproximadamente el 60-65% del número de sitios de unión que K562wt. Sin embargo, cambió la afinidad de la interacción entre PankoMab y las células. Mientras que PankoMab reconoce MUC1 en NM-F9 con sólo un leve aumento de la afinidad, MUC1 en NM-D4 se reconoce con una afinidad aumentada 5 veces en comparación con MUC1 en K562wt. Esto refleja que la glicosilación truncada alterada conduce a una accesibilidad y/o un plegado mejores del epítipo tumoral conformacional inducido por hidrato de carbono complejo de MUC1 (TA-MUC1) que es más prevalente en NM-D4 que en NM-F9. Estas determinaciones también muestran que MUC1, incluyendo TA-MUC1, está presente en NM-F9, NM-D4 y K562wt con una cantidad de sitios de unión de anticuerpo de entre aproximadamente $1-1,5 \times 10^5$, que no es baja y contradice las cantidades no detectables o apenas detectables de MUC1 en K562wt notificadas anteriormente (Zhang K, Sikut R, Hansson GC. A MUC1 mucin secreted from a colon carcinoma cell line inhibits target cell lysis by natural killer cells. Cellular Immunology, 1997;176:158-165).

Los números y cambios en veces de la expresión facilitados, realizados principalmente en análisis de FACS, no son absolutos para la descripción de NM-D4 y NM-F9 debido a varios motivos: son inherentes a la tecnología de FACS, las variaciones en intensidades absolutas de una medición a otra, el ajuste de los umbrales también tiene influencia; las condiciones de los medios pueden influir en la cantidad de sialilación residual de NM-F9 y NM-D4; es inherente a los cultivos celulares, incluso con clones de expresión estables, una leve variación en las cantidades de expresión que también podrían cambiar durante el ciclo celular.

En una realización adicional, las líneas celulares de la presente invención comprenden un vector. Un vector de este tipo puede ser, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, fagémido, bacteriófago u otro vector usado, por ejemplo, convencionalmente en la ingeniería genética o en la transfección de células de mamífero y puede comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permiten la selección de dicho vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas. Dicho vector puede ser uno seleccionado de vectores disponibles comercialmente. Los ejemplos no limitativos incluyen vectores de plásmido y sistemas de expresión compatibles con células de mamífero, tales como vectores pcDNA, vectores pSec, vectores pCMV, pCEP4 (todos de Invitrogen), pRK5, pMC1neo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), vectores pBK (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, vectores pTRE (Clontech), vectores pet-On/Off (Clontech), y vectores bicistronicos y bidireccionales (por ejemplo, vectores pIRES, vectores pBI, Clontech)). Para técnicas de

modificación de vectores, véase Sambrook y Russel "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001). Los vectores pueden contener uno o más sistemas de replicación y herencia para la clonación o la expresión, de uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión. Para su uso en pacientes, se prefieren usar sistemas de selección y/o clonación celular individualmente sin la introducción de marcadores de resistencia a antibióticos.

En una realización adicional, dicho vector comprende una molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico según la invención puede ser cualquier tipo de ácido nucleico, por ejemplo ADN o ARN. El ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico; ADN sintético o ADNc. El ARN puede ser, por ejemplo, ARNm. La molécula de ácido nucleico puede ser natural, sintética o semisintética o puede ser un derivado, tal como fosforotioatos. Además, la molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ácido nucleico quimérica producida de manera recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente o bien sola o bien en combinación. Las moléculas de ácido nucleico comprendidas en dicho vector pueden sintetizarse mediante métodos convencionales, aislarse a partir de fuentes naturales o prepararse como híbridos. La ligación de las secuencias codificantes a elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores, aisladores o similares) y/o a otras secuencias codificantes de aminoácidos puede llevarse a cabo usando métodos establecidos. Dicho vector se introduce en las células de las líneas celulares de la presente invención mediante métodos conocidos comúnmente en la técnica, por ejemplo, lipofección, electroporación, transfección con fosfato de Ca y similares.

Además, los vectores pueden comprender elementos de control de la expresión, permitiendo la expresión apropiada de las regiones codificantes en huéspedes adecuados. El experto conoce tales elementos de control y pueden incluir un promotor, codón de iniciación de la traducción, sitio de traducción e inserción o sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) para introducir un inserto en el vector. Los expertos en la técnica conocen bien los elementos de control que garantizan la expresión en células eucariotas y procariontes. Tal como se mencionó anteriormente, habitualmente comprenden secuencias reguladoras que garantizan la iniciación de la transcripción y opcionalmente señales de poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción así como de la traducción, y/o regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas. Posibles elementos reguladores que permiten la expresión comprenden, por ejemplo, el promotor de timidina cinasa del CMV-VHS, SV40, promotor de VSR (virus del sarcoma de Rous), promotor del factor de elongación humano 1α , potenciador de CMV, promotor de CaM-cinasa o potenciador de SV40. Para la expresión en las células/líneas celulares de la presente invención, se conocen bien en la técnica varias secuencias reguladoras. Para la expresión en células procariontes, se ha descrito una multitud de promotores incluyendo, por ejemplo, el promotor *tac-lac*, el promotor *lacUV5* o *trp*. Junto a los elementos que son responsables de la iniciación de la transcripción de tales elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio de poli-A de SV40 o el sitio de poli-A de tk, en el sentido de 3' del polinucleótido. En este contexto, en la técnica se conocen vectores de expresión adecuados tal como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pCDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3, pcDNA5 (Invitrogen). Un vector de expresión según esta invención puede al menos dirigir la replicación, y preferiblemente la expresión, de ácidos nucleicos contenidos en el mismo. Los orígenes de replicación adecuados incluyen, por ejemplo, el SV40 viral y los orígenes de replicación. Las secuencias de terminación adecuadas incluyen, por ejemplo, la hormona de crecimiento bovina, SV40, *lacZ* y señales de poliadenilación poliédricas de AcMNPV. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen resistencia a neomicina, ampicilina e higromicina y similares. Los vectores diseñados específicamente permiten el intercambio de ADN entre diferentes células huésped, tales como células bacterianas-animales. El vector puede comprender además secuencias de ácido nucleico que codifican para señales de secreción. El experto en la técnica conoce bien tales secuencias. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, pueden añadirse secuencias líder que pueden dirigir, por ejemplo, un polipéptido expresado a un compartimento celular, a la secuencia codificante de las moléculas de ácido nucleico de la invención y se conocen bien en la técnica. La(s) secuencia(s) líder se ensambla(n) en la fase apropiada con secuencias de traducción, iniciación y terminación, y preferiblemente, una secuencia líder que puede dirigir la secreción de la proteína traducida o una parte de la misma, en, entre otros, la membrana extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar para una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación C- o N-terminal que confiere las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y, si se desea, puede seguir la recogida y purificación de las proteínas, fragmentos antigénicos o proteínas de fusión de la invención. Por supuesto, el vector también puede comprender regiones reguladoras de organismos patógenos.

Además, dicho vector también puede ser, además de un vector de expresión, un vector de transferencia génica y/o de direccionamiento génico. La terapia génica, que se basa en la introducción de genes terapéuticos (por ejemplo, para vacunación) en células mediante técnicas *ex vivo* o *in vivo* es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia génica. Los vectores, sistemas de vectores y métodos adecuados para la terapia génica *in vitro* o *in vivo* se describen en la bibliografía y los conoce el experto en la técnica; véanse, por ejemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-

716; el documento WO 94/29469; el documento WO 97/00957; Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640 o Verma, Nature 389 (1997), 239-242 y las referencias citadas en los mismos. Los vectores tal como se describieron anteriormente en el presente documento pueden diseñarse para la introducción directa o para la introducción mediante liposomas, o vectores virales (por ejemplo, adenovirales, retrovirales) en la célula.

5 Adicionalmente, pueden usarse sistemas baculovirales o sistemas basados en virus vaccinia o virus del bosque de Semliki como sistema de expresión eucariota para la molécula de ácido nucleico comprendida en los vectores comprendidos en las líneas celulares de la presente invención.

En otra realización preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico comprendida en el vector mencionado anteriormente codifica para un polipéptido o fragmentos del polipéptido seleccionados del grupo que consiste en una citocina, como IL-2, IL-12, IL-15, moléculas presentadoras de antígeno como moléculas de CMH de clase I y CMH de clase II, moléculas coestimuladoras, tales como CD80 y CD86, factores de crecimiento como GM-CSF, epítomos de células T o multímeros de los mismos, antígenos tumorales o fragmentos de los mismos, hormonas u hormonas sexuales, como FSH, hCG, insulina, adyuvantes o fragmentos de adyuvantes, como epítomos auxiliares de células pan-T, anticuerpos y otras moléculas, como eritropoyetina, glicoforina o formas de antígenos que carecen de dominios transmembrana para la secreción, como glicoforina que carece de transmembrana y parte intracelular pero con una señal de secreción adicional o cualquier combinación de los mismos.

El término "anticuerpo" comprende derivados o fragmentos de los mismos que todavía mantienen la especificidad de unión. Dicho término incluye además anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, así como fragmentos de anticuerpo, como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos o derivados de anticuerpo comprenden además fragmentos F(ab')₂, Fv o scFv; véase, por ejemplo, Harlow y Lane ("Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988). En particular, se prefiere que los anticuerpos/constructos de anticuerpo así como los fragmentos o derivados de anticuerpo se empleen según esta invención o que puedan expresarse en una célula.

Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, el término "molécula de anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina completas así como a partes de tales moléculas de inmunoglobulina. Además, el término se refiere, tal como se indicó anteriormente, a moléculas de anticuerpo modificadas y/o alteradas, como anticuerpos quiméricos y humanizados. El término también se refiere a anticuerpos sintetizados/generados de manera recombinante. El término también se refiere a anticuerpos intactos así como a fragmentos de anticuerpo de los mismos, como, cadenas ligeras y pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. El término "molécula de anticuerpo" también comprende constructos de anticuerpo y anticuerpos bifuncionales, como Fvs de cadena sencilla (scFv) o proteínas de fusión de anticuerpo. También se prevé en el contexto de esta invención que el término "anticuerpo" comprenda constructos de anticuerpo que pueden expresarse en células, por ejemplo constructos de anticuerpo que pueden transfectarse y/o transducirse mediante, entre otros, virus o vectores.

También se prevé que el polipéptido codificado por el ácido nucleico comprendido en un vector que está comprendido en la línea celular de la presente invención esté glicosilado y/o pegilado.

Los expertos en la técnica conocen la generación y producción de moléculas (como por ejemplo glicoproteínas) que carecen de o con baja sialilación que se modifican, por ejemplo, mediante pegilación u otras moléculas y técnicas adecuadas, con el fin de mejorar su actividad biológica, su capacidad de detección y/o idoneidad farmacéutica. De ese modo se generan moléculas como glicoproteínas sin o con baja cantidad de ácidos siálicos mediante la expresión de estas moléculas en las líneas celulares de la presente invención, en particular en la línea celular NM-F9, NM-D4. Estas moléculas se aíslan o bien a partir de las células o bien preferentemente a partir de los medios de los cultivos celulares de estas células mediante la expresión como moléculas secretadas mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las moléculas se modifican además mediante métodos químicos o enzimáticos, por ejemplo mediante pegilación, unión de fluorocromos, ligadores químicos, péptidos, proteínas u otras moléculas químicas como biotina, conocidos por los expertos en la técnica.

Una forma preferida es la pegilación usando CMP-ácido siálico unido a PEG en combinación con una o varias sialiltransferasas tal como se conoce, por ejemplo, para la GlycoPegylación™ descrita por Neose Inc. (www.neose.com). Las moléculas expresadas por las células de la invención tiene las ventajas: o bien, (i) permitir una pegilación mayor y/o más eficaz y/o más controlable en las cadenas de azúcar debido a la carencia o a las bajas cantidades de sitios de hidrato de carbono sililados, lo que da como resultado moléculas mejoradas biológicamente en el sentido conocido asociado con pegilación y/o un procedimiento más eficaz y/o normalizable/controlable; o bien (ii) permitir la unión de la modificación a sitios de glicano a los que no puede unirse de manera convencional o sólo mediante modificación adicional compleja antes de la adición de la modificación; o bien (iii) carecer de los requerimientos para desialilar parcial o completamente la molécula diana con el fin de obtener una pegilación adecuada mediante los procedimientos conocidos. Las moléculas expresadas por sistemas de expresión convencionales tales como, por ejemplo, células CHO, NSO, Per.C6 o HEK tienen una mayor sialilación de las moléculas expresadas que las expresadas por células de la presente invención. Por tanto, las moléculas expresadas de manera convencional o bien tienen una modificación menor o menos eficaz o bien tienen que desialilarse enzimática o químicamente *in vitro* y purificarse adicionalmente lo que es laborioso y costoso, especialmente cuando se producen para su uso clínico y a menudo generan problemas al imponer un procedimiento controlable normalizado con respecto a los altos requerimientos clínicos. En cambio, la ventaja de la presente invención es que

el uso de las líneas celulares de la invención y las moléculas de ácido nucleico expresadas en estas líneas celulares es que las etapas relacionadas con la desialilación serán innecesarias y el procedimiento de modificación es más eficaz, más normalizable y controlable, más barato y/o más rápido. En comparación con las tecnologías convencionales, a menudo este procedimiento es ventajoso puesto que la pegilación no se produce en la estructura principal del péptido y por tanto a menudo reduce la actividad *in vitro* pero está muy lejos de los sitios activos evitando una reducción de la bioactividad *in vitro*.

Además de la pegilación, se prefieren otras modificaciones químicas o enzimáticas en combinación con moléculas expresadas en las líneas celulares de la invención: por ejemplo, compuestos bioactivos o funcionales como hidratos de carbono, hidratos de carbono modificados, péptidos, ligadores, polímeros solubles en agua, toxinas, fluorocromos, moléculas de unión tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, quimiocinas o citocinas, hormonas o factores de crecimiento, u otras moléculas bioactivas se unen mediante la pegilación de hidratos de carbono (no restringido a los ejemplos). Los expertos en la técnica conocen el método de unión. Preferiblemente, las uniones se producen mediante un grupo de unión a glicosilo conocido por los expertos en la técnica. La(s) ventaja(s) de usar moléculas expresadas por las células de la presente invención es/son las mismas que las descritas anteriormente para la pegilación. Además, la modificación *in vitro* por hidratos de carbono o hidratos de carbono modificados usando las moléculas expresadas por las células de la presente invención permite una unión y una desviación controladas hacia determinados tipos de ácidos siálicos, uniones de ácidos siálicos y posiciones de unión que es beneficioso para la actividad biológica de la molécula y permite una producción a medida del patrón de ácidos siálicos.

Alternativa o adicionalmente, las líneas celulares de la presente invención pueden comprender un ARN antisentido, ARNi, ARNip o ribozima con el fin de silenciar genes no pretendidos que se expresan o podrían expresarse en las líneas celulares de la presente invención, por ejemplo cuando se emplean las líneas celulares de la presente invención como vacunas. Un enfoque de ARNip se da a conocer, por ejemplo, en Elbashir ((2001), Nature 411, 494-498)). También se prevé según esta invención que, por ejemplo, se empleen ARN de horquilla corta (ARNhc). El enfoque de ARNhc para el silenciamiento de genes se conoce bien en la técnica y puede comprender el uso de ARNtp (temporal pequeño); véase, entre otros, Paddison (2002) Genes Dev. 16, 948-958. Los enfoques para el silenciamiento de genes se conocen en la técnica y comprenden enfoques de "ARN" como ARNi o ARNip. El uso satisfactorio de tales enfoques se ha mostrado en Paddison (2002) loc. cit., Elbashir (2002) Methods 26, 199-213; Novina (2002) Mat. Med. 3 de junio de 2002; Donze (2002) Nucl. Acids Res. 30, e46; Paul (2002) Nat. Biotech 20, 505-508; Lee (2002) Nat. Biotech. 20, 500-505; Miyagashi (2002) Nat. Biotech. 20, 497-500; Yu (2002) PNAS 99, 6047-6052 o Brummelkamp (2002), Science 296, 550-553. Estos enfoques pueden estar basados en vector, por ejemplo puede empelarse el vector pSUPER, o vectores de ARN pol III tal como se ilustra, entre otros, en Yu (2002) loc. cit.; Miyagashi (2002) loc. cit. o Brummelkamp (2002) loc. cit. "Antisentido" y "nucleótido antisentido" significa constructos de ADN o ARN que bloquean la expresión de del producto génico que se produce de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, los términos "oligonucleótido antisentido" y "oligómero antisentido" se usan de manera intercambiable y se refieren a una secuencia de bases de nucleótidos que permite que el oligómero antisentido se hibride a una secuencia diana en un ARN por apareamiento de base de Watson Crick, para formar un heterodúplex de ARN:oligómero dentro de la secuencia diana.

También se prevé que las células de las líneas celulares de la presente invención se modifiquen mediante ingeniería genética, se muten o infecten por virus oncogénicos o mediante mutagénesis al azar usando productos químicos, tales como EMS (metanosulfonato de etilo). En el contexto de la presente invención el término "modificado mediante ingeniería genética" se usa en su sentido más amplio para métodos conocidos por el experto en la técnica para modificar ácidos nucleicos deseados *in vitro* e *in vivo* de manera que se efectúen modificaciones genéticas y se alteren genes mediante tecnología de ADN recombinante. Por consiguiente, se prefiere que dichos métodos comprendan clonación, secuenciación y transformación de ácidos nucleicos recombinantes. Para este fin, pueden usarse vectores, cebadores, enzimas, células huésped y similares apropiados y conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente, las células modificadas mediante ingeniería genética comprenden células que albergan ácidos nucleicos recombinantes que codifican para antígenos o inmunógenos o partes de los mismos, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y similares. Antígenos e inmunógenos pueden ser, por ejemplo, uno o más antígenos tumorales o partes de los mismos, antígenos de parásitos o microorganismos infecciosos, tales como bacterias, hongos, virus y similares. Además, entre los inmunógenos se encuentran, por ejemplo, moléculas que aumentan la inmunogenicidad, tales como epítopos de células pan-T o multímeros de los mismos, como epítopos PADRE o fragmentos del toxoide tetánico que provocan un efecto inmunoestimulador adicional mediante la activación de procesos mediados por CMH de clase II. También se prevé que las células de las líneas celulares de la presente invención se modifiquen mediante ingeniería genética con ácidos nucleicos que codifican para moléculas efectoras, tales como factores de transcripción, componentes de rutas de transducción de señales o cascadas de señalización, o citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y similares que pueden modular directa o indirectamente la expresión de moléculas endógenas, por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, polipéptidos modificados de manera postraduccional y lípidos y similares. Más preferiblemente, las células tumorales se transfectan de manera transitoria o estable con una molécula de ácido nucleico deseada.

También se prevé que las células de las líneas celulares de la presente invención se modifiquen mediante ingeniería genética de modo que expresen un polipéptido contra el que deben producirse anticuerpos. Si se producen lisados celulares a partir de estas células tumorales y se administran a un individuo, se espera que se desarrolle una

respuesta inmunitaria humoral y/o celular por los individuos, preferiblemente esta respuesta inmunitaria comprende respuestas de anticuerpos y/o respuestas de células T cooperadoras y/o respuestas de células T citotóxicas, más preferible es la combinación de respuestas inmunitarias humorales y celulares.

5 Según la presente invención, el término "mutado" significa (una) modificación/modificaciones permanente(s) del material genético, es decir ácidos nucleicos, provocada(s), por ejemplo, de manera natural o por medios físicos o compuestos/sustancias/agentes químicos tales como EMS. Dichas modificaciones incluyen mutaciones puntuales, tales como transiciones o transversiones, delección/inserción/adición de una o más bases dentro de un ácido nucleico/gen/cromosoma modificando así el ácido nucleico/gen/cromosoma, lo que puede provocar, entre otros, expresión/transcripción/traducción génica aberrante o productos génicos inactivos, productos génicos 10 activos/inactivos constitutivos lo que conduce a, por ejemplo, efectos dominantes negativos. Por tanto, también se prevé que las células de las líneas celulares de la presente invención comprendan células que alberguen (una) mutación/mutaciones en (un) gen(es) deseado(s) o en las que se induzca (una) mutación/mutaciones en (un) gen(es) deseado(s) mediante métodos conocidos por el experto en la técnica. También se conoce en la técnica anterior que pueden seleccionarse células tumorales mutadas o modificadas mediante ingeniería genética mediante cualquier método/fenotipo adecuado. 15

Según la presente invención el término "infectado" significa células de las líneas celulares de la presente invención, que se han infectado con un virus, o viroide, y/o estructura proteica. Dicho virus, o viroide, y/o estructura proteica también puede usarse como un vehículo para modificar mediante ingeniería genética dichas células. Se prefiere que dicho virus que infecta células tumorales sea un virus oncogénico, sin embargo, no se limita a virus oncogénicos. Lo 20 más preferiblemente, dicho virus oncogénico se selecciona del grupo que consiste en retrovirus o virus de ADN, por ejemplo, papovavirus como los virus del papiloma humano (VPH), oncovirus tipo C, como los virus de la leucemia de células T humanas (VLTH), virus del herpes, como el virus Epstein-Barr (VEB), hepadnavirus, como el virus de la hepatitis B (VHB), y lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). También se prevé que células tumorales ya estén infectadas con uno cualquiera de los virus mencionados anteriormente. Además, las células tumorales infectadas o lisados de las mismas pueden ser importantes cuando se usan para la vacunación profiláctica/terapéutica contra enfermedades infecciosas provocadas, por ejemplo, por virus como VIH, VHB, virus de la hepatitis C (VHC), VPH. Preferiblemente, el/los componente(s) infeccioso(s) comprendido(s) en los lisados producidos a partir de estas células infectadas tiene(n) que inactivarse adicionalmente. Los expertos en la técnica conocen los métodos que han de usarse, por ejemplo, inactivación por calor, inactivación con ácido y/o filtración 30 estéril o similares.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un lisado de las líneas celulares de la presente invención.

Según la presente invención, el término "lisado" significa una disolución o suspensión en un medio acuoso de las células de la presente invención, en el que al menos el 50%, preferiblemente el 75% y lo más preferido más del 95%, por ejemplo el 99% o lo más preferido el 100% de las células están rotas. Sin embargo, el término no debe interpretarse de manera limitativa. El lisado celular comprende, por ejemplo, macromoléculas, como ADN, ARN, 35 proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos y similares y/o micromoléculas, como aminoácidos, azúcares, ácidos lipídicos y similares, o fracciones de los mismos. Adicionalmente, dicho lisado comprende residuos celulares que pueden ser de estructura lisa o granular. Preferiblemente, el lisado carece de la totalidad o de la mayor parte del ADN. Los expertos en la técnica conocen la preparación de tales lisados y fracciones de los mismos. Los detalles de las preparaciones de tales lisados celulares así como para la preparación de lisados celulares inducidos por calor se describen específicamente en una solicitud PCT publicada el 18 de agosto de 2003 a nombre de NEMOD Immuntherapie AG y basada en el documento EP 02 01 8512. Por consiguiente, los expertos en la técnica se encuentran fácilmente en la posición de preparar los lisados deseados remitiéndose a las explicaciones generales anteriores y explicaciones específicas en el documento EP 02 09 8512 (con respecto al que reivindica prioridad el 40 documento PCT/EP 2003/009140, publicado como WO 2004/018659).

Además, la presente invención se refiere a moléculas, a una mezcla de moléculas o fragmentos de las mismas obtenidos a partir de las líneas celulares de la presente invención.

Según la presente invención el término "moléculas" significa biomoléculas obtenidas a partir de las células de la presente invención. Estas biomoléculas pueden ser, por ejemplo, proteínas, glicoproteínas o glicolípidos y pueden obtenerse mediante técnicas de fraccionamiento adecuadas, por ejemplo una única cromatografía o una combinación de diversas cromatografías con el fin de obtener la molécula o una mezcla de moléculas deseadas. Los 50 expertos en la técnica conocen bien las técnicas para los fraccionamientos y las etapas de purificación. Las moléculas pueden obtenerse a partir de los medios, por ejemplo, a partir de moléculas secretadas o mediante la preparación a partir de células, por ejemplo a partir de membranas, citoplasma, nucleoplasma o compartimentos como el retículo endoplasmático/aparato de Golgi. Ejemplos son MUC1 obtenidas a partir de los medios en los que se prefieren NM-D4 antes de NM-F9 como fuente. Esta MUC1 porta grupos de TF y el epítipo TA-MUC1 (tabla 2) y es inmunoestimuladora. Otro ejemplo es la generación de AGPA (asioalloglicoforina) a partir de preparaciones de membrana en las que se prefieren NM-F9 por encima de NM-D4. El rendimiento de estas últimas puede aumentarse, por ejemplo, usando un vector de expresión para la transfección de la glicoforina A. Puede generarse 60 AGPA soluble mediante transfección de un vector que codifica para glicoforina A sin dominio transmembrana ni partes intracelulares pero con señales secretoras.

Además, la presente invención se refiere a células dendríticas cargadas con el lisado de la presente invención.

Según la presente invención, el término "células dendríticas" se refiere a células presentadoras de antígeno profesionales que capturan antígenos y migran a los ganglios linfáticos y al bazo, en donde son particularmente activas en la presentación del antígeno procesado en células T. El término "células dendríticas" también significa células que tienen una actividad y una función similares a las de las células dendríticas. Las células dendríticas pueden derivarse a partir de los linajes o bien linfóide o bien de fagocitos mononucleares. Dichas células dendríticas pueden encontrarse en tejido linfático y no linfático. Estas últimas parecen inducir una respuesta de células T sólo cuando se han activado y han migrado a tejidos linfáticos. Se sabe que las células dendríticas son los activadores y reguladores más potentes, o se encuentran entre los más potentes, de respuestas inmunitarias. Una característica importante es que son actualmente las únicas células presentadoras de antígeno que se sepa que estimulan células T no expuestas. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan por su capacidad para capturar y procesar antígenos, una función que se reduce drásticamente en las células dendríticas maduras, que muestran a su vez una presentación potenciada de antígenos procesados en su superficie, principalmente unidos a moléculas de CMH de clase I y de clase II pero también mediante moléculas CD1. La maduración también se asocia con la regulación por incremento de moléculas coestimuladoras (tales como CD40, CD80 y CD86), así como determinadas otras proteínas de la superficie celular (por ejemplo, CD83 y señal de CD). La maduración de células dendríticas también se asocia habitualmente con una capacidad de migración potenciada, dando como resultado la migración (*in vivo*) de células dendríticas a los ganglios linfáticos regionales, en los que las células dendríticas se encuentran con linfocitos T y B. Las células dendríticas pueden obtenerse a partir de individuos usando métodos conocidos por los expertos en la técnica y se describen en más detalle en los ejemplos en el presente documento. Además, según la invención, las células dendríticas también son aquellas células o líneas celulares que muestran las características funcionales y/o fenotípicas comparables a las células dendríticas, por ejemplo células derivadas de MUTZ-3.

Las células dendríticas o sus precursores se diferencian usando factores de crecimiento y/o citocinas adecuados, por ejemplo GM-CSF e IL-4 tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento, las células dendríticas inmaduras resultantes se cargan con un lisado según la invención. Las CD inmaduras (CDi) cargadas con un lisado según la invención se maduran adicionalmente para dar CD maduras (CDm). En casos especiales, también pueden cargarse CDm (pulsada) con antígenos o inmunógenos del lisado. Las composiciones de vacuna o composiciones farmacéuticas para prevenir o tratar cánceres, enfermedades tumorales y/o enfermedades infecciosas comprenden preferentemente CDm cargadas que se originan a partir de CDi cargadas y maduras o que se cargaron después de o durante la maduración. Las células dendríticas pueden cargarse o bien con lisados, fracciones de lisados, una molécula o una mezcla de moléculas o fragmentos de las mismas que se originan a partir de NM-F9 y/o NM-D4. Además, las células dendríticas pueden cargarse mediante incubación conjunta o fusión con células de estas líneas celulares.

Una realización adicional de la presente invención es una composición que comprende las líneas celulares, el lisado, moléculas, mezclas de moléculas y/o las células dendríticas de la presente invención.

Con el fin de investigar el potencial de lisados de NM-F9 para inducir respuestas inmunitarias celulares y humorales se realizaron los siguientes ensayos: pudo mostrarse *in vitro* que la proliferación de células T se indujo cuando se cultivaron conjuntamente con CD derivadas de monocitos maduras cargadas con lisados de células NM-F9 (figura 5). Las CD se cargaron con el lisado en el estado inmaduro y maduras adicionalmente, lo que conduce a la captación, procesamiento y presentación de antígeno en el contexto de moléculas de CMH de clase I y II en CD maduras (CDmoh). Se observó este efecto inmunogénico de lisados de células NM-F9 para células T totales, células T cooperadoras CD4+ y células T CD8+ citotóxicas.

La activación de células T citotóxicas no expuestas específicas frente a MUC1 y AGPA se sometió a prueba con células dendríticas humanas maduras funcionales m-NMDC11 cargadas con lisados de NM-F9 en la reacción de sensibilización y reestimulación con m-NMDC11 cargadas con un péptido de MUC1 A2 y proteína AGPA respectivamente, mostrando que los CTL no expuestos pueden activarse frente a estos antígenos usando NM-F9 (figura 6). NMDC11 es una línea celular dendrítica humana completamente funcional derivada de MUTZ-3 optimizada con características tal como se describen en el documento WO03/023023.

La inducción de una respuesta de anticuerpos frente a varios antígenos se sometió a prueba en ratones NOD/SCID reconstituidos con PBMC humanos que se vacunaron con lisados de células NM-F9. Sorprendentemente, pudo observarse una respuesta de anticuerpos en forma de IgM humana pero también de IgG frente a TF, Tn, MUC1 y AGPA (tabla 3). La inducción de una respuesta de IgG indica un cambio de la clase de anticuerpo asociada con una respuesta inmunitaria de células T cooperadoras así como una inducción de respuestas inmunitarias de memoria frente a los antígenos anteriores incluyendo los antígenos de hidrato de carbono.

Por consiguiente, en una realización preferida, dicha composición es una composición farmacéutica. Las células que se sometieron a prueba para determinar si estaban libres de virus se hacen crecer de manera convencional en medios, preferiblemente medios libre de suero. Se recogen las células mediante medios convencionales y se transfieren a disoluciones adecuadas para la aplicación que se describen en más detalle a continuación. Las células se usan o bien frescas o bien tras ultracongelación y nueva descongelación en medio de congelación especial conocido por el experto, mediante lo cual es normal cierta pérdida de vitalidad, en un modo de vida preferiblemente

tras irradiación letal que impide la proliferación, o como lisados generados tal como se describió y citó anteriormente, o en forma de moléculas o mezclas de moléculas generadas y purificadas tal como se describe en otra parte del documento. Tales composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de las líneas celulares, el lisado, moléculas, mezclas de moléculas y/o las células dendríticas de la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede administrarse con un portador fisiológicamente aceptable a un paciente, tal como se describe en el presente documento. En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia normativa u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los que tienen su origen en el petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, oil de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del lisado celular, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

En otra realización, la composición se formula según procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para la administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas están en una forma soluble en agua, tal como sales farmacéuticamente aceptables, que se pretende que incluyan sales de adición tanto de ácidos como de bases. La administración de los agentes candidatos de la presente invención puede realizarse de una variedad de maneras tal como se comentó anteriormente, incluyendo, pero sin limitarse a, por vía oral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intranasal, por vía transdérmica, por vía intraganglionar, por vía peritumoral, por vía intratumoral, por vía intratecal, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intrapulmonar, por vía vaginal, por vía rectal o por vía intraocular. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para calmar el dolor en el lugar de inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados juntos en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobre indicando la cantidad de principio activo. Cuando la composición vaya a administrarse mediante infusión, puede prepararse con una botella de infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de solución salina o agua estéril para inyección de manera que los componentes puedan mezclarse antes de la administración. La cantidad de las líneas celulares, el lisado celular y/o las células dendríticas de la presente invención que será eficaz en el tratamiento o la prevención (en particular, mediante vacunación) de cánceres, tumores y/o enfermedades tumorales, puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que vaya a emplearse en la formulación, también dependerá de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas a partir de sistemas de prueba de modelos animales o *in vitro*.

En una realización preferida adicional, la composición de la presente invención es una composición de vacuna.

Según la presente invención, el término “composición de vacuna” se refiere a cualquier composición que puede usarse como vacuna. Una vacuna significa un uso terapéutico o profiláctico de la composición farmacéutica que induce una respuesta inmunitaria. Las formas o los métodos para fabricar composiciones de vacuna según la presente invención no están particularmente limitados, y puede prepararse una composición en una forma deseada aplicando un único método disponible en el campo de la técnica o métodos en una combinación apropiada. Para la fabricación de una composición de vacuna, pueden usarse medios acuosos tales como agua destilada para inyección y solución salina fisiológica, así como una o más clases de aditivos farmacéuticos disponibles en el campo de la técnica. Por ejemplo, pueden usarse agentes tamponantes, agentes de ajuste del pH, adyuvantes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes calmantes, antisépticos y similares, y los expertos en la técnica conocen bien componentes específicos de los mismos. La composición de vacuna también puede prepararse como una preparación sólida tal como una preparación liofilizada, y después prepararse como una inyección añadiendo un

agente solubilizante tal como agua destilada para inyección antes de su uso. Dependiendo de la vía de introducción, los compuestos pueden formularse de una variedad de maneras tal como se indica a continuación. La concentración del compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar desde aproximadamente el 0,1-100% en peso. La composición de vacuna puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, es decir, radiación, u otros agentes quimioterápicos o agentes anticancerígenos. En una realización preferida, las composiciones de vacuna están en una forma soluble en agua, tal como sales farmacéuticamente aceptables, que se pretende que incluyan sales de adición tanto de ácidos como de bases. Las composiciones de vacuna pueden prepararse de diversas formas, tales como disoluciones, suspensiones, y similares para inyección. Las composiciones de vacuna también pueden incluir uno o más de los siguientes: proteínas transportadoras tales como albúmina sérica; tampones; agentes estabilizantes; agentes colorantes y similares. Los aditivos se conocen bien en la técnica, y se usan en una variedad de formulaciones. Una composición de vacuna según la presente invención se usa preferiblemente en la inmunización contra el cáncer y/o enfermedades tumorales.

En otra realización, la composición farmacéutica o de vacuna según la presente invención comprende además célula y/o lisados de una célula heteróloga. El término "lisados" ya se explicó anteriormente en el presente documento.

Cuando se usa en el contexto de la presente invención, el término "célula heteróloga" significa una célula que no es idéntica a las células de las líneas celulares de la presente invención. Particularmente, dicha célula heteróloga puede ser autóloga, alogénica o xenogénica para el individuo en el que puede aplicarse. En el contexto de la presente invención, el término "autólogo" significa que las células heterólogas se derivan a partir del mismo individuo al que se le administrará más tarde la composición farmacéutica o de vacuna según la invención. Según la presente invención, el término "alogénico" significa que las células heterólogas se derivan a partir de un individuo que es diferente del individuo al que se le administrará más tarde la composición farmacéutica o de vacuna según la presente invención. El término "xenogénico" significa que las células heterólogas comprenden células que no se originan a partir de la misma especie a la que se le administrará más tarde la composición farmacéutica o de vacuna según la presente invención. Se prevé que dicha célula heteróloga sea, por ejemplo, una célula tumoral derivada a partir de un tumor o metástasis, incluyendo también micrometástasis que pueden obtenerse, por ejemplo, mediante cirugía, biopsia, o similares. Las células tumorales pueden derivarse a partir de cualquier tipo posible de tumores.

Los ejemplos de tales células tumorales heterólogas así como las indicaciones para las que pueden usarse las composiciones farmacéuticas o de vacuna de la invención se ejemplifican en lo siguiente: ejemplos son carcinomas de piel, de mama, de cerebro, cervicouterinos, carcinomas testiculares, de cabeza y cuello, de pulmón, del mediastino, del tracto gastrointestinal, del sistema genitourinario, del sistema ginecológico, de mama, del sistema endocrino, de piel, infantiles, cáncer de localización primaria desconocida o metastásico, un sarcoma del tejido blando y el hueso, un mesotelioma, un melanoma, una neoplasia del sistema nervioso central, un linfoma, una leucemia, un síndrome paraneoplásico, una carcinomastosis peritoneal, un cáncer metastásico y/o tumor maligno relacionado con inmunosupresión, etc. Las células tumorales pueden derivarse, por ejemplo, a partir de: cabeza y cuello, comprendiendo tumores de la cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glándulas salivales y paragangliomas, un cáncer de pulmón, comprendiendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, un cáncer del mediastino, un cáncer del tracto gastrointestinal, comprendiendo cáncer de esófago, de estómago, de páncreas, de hígado, de las vías biliares, de intestino delgado, de colon, de recto y de la zona anal, un cáncer del sistema genitourinario, comprendiendo cáncer de riñón, de uretra, de vejiga, de próstata, de uretra, de pene y de testículos, un cáncer ginecológico, comprendiendo cáncer del cuello uterino, de vagina, de vulva, del cuerpo uterino, enfermedades trofoblásticas gestacionales, de ovarios, de las trompas de Falopio, peritoneal, un cáncer de mama, un cáncer del sistema endocrino, comprendiendo un tumor de la tiroides, paratiroides, corteza suprarrenal, tumores endocrinos pancreáticos, tumor carcinoide y síndrome carcinoide, neoplasias endocrinas múltiples, un sarcoma del tejido blando y el hueso, un mesotelioma, un cáncer de piel, un melanoma, comprendiendo melanomas cutáneos y melanomas intraoculares, una neoplasia del sistema nervioso central, un cáncer infantil, comprendiendo retinoblastoma, tumor de Wilm, neurofibromatosis, neuroblastoma, familia de tumores del sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, un linfoma, comprendiendo linfomas no Hodgkin, linfomas de células T cutáneas, linfoma del sistema nervioso central primario, y enfermedad de Hodgkin, una leucemia, comprendiendo leucemias agudas, leucemias linfocíticas y mielógenas crónicas, neoplasias de células plasmáticas y síndromes mielodisplásicos, un síndrome paraneoplásico, un cáncer de localización primaria desconocida, una carcinomastosis peritoneal, un tumor maligno relacionado con inmunosupresión, comprendiendo tumores malignos relacionados con el SIDA, comprendiendo sarcoma de Kaposi, linfomas asociados al SIDA, linfoma del sistema nervioso central primario asociado al SIDA, enfermedad de Hodgkin asociada al SIDA y cánceres anogenitales asociados al SIDA, y tumores malignos relacionados con trasplantes, un cáncer metastásico de hígado, cáncer metastásico de hueso, derrames pleurales y pericardiacos malignos y ascitis malignas. Los más preferido es que dicho cáncer o enfermedad tumoral sea cáncer de cabeza y cuello, de pulmón, del mediastino, del tracto gastrointestinal, del sistema genitourinario, del sistema ginecológico, de mama, del sistema endocrino, de piel, infantil, cáncer de localización primaria desconocida o metastásico, un sarcoma del tejido blando y el hueso, un mesotelioma, un melanoma, una neoplasia del sistema nervioso central, un linfoma, una leucemia, un síndrome paraneoplásico, una carcinomastosis peritoneal, un cáncer metastásico y/o tumor maligno relacionado con inmunosupresión. Por consiguiente, el término "indicaciones" " tumor tal como se proporciona en el presente documento, incluye individuos aquejados con uno cualquiera de los estados mencionados anteriormente en cualquier estadio de desarrollo, pero no se limita a los estados mencionados.

Preferiblemente, las células heterólogas mencionadas anteriormente tienen uno o más antígenos que se comparten con los cánceres o enfermedades tumorales que van a tratarse. La ventaja es una respuesta fuerte adicional frente a antígenos o inmunógenos foráneos a los cánceres o enfermedades tumorales que van a tratarse o prevenirse, por ejemplo, los antígenos específicos para la célula tumoral que no se comparten por el cáncer o los tumores que van a tratarse o prevenirse, comprendiendo una respuesta cooperadora y/o señal de gran peligro que puede ser favorable para superar anergias y/o tolerancias. En una realización preferida, las células tumorales proceden además de una fuente alogénica que puede tener además una respuesta alogénica fuerte que puede ser favorable además para superar anergias y/o tolerancias.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas o de vacuna mencionadas anteriormente comprenden NM-D4 y/o NM-F9 que comparten uno o más antígenos con los cánceres o enfermedades tumorales que van a tratarse. La ventaja del origen alogénico de NM-F9 y/o NM-D4 para el individuo que va a tratarse es una respuesta fuerte adicional frente a antígenos o inmunógenos foráneos a los cánceres o enfermedades tumorales que van a tratarse o prevenirse, por ejemplo, tumor de antígenos que no se comparten por el cáncer o los tumores que van a tratarse o prevenirse, y debido a que la alogenicidad de una respuesta alogénica fuerte que comprende en general una respuesta cooperadora y/o señal de gran peligro que puede ser favorable para superar anergias y/o tolerancias de tumor.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica o de vacuna de la presente invención comprende adicionalmente un adyuvante.

Con respecto a la presente invención el término “adyuvante” significa que puede modificarse la capacidad natural de un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria, y en particular potenciarse, alterando o mezclando el mismo o las células dendríticas cargadas descritas anteriormente en el presente documento con otra sustancia. El término “adyuvante” también significa que las células tumorales a partir de las que se generan los lisados y/o las células dendríticas se modifican genéticamente con el fin de expresar adyuvantes o factores coestimuladores. El procedimiento o la sustancia usado para potenciar respuestas inmunitarias se denomina un adyuvante. Al menos se han usado tres clases de adyuvantes durante un largo tiempo; éstos son emulsiones en aceite mineral, compuestos de aluminio y materiales tensioactivos tales como saponina, lisolecitina, retinal, Quil A.RTM., algunos liposomas y formulaciones de polímeros Pluronic. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology, editado por William E. Paul, en la pág. 1008, Raven Press, Nueva York (este libro se denominará a continuación en el presente documento “Fundamental Immunology”). Los adyuvantes de aluminio usados solos o en combinación incluyen gel de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, y alumbres comprendiendo alumbre de amonio (tal como $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y alumbre de potasio. El hidróxido de aluminio (a continuación en el presente documento “AL”) es uno de los adyuvantes más antiguos y se considera tan seguro que se ha aplicado en vacunas bacterianas y virales administradas a miles de millones de personas en todo el mundo. El gel de fosfato de calcio (a continuación en el presente documento “CP”) tiene propiedades similares y también se usa en vacunas. Ambas sustancias están disponibles en calidades farmacéuticas en la mayoría de los países de todo el mundo. En la técnica se conocen bien técnicas para preparar preparaciones de adyuvante-antígeno para inyección. Véase, por ejemplo, Terry M. Phillips, Analytical Techniques in Immunochimistry, págs. 307-10, Marcel Dekker, Nueva York, 1992. Otros adyuvantes incluyen adyuvante completo de Freund (una emulsión de agua en aceite en la que se suspenden micobacterias, habitualmente *M. tuberculosis*, secas, destruidas, en la fase de aceite); adyuvante incompleto de Freund (análogo al adyuvante completo de Freund sin micobacterias); ISCOM (o complejo de inmuoestimulación, que comprende partículas lipófilas formadas mediante la asociación espontánea de colesterol, fosfolípido y la saponina Quil A.RTM.); lipopolisacárido (moléculas complejas que consisten en un núcleo lipídico de lípido A con una cadena lateral de polisacárido que son componentes de determinados bacilos. El lípido A se incorpora en la membrana externa de la bacteria y el polisacárido sobresale extracelularmente. Su potencia como adyuvante se asocia con el lípido A; también son mitógenicos para linfocitos B murinos); y adyuvantes micobacterianos (micobacterias completas, destruidas por calor, secadas, tales como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. phle* y *M. smegmatis*) que, cuando se suspenden en aceite mineral y emulsionante, tienen actividad adyuvante con respecto a cualquier antígeno administrado con los mismos. Los extractos de algunas micobacterias, por ejemplo, peptidoglicolípido micobacterianos tienen actividades adyuvantes similares. Véanse, por ejemplo, Dictionary of Immunology págs. 3, 7, 46, 94, 97, 105 y 116; R. B. Luftig, Microbiology and Immunology, págs. 228-29, Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia 1998. Los adyuvantes microbianos incluyen *Corynebacterium parvum* y *Bordetella pertussis*. Véase, por ejemplo, Handbook of Immunology en 115-16. El uso de materiales y preparaciones de liberación controlada con actividad adyuvante y posibles sitios de acción se han descrito en Fundamental Immunology en las págs. 1007-09. Los portadores minerales tales como hidróxido de aluminio, sulfato de amonio y potasio y sulfato de aluminio y potasio adsorben el antígeno en su superficie. Estos adyuvantes comunes se han usado a una concentración del 0,1% con hasta 1 mg de antígeno proteico en 1 ml administrado a animales a dosis de 0,2-0,5 ml/(kg de peso corporal). Véase Miroslav Ferencik, Handbook of Immunochimistry, pág. 115, Chapman & Hall 1993 (este libro se denominará a continuación en el presente documento “Handbook of Immunochimistry”). Aunque el adyuvante de Freund es tóxico y no se usa para la inmunización de seres humanos, los adyuvantes minerales tales como hidróxido de aluminio son comunes en la medicina humana. *Ídem* en 116. Además del alumbre, otros adyuvantes en el grupo de portadores inertes incluyen bentonita, látex y partículas acrílicas. Véase Fundamental Immunology en 1008. Las combinaciones de adyuvantes también pueden tener propiedades adyuvantes. Por ejemplo, se ha mostrado que la combinación de saponina y muramil péptido en una emulsión de escualeno en agua es superior al

- alumbre como adyuvante para inducir determinadas respuestas en ratones. R. Bomford, M. Stapleton, S. Wilson, A. McKnight, y T. Andronova, The control of the antibody isotype responses to recombinant human immunodeficiency virus gp120 antigen by adjuvants, AIDS Res. Hum. Retrovirus Vol. 8(1992) págs. 1765 y siguientes. Estos adyuvantes se complementan mediante nuevos adyuvantes que se han desarrollado durante los últimos quince años. Véanse, por ejemplo, Anthony C. Allison, The Role of cytokines in the Action of Immunological Adjuvants, en Vaccine Design. The Role of cytokine Networks, editado por Gregory Gregoriadis y Brenda McCormack, NATO ASI Series A: Life Sciences Vol. 293, págs. 1-9, Plenum Press, Nueva York 1997 (este libro se denominará a continuación en el presente documento "Vaccine Design"); Immunology en la pág. 116; H. Snippe, I. M. Fernandez y C. A. Kraaijeveld, Adjuvant Directed Immune Specificity at the Epitope Level. Implications for Vaccine Development. A Model Study Using Semliki Forest Virus Infection of Mice, en Vaccine Design en las págs. 155-73. Un adyuvante puede administrarse ante de, simultáneamente con, o después de la administración del antígeno. La potenciación de la producción de anticuerpos provocada por adyuvantes no se entiende por completo. Sin embargo, se han descrito las propiedades adyuvantes que pueden existir o bien solas o bien en diversas combinaciones y que permiten que una sustancia o formulación sea descrita como activa como adyuvante. Véanse, por ejemplo, J. C. Cox y A. R. Coulter, Adjuvants-A classification and review of their modes of action, Vaccine vol. 15(1981) págs. 248 y siguientes; John Cox, Alan Coulter, Rod Macfarlan, Lorraine Beezum, John Bates, Tuen-Yee Wong y Debbie Drane, Development of an Influenza-ISCOTM. Vaccine, en Vaccine Design en las págs. 33-49. Una de estas propiedades es la generación de depósito, mediante lo cual la vacuna se mantiene cerca del sitio de la dosis para proporcionar una liberación por goteo a corto plazo o una liberación pulsada a más largo plazo.
- Preferiblemente, la composición farmacéutica o de vacuna se administra directamente o en combinación con un adyuvante mencionado anteriormente en el presente documento y/o cargado en células presentadoras de antígeno, particularmente células dendríticas. También se prefiere que tanto la composición farmacéutica o de vacuna como el adyuvante y la composición farmacéutica o de vacuna y las células dendríticas cargadas se administren en conjunto o de manera separada entre sí, por ejemplo en puntos de tiempo diferentes o en ubicaciones diferentes. Adicionalmente, también se prefiere que dicha composición farmacéutica y adyuvante se administren junto con dicha composición farmacéutica cargada en las células dendríticas. Puesto que las células dendríticas son células presentadoras de antígeno altamente especializadas con la capacidad única de iniciación y de regulación de respuestas inmunitarias específicas de antígeno, se prefiere combinarlas con las composiciones farmacéuticas o de vacuna de la presente invención. Para la preparación de una vacuna contra un tumor, pueden generarse células dendríticas a partir de la sangre periférica de pacientes con tumor, a partir de otros donantes o a partir de las líneas celulares mencionadas anteriormente. En estudios clínicos, se ha demostrado la eficacia de la vacunación con células dendríticas usando criterios de valoración inmunológicos y, en algunos casos, clínicos.
- Se han investigado ampliamente enfoques de inmunoterapia específica activa para el tratamiento de tumores durante los últimos años. Se han notificado numerosos estudios que implican la vacunación de pacientes con sus propias células tumorales inactivadas. Estos estudios han demostrado que la inclusión de un adyuvante es necesaria para estimular el sistema inmunitario de los pacientes especialmente frente a las células tumorales autólogas o derivadas a partir de las mismas. Por ejemplo, se ha mostrado que los métodos que utilizan el adyuvante particulado, células de bacilo Calmette-Guerin (BCG), administradas de manera sistemática o mezcladas con las propias células tumorales del paciente inducen inmunidad específica de tumor en animales de laboratorio. Peters, L. C., Brandhorst, J. S., Hanna Jr., M. G., Preparation of ImmunoTherapeutic Autologous Tumour Cell Vaccines from Solid Tumours; Cancer Res. 39: 1353-1360 (1979).
- En otra realización preferida, las células dendríticas usadas en las composiciones mencionadas anteriormente son células dendríticas maduras cargadas (CDm) que se originan a partir de células dendríticas inmaduras (CDi) cargadas en el lisado y maduradas adicionalmente o que se cargaron tras o durante la maduración. El término "inmaduro" cuando se usa según la presente solicitud se refiere a células presentadoras de antígeno profesionales que se caracterizan por su capacidad para capturar y procesar antígenos. El término "maduro" cuando se usa según la presente solicitud se refiere a células presentadoras de antígeno profesionales que expresan factores coestimuladores y antígenos en el contexto de moléculas de clase CMH o moléculas CD1 y pueden activar células T, células TNK reguladoras y/o células B.
- Las CD maduras cargadas en el lisado según la invención se usan preferiblemente para tratar o prevenir enfermedades tumorales o infecciosas. También se prevé que las CD se carguen con una molécula o una mezcla de moléculas obtenida a partir de NM-F9 y/o NM-D4, incubadas conjuntamente o fusionadas con células NM-F9 y/o NM-D4.
- Además, la presente invención se refiere a un método para la producción de una composición de vacuna que comprende la etapa de combinar una línea celular, o un lisado, molécula o mezcla de moléculas obtenido a partir de estas líneas celulares, o células dendríticas cargadas con dicho lisado, cultivadas conjuntamente o fusionadas con células de las líneas celulares según la presente invención con un adyuvante.
- La presente invención también se refiere a un método para la producción de una composición farmacéutica que comprende la etapa de combinar una línea celular, o un lisado, molécula o mezcla de moléculas obtenido a partir de estas líneas celulares, o células dendríticas cargadas con dicho lisado, cultivadas conjuntamente o fusionadas con células de las líneas celulares según la presente invención con un farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de la línea celular, la composición farmacéutica o de vacuna o las células dendríticas según la presente invención para su uso en un método para el tratamiento o la prevención, por ejemplo mediante vacunación, de cáncer y/o enfermedades tumorales en un individuo.

5 En el contexto de la presente invención, el término "individuo" significa un sujeto que necesita un tratamiento o prevención de cáncer y/o enfermedades tumorales. Preferiblemente, el sujeto es un vertebrado, incluso más preferido un mamífero, de manera particularmente preferida un ser humano. Si el sujeto no es un ser humano, las líneas celulares; lisados, moléculas o mezcla de moléculas inventivas se usan de un modo xenogénico. En el caso de células dendríticas, son las células dendríticas del origen de la especie en la que se van a usar.

10 El término "administrado" significa la administración de una dosis terapéutica o profilácticamente eficaz del lisado celular de la invención a un individuo. Por "cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz" se entiende una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá de la finalidad del tratamiento, y podrá determinarse por un experto en la técnica usando técnicas conocidas. Tal como se conoce en la técnica y se describió anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para la administración sistémica frente a la localizada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la interacción farmacológica y la gravedad del estado, y podrán determinarse con experimentación de rutina por los expertos en la técnica.

15 Según la presente invención, el término "vacunación" se refiere a un proceso general de inmunización frente a cánceres y/o enfermedades tumorales. La vacunación es una forma de inmunización artificial deliberada mediante la cual se administran las líneas celulares; los lisados celulares, molécula, o mezcla de moléculas y/o células dendríticas de la presente invención. Las líneas celulares; los lisados celulares, molécula, o mezcla de moléculas y/o células dendríticas se administran en una forma tal como se describió en el presente documento, citado anteriormente, y pueden sensibilizar el sistema inmunitario de tal manera que si aparece cáncer, enfermedades tumorales, infecciones y/o enfermedades autoinmunitarias dentro del organismo se tratan o se prevengan. Véanse, por ejemplo, Immunology, en las págs. 87-88; AMA Encyclopedia of Medicine en 573-574 y 1034; S. J. Cryz, Jr., en Immunotherapy and Vaccines, editado por Stanley J. Cryz, págs. 3-11, VCH, Weinheim, Alemania 1991. Para una visión general del sistema inmunitario desde una perspectiva molecular, véase, por ejemplo, Mary S. Leffell, An Overview of the Immune System: The Molecular Basis for Immune responses, en Human Immunology Handbook págs. 1-45. La vacunación también se asocia con inmunización.

20 La inmunización es un término general, y el término vacunación se usa cuando se inmunizan pacientes. En general, la inmunización puede usarse como tratamiento preventivo o terapéutico. El uso preventivo de la inmunización es un tratamiento profiláctico, mientras que el uso de la inmunización mientras la enfermedad está progresando es inmunoterapia. La inmunización proporciona dos tipos de inmunidad adquirida, activa y pasiva. La inmunoterapia es el tratamiento de una enfermedad mediante inmunización, activa o pasiva, o mediante el uso de agentes que modifican las acciones de los linfocitos. En particular, inmunoterapia se refiere a la estimulación del sistema inmunitario y de manera convencional usa una forma de inmunoestimulante, una sustancia que provoca una estimulación inespecífica, general del sistema inmunitario. The American Medical Association Encyclopedia of Medicine, pág. 576 (esta enciclopedia se denominará continuación en el presente documento "AMA Encyclopedia of Medicine").

25 Las líneas celulares de la presente invención y/o lisados celulares y/o molécula y/o mezcla de moléculas y/o células dendríticas según la invención se usan en un método para inducir una respuesta inmunitaria para tratar o prevenir cáncer y/o enfermedades tumorales en el que se inyecta una cantidad eficaz de las líneas celulares; los lisados celulares, la molécula, la mezcla de moléculas, y/o las células dendríticas al menos una vez de modo que se permita la liberación de cantidades biológicamente activas del inmunoestimulante a lo largo de un periodo de tiempo para inducir una respuesta inmunitaria frente a la presencia de células tumorales activas.

30 Un individuo, para los fines de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros animales, preferiblemente vertebrados y más preferiblemente mamíferos. Por tanto los métodos pueden aplicarse tanto en terapia de seres humanos como en aplicaciones veterinarias. En una realización preferida, el individuo es un mamífero, por ejemplo un ratón, y en la realización más preferida, el individuo es un ser humano.

35 Los compuestos descritos en el presente documento que tienen la actividad terapéutica o profiláctica deseada pueden administrarse en un portador fisiológicamente aceptable a un paciente, tal como se describe en el presente documento. Dependiendo de la manera de introducción, los compuestos pueden formularse de una variedad de formas tal como se comentó anteriormente. La concentración del compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar desde aproximadamente el 0,1-100% en peso. Sin embargo, también se prevé que el experto en la técnica se encuentre fácilmente en la posición de determinar la concentración del compuesto terapéuticamente activo en la formulación usando el conocimiento general común. Los agentes pueden administrarse solos o en combinación con otros tratamientos, es decir, radiación, u otros agentes quimioterápicos.

40 En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas están en una forma soluble en agua, tal como sales farmacéuticamente aceptables, lo que se pretende que incluya sales de adición tanto de ácidos como de bases.

La administración de los agentes candidatos de la presente invención puede realizarse de una variedad de formas tal como se comentó anteriormente, incluyendo, pero sin limitarse a, por vía oral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intranasal, por vía transdérmica, por vía intraganglionar, por vía peritumoral, por vía intratumoral, por vía intrarrectal, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intrapulmonar, por vía vaginal, por vía rectal o por vía intraocular.

Las células de la línea celular, lisados, molécula, mezcla de moléculas o células dendríticas cargadas o fusionadas con las mismas en forma de composiciones farmacéuticas o de vacuna pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse mediante diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal, intraganglionar, intrarrectal, peritumoral, intratumoral o intrabronquial. El médico encargado y los factores clínicos determinarán el régimen de dosificación. Tal como se conoce en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área superficial corporal, la edad, el compuesto particular que va a administrarse, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administren de manera concurrente. Una dosis típica del lisado origina desde aproximadamente 1000 hasta 10^{13} células y la dosis típica de células dendríticas es de aproximadamente 10^4 a 10^{12} células, sin embargo, se prevén dosis por debajo y por encima de este intervalo a modo de ejemplo. Preferiblemente, la dosis de lisado o moléculas corresponde a cantidades generadas a partir de números de células de entre 10^4 y 10^{12} células, más preferiblemente entre 10^5 y 10^{11} células, más preferiblemente entre 10^6 y 10^{10} células. Preferiblemente, la dosis de células dendríticas cargadas es de entre 10^5 y 10^{11} células, más preferiblemente entre 10^6 y 10^9 células. Las cantidades de moléculas pueden variar entre 0,1 μg y 10 g. Las dosis pueden variar entre individuos y pueden dividirse en múltiples inyecciones en diferentes sitios y/o vías de administración. Los expertos en la técnica pueden determinar las dosis adecuadas y óptimas. Los expertos en la técnica pueden determinar la cantidad de lisado celular usada para cargar células dendríticas, por ejemplo mediante los ensayos *in vitro* y/o *in vivo* que se muestran a modo de ejemplo en los ejemplos. Las cantidades preferibles para los lisados y las moléculas para cargar células dendríticas que se originan a partir de desde 10^3 hasta 10^{13} células, más preferiblemente desde 10^4 hasta 10^{12} células, más preferiblemente desde 10^5 hasta 10^{11} células, y más preferiblemente desde 10^6 hasta 10^{10} células. Generalmente, el régimen como administración regular de la composición farmacéutica o de vacuna debe estar en el intervalo de 0,1 μg a 10 g por dosis para los lisados y las moléculas, preferiblemente de 50 a 100 mg, las cantidades de lisados fraccionados pueden ser correspondientemente menores pero pueden alcanzar las altas cantidades. Las dosificaciones se administran preferiblemente una vez a la semana, sin embargo, durante la progresión del tratamiento, las dosificaciones pueden administrarse en intervalos de tiempo mucho más largos y si se necesita pueden administrarse en intervalos de tiempo mucho más cortos, por ejemplo, a diario. En un caso preferido, se monitoriza la respuesta inmunitaria usando los métodos descritos en el presente documento y métodos adicionales conocidos por los expertos en la técnica y se optimizan las dosificaciones, por ejemplo, en tiempo, cantidad y/o composición.

Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 μg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. Puede monitorizarse el progreso mediante evaluación periódica. Las líneas celulares, lisados celulares, moléculas y/o células dendríticas de la invención pueden administrarse de manera local o sistémica. La administración será preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intraganglionar, por vía intraperitoneal, por vía intratumoral, por vía peritumoral. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen agentes de reposición de fluidos y nutrientes, agentes de reposición de electrolitos (tal como los basados en la solución de dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

También se prevé que las células de las líneas celulares, lisados, moléculas o células dendríticas cargadas o composiciones se empleen en enfoques de coterapia, es decir en la coadministración con otros medicamentos o fármacos, por ejemplo fármacos anticancerígenos.

Cuando se lleva a cabo la terapia de vacuna usando las células de las líneas celulares, lisados, moléculas o mezcla de moléculas o células dendríticas cargadas o fusionadas de la presente invención, pueden administrarse solo una vez. Sin embargo, es deseable repetir la administración en el mismo sitio de un cuerpo para lograr la coexistencia de un antígeno tumoral y una citocina o un agente de inducción de citocinas siempre que sea posible. Por ejemplo, ambos componentes pueden coexistir preferiblemente durante 3 horas o más de manera que puede inducirse la reacción inflamatoria en el sitio de administración y pueden lograrse condiciones en las que las células inmunitarias se concentran y las células se mantienen en el mismo sitio. Cuando las células, un lisado celular, moléculas o células dendríticas cargadas o fusionadas de la invención se administran sin adyuvante, puede administrarse un adyuvante en el mismo sitio o un sitio distante. Generalmente, la vacuna puede administrarse a un paciente que porta un tumor que contiene, desde un punto de vista del diagnóstico patológico, la misma especie o especie

relacionada de uno o varios antígenos tumorales como los contenidos en la composición farmacéutica o de vacuna o incluso puede usarse, en casos en los que no se producen antígenos tumorales compartidos. Este último caso puede usar efectos inmunológicos de activación inespecífica que incluyen por ejemplo respuestas alogénicas. El sitio en el que se va a administrar no está particularmente limitado y puede ser por ejemplo por vía oral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intranasal, por vía transdérmica, por vía intraganglionar, por vía peritumoral, por vía intratumoral, por vía intrarrectal, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intrapulmonar, por vía vaginal, por vía rectal o por vía intraocular. El periodo de administración y dosis de la vacuna contra el cáncer de la presente invención no está particularmente limitado. Es deseable determinar un periodo de administración y dosis apropiado observando los efectos de la terapia de vacuna. La administración puede realizarse, por ejemplo, mediante inyecciones y similares.

La invención también se refiere al uso para la preparación de una vacuna o composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de cáncer y/o enfermedades tumorales. De manera similar, una o más líneas celulares, el lisado, una molécula o una mezcla de moléculas obtenido a partir de los mismos o células dendríticas cargadas o fusionadas con los mismos según la invención se usan para el tratamiento o la prevención de cáncer y/o enfermedades tumorales.

El término "cáncer y/o enfermedades tumorales" se refiere preferentemente a tales cánceres o enfermedades tumorales que se caracterizan por células tumorales que expresan o bien TF o bien MUC1, preferiblemente TA-MUC1, Tn y/o LeX en la superficie celular. Tal como se describió anteriormente, se prefieren tumores que tienen al menos uno de esos antígenos. Los más preferidos son aquéllos que tienen al menos dos de los antígenos compartidos y más preferidos aquéllos con tres e incluso más de esos con todos los antígenos descritos anteriormente. Sin embargo, también los tumores o el tumor de un individuo puede tratarse satisfactoriamente cuando no se comparte ninguno de los antígenos mencionados anteriormente debido a la naturaleza alogénica del enfoque y la respuesta alogénica fuerte relacionada con los mismos que puede permitir la interrupción de tolerancias y anergias así como la carencia de características inmunoinhibidoras de la MUC1 (TA-MUC1) en las líneas celulares. En una realización preferida, el cáncer o enfermedad tumoral que va a tratarse o prevenirse es un cáncer/enfermedad tumoral de cabeza y cuello, de pulmón, del mediastino, del tracto gastrointestinal, del sistema genitourinario, del sistema ginecológico, de mama, del sistema endocrino, de piel, infantil, cáncer de localización primaria desconocida o metastásico, un sarcoma del tejido blando y el hueso, un mesotelioma, un melanoma, una neoplasia del sistema nervioso central, un linfoma, una leucemia, un síndrome paraneoplásico, una carcinomatosis peritoneal, un cáncer metastásico y/o tumor maligno relacionado con inmunosupresión. Más preferidas son las indicaciones de carcinoma incluidas anteriormente. Sin embargo, dicho cáncer/ enfermedad tumoral también puede seleccionarse de los mencionados anteriormente en el presente documento junto con el procedimiento según la invención.

En vista de los resultados *in vivo* e *in vitro* de los ejemplos de la presente invención, se espera que la invención proporcione una vacuna contra el cáncer y/o enfermedades tumorales ventajosa. Estudios preclínicos reconocidos mostraron que las líneas celulares de la invención pueden usarse con el fin de inducir una respuesta inmunitaria celular y humoral específica. Pudieron inducirse células T cooperadoras y citotóxicas específicas humanas. Pudieron inducirse anticuerpos humanos y murinos específicos, IgM y IgG, frente a TF, Tn, MUC1 y AGPA, en ratones así como en ratones NOD-SCID con un sistema inmunitario humano reconstituido que mostraba la potencia, especificidad del enfoque incluyendo respuestas inmunitarias anti-hidrato de carbono incluyendo respuestas de células T.

Las figuras muestran:

Figura 1: Análisis inmunocitoquímico de expresión de antígenos en células NM-F9 y K562-wt. Se seleccionaron células K562 para determinar la expresión de TF y se subclonaron para determinar la estabilización de la expresión de TF. Se tiñeron un subclon representativo (NM-F9) y las células K562 de tipo natural (wt) originales con A78-G/A7 (anticuerpo anti-TF), HB-Tn 1 (anticuerpo anti-Tn), A83-C/B12 (anticuerpo anti-GPA), A63-C/A9 (anticuerpo anti-AGPA) y PankoMab (anticuerpo anti-MUC1) y se analizaron mediante microscopía de inmuofluorescencia.

Figura 2: Expresión en la superficie celular de antígenos en células NM-F9 y K562-wt. Se tiñeron células K562-wt y NM-F9 con A78-G/A7 (anticuerpo anti-TF), HB1-Tn (anticuerpo anti-Tn), HB1-sTn (anticuerpo anti-sTn), A83-C/B12 (anticuerpo anti-GPA), A63-C/A9 (anticuerpo anti-AGPA), PankoMab (anticuerpo anti-MUC1), anticuerpo anti-CD15 (anticuerpo anti-Lewis^X) y anticuerpo anti-sialil-Lewis^X. Se analizaron las células mediante citometría de flujo. Adicionalmente, se trataron células con sialidasa y se analizaron para determinar la expresión de AGPA (A63-C/A9) y TF (A78-G/A7).

Figura 3: Sialilación reducida en células NM-F9 en comparación con las células de tipo natural. A, se tiñen ácidos siálicos con enlaces glicosídicos en alfa 2-3 y 2-6 en proteínas y lípidos de membrana preferentemente mediante las lectinas MAA y SNA, respectivamente. La lectina PNA se une preferentemente al hidrato de carbono de TF y no al TF sialilado (información del producto de Vector Laboratories). Se analizó la tinción mediante citometría de flujo. B, se determinó el contenido de ácido siálico en fracciones de membrana de células NM-F9 y K562-wt usando el ensayo del ácido tiobarbitúrico.

Figura 4: La glicoforina A transporta el antígeno de TF en células NM-F9. Se separaron lisados de membranas de células K562-wt y NM-F9 mediante un gel del 12% de SDS-poliacrilamida y se transfirió en una membrana. Se detectaron TF (A) y AGPA (B) mediante tinción con Acm A78-G/A7 y Acm A63-C/A9, respectivamente. GPA y AGPA aislados a partir de eritrocitos normalmente migran en SDS-PAGE como monómeros y multímeros (Pahlsson et al. 1994). Se usaron GPA y BSA como control negativo y AGPA como control positivo para la tinción con ambos anticuerpos. Se marcó con un asterisco la proteína positiva para A78-G/A7 (A) que migró conjuntamente con la proteína positiva para C/A9 principal individual (B).

Figura 5: Estimulación de la proliferación de células T con lisados de células NM-F9. Se analizaron células dendríticas (CD) humanas diferenciadas y maduras, irradiadas, derivadas a partir de monocitos de sangre periférica o células T CD4+, CD8+ y totales aisladas a partir de PBMC humanos para determinar la proliferación celular por separado o tras cultivo conjunto. Sólo se observó un nivel marginal de proliferación de células T excepto para CD y células T CD4+ cultivadas conjuntamente lo que dio como resultado proliferación de células T probablemente debido a una reacción linfocítica mixta. Sin embargo, cuando se cargaron CD con el lisado de células NMF9 antes del cultivo conjunto con las tres poblaciones de células T, respectivamente, pudo determinarse un aumento de la proliferación de células T. Para cargar las CD se sometieron a prueba dos razones de lisado de células K562 con respecto a CD, 1:1 y 0,1:1. Ambas razones fueron eficaces en la estimulación de la proliferación de células T; la razón 1:1 resultó ser más eficaz para la proliferación de células T CD4+ y totales, mientras que la razón 1:0,1 parece ser más eficaz para la proliferación de células T CD8+. Se analizó la proliferación de células T mediante el ensayo de BrdU.

Figura 6: Activación de células CD8+ no expuestas frente a MUC1 y AGPA con lisados de células NM-F9. Se cargaron NMDC11 inmaduras con lisado a partir de NM-F9 y se maduraron adicionalmente para dar células dendríticas m-NMDC11 funcionales que presentan antígenos procesados. Se incubaron M-NMDC11 cargadas con CTL a partir de un donante A2+. Se reestimularon las células T una vez mediante m-NMDC11 cargadas con lisado de NM-F9, péptido MUC1 A2 y AGPA, se usaron m-NMDC11 no cargadas como controles. Se realizó un análisis de ELISPOT que midió la secreción de $INF\alpha$.

Figura 7: Las células NM-F9 se lisan más eficazmente mediante linfocitos citolíticos naturales que las células K562 de tipo natural. Se seleccionaron células NK a partir de PBMC y se cultivaron conjuntamente con NM-F9 o K562wt como células diana a la razón indicada.

Los ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: Cultivo de células K562, NM-F9 y NM-D4

Se cultivaron K562, NM-F9 y NM-D4 en RPMI 1640 complementado con FCS al 10% y glutamina 2 mM y se hicieron crecer a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 6%, preferiblemente al 8%.

Ejemplo 2: Mutagénesis/selección

A) Métodos

A-1) Mutagénesis

Se lavaron células K562 por muestra en PBS y se sembraron a 10⁶ células por ml de medio de cultivo celular complementado con EMS (0,1 mg/ml, metanosulfonato de etilo, Sigma-Aldrich) durante la noche a 37°C y CO₂ al 5%. Se lavaron las células y se les proporcionó medio recién preparado. Cada dos días se determinó la viabilidad celular mediante tinción con azul triptano y se analizaron células mediante tinción inmunocitoquímica.

A-2) Selección de TF: se lavaron células K562 en B-PBS (BSA al 0,5% en PBS), se incubaron con 50 µl de sobrenadante de cultivos de hibridoma de Acm A78-G/A7 o PankoMab y 950 µl de B-PBS a 4°C durante 30 min. Tras lavar se repitió el procedimiento con 50 µl de anticuerpo de rata anti-IgM de ratón o anticuerpo de rata anti-IgG de ratón conjugado con MicroBeads (Miltenyi Biotec, Köln, Alemania). Tras lavar, se separaron las células K562 positivas para TF marcadas magnéticamente mediante dos columna sucesivas proporcionadas por Miltenyi (Köln, Al.) tal como se describe en el manual del fabricante. Después de 9 días de cultivo, se repitió el procedimiento de aislamiento tres veces en total. Finalmente, se clonaron las células K562 positivas para TF aisladas mediante dilución limitada en placas de 96 pocillos (1 célula / 100 µl).

A-3) Selección de MUC1: Como la selección de TF con la excepción de que se usó PankoMab y anticuerpo de rata anti-IgG de ratón conjugado con MicroBeads (Miltenyi Biotec, Köln, Alemania).

A-4) Análisis FACS (citometría de flujo)

Tinción con anticuerpo: Se incubaron aproximadamente 3x10⁵ células a 4°C durante 1,5 h con Acm primarios (sobrenadantes del cultivo de hibridoma de A78-G/A7 (IgM), PankoMab (IgG1), todos diluidos 1:2 en medio de cultivo celular) seguido por el anticuerpo de cabra anti-IgM o IgG de conjugado con Cy3 secundario 1:200 en PBS a 4°C durante 30 min. y se lavaron de nuevo. Se investigaron células resuspendidas (200 µl de PBS) mediante

citometría de flujo (citómetro de flujo: Coulter Epics, Beckman Coulter, Krefeld, Al.).

Se llevaron a cabo análisis cuantitativos usando el software Expo32 (Becton Coulter) con los siguientes parámetros para células marcadas con anticuerpo: dispersión frontal (FS): 26 V, aumento 1, dispersión lateral (SS): 807 V, aumento 5, FL2: 740 V, aumento 1, y los siguientes parámetros para células marcadas con lectina: FS: 26 V, aumento 1, SS: 807 V, aumento 5, FL1:740 V, aumento 1.

B) Resultados

B-1) Glicoingeniería de células K562

Se trataron células K562wt con EMS y se usaron como células no tratadas y células tratadas. Se seleccionaron células positivas para TF usando el Acm específico de TF, A78-G/A7, acoplado a perlas magnéticas (figura 1B: células antes de la separación). Tras tres rondas de aislamiento se recibió una población de células K562 del 93% de células positivas para TF. Sin embargo, el porcentaje de células K562 positivas para TF disminuyó a lo largo del tiempo alcanzando un nivel mínimo de aproximadamente el 20% de células positivas para TF 14 días después del procedimiento de aislamiento. Para la expresión estable del fenotipo positivo para TF se aislaron células K562 una cuarta vez y se clonaron tras esto mediante dilución limitada. Entre treinta clones de células K562 que se obtuvieron, trece clones celulares expresaron altas cantidades del antígeno de TF, y de estos, ocho clones celulares presentaron una expresión de TF homogénea en la superficie celular de la población celular completa (figura 1A). Estos clones celulares expresaron de manera estable el antígeno de TF hasta ahora (aproximadamente 12 meses). El análisis mediante citometría de flujo reveló un aumento de aproximadamente 31 veces del nivel de expresión de TF para células NM-F9 (figura 2) reflejando la fuerte expresión de TF en este clon, también reflejado mediante una media sustractiva en análisis de FACS de aproximadamente 48, que se eligió para caracterización adicional. La necesidad de clonar con el fin de obtener una población de células positivas para TF estable se debe a una mayor velocidad de proliferación de células negativas para TF que por tanto superan en crecimiento a los clones positivos para TF a lo largo del tiempo, por ejemplo NM-F9 tiene una velocidad de duplicación más lenta que el clon H9 negativo para TF.

Para la generación de un clon positivo para TF que expresa más del epítipo TA-MUC1 de MUC1 específico de tumor, se trataron células F9, se seleccionaron y se clonó una célula individual tal como se describió anteriormente usando PankoMab para la selección. Se seleccionó el clon D4 estable para su caracterización adicional debido a su tinción de PankoMab aumentada en citometría de flujo.

Ejemplo 3: Caracterización de las líneas celulares

A) Métodos

A-1) Inmunocitoquímica

Se aplicaron aproximadamente 5×10^4 células/pocillo sobre portaobjetos de múltiples pruebas (Roth GmbH) y se sedimentaron durante 30 min. a 37°C más 60 min. a temperatura ambiente. Tras la eliminación cuidadosa del sobrenadante, se secaron y se congelaron las células durante la noche. Se llevó a cabo la inmunotinción tal como ya se ha descrito (19): En resumen, se fijaron células mediante formaldehído al 5%, se lavaron con PBS, y se incubaron con sobrenadantes del cultivo de hibridoma de los Acm primarios: A78-G/A7 (1:5), Acm A83-C/B12 (1:5), Acm A63-C/A9 (1:5), Acm PankoMab (1:5) o Acm HB-Tn1 (1:50) durante la noche a 4°C. Tras lavar, se incubaron las células con el anticuerpo secundario anticuerpo de cabra anti-IgM (específico de cadena μ) o IgG de ratón (específico del fragmento Fc γ , 1:100 en PBS) conjugado con Cy3 durante 30 min. a 4°C. Se usaron Acm de isotipos diferentes (IgG1 χ de ratón MOPC 21 e IgM χ TEPC 183) como controles negativos. Se cubrieron los portaobjetos de múltiples pruebas con medio de montaje Mowiol (glicerol 10 M, Mowiol 4-88 al 40% (Calbiochem), tampón Tris 0,2 M pH 8,5, diazobisociclo-octano al 0,1%). Se visualizaron las células teñidas con Cy3 mediante microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Zeiss, Oberkochen Al.) y se documentaron las imágenes usando el software Axiovision 3.1.

A-2) Citometría de flujo (FACS)

Tinción con anticuerpo: se incubaron aproximadamente 3×10^5 células a 4°C durante 1,5 h con Acm primario (sobrenadantes del cultivo de hibridoma de A78-G/A7, A83-C/B12, A63-C/A9, PankoMab, todos diluidos 1:2, o Acm HB-Tn1 y anti-CD15 diluidos 1:20, o anti-Sialil-Lewis^X diluido 1:100 en medio de cultivo celular) seguido por el anticuerpo de cabra anti-IgM o IgG de ratón conjugado con Cy3 secundario 1:200 en PBS a 4°C durante 30 min. y se lavó de nuevo. Se investigaron las células resuspendidas (200 μ l de PBS) mediante citometría de flujo (citómetro de flujo: Coulter Epics, Beckman Coulter, Krefeld, Al.).

Tinción con lectina: Tras lavar dos veces con PBS y una vez con HBSS con BSA al 4% (solución salina equilibrada de Hank) se incubaron las células con PNA conjugado con FITC (1:400), SNA conjugado con FITC (1:50) o MAA conjugado con FITC (1:50) en HBSS/ BSA al 4% a 4°C durante 1 h. Tras lavar, se resuspendieron los sedimentos celulares en 200 μ l de HBSS/BSA al 4% para su análisis.

Se llevaron a cabo análisis cuantitativos usando el software Expo32 (Beckman Coulter) con los siguientes

parámetros para células marcadas con anticuerpo: dispersión frontal (FS): 26 V, aumento 1, dispersión lateral (SS): 807 V, aumento 5, FL2: 740 V, aumento 1, y los siguientes parámetros para células marcadas con lectina: FS: 26 V, aumento 1, SS: 807 V, aumento 5, FL1:740 V, aumento 1.

A-3) Análisis de Scatchard

5 Se queló PankoMab con p-SCN-Bencil-DTPA y se radiomarcó con ¹¹¹In según Nikula *et al.* (T.K. Nikula, M.J:Curcio, M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, R. D. Finn, D. A. Scheinberg Nucl. Med. Biol. 22(3). 387-390 (1995)). Se realizó el marcado con ¹¹¹In libre de portador para determinar actividades específicas de 7-37 MBq/mg. Se realizó el ensayo de unión en duplicados con 1x10⁶ células de K562, NM-D4 y NM-F9 en tubos Eppendorf de 1,5 ml y diluciones en serie crecientes de anticuerpo marcado (320 ng-5 ng) en un volumen total de 200 µl de PBS complementado con BSA al 1% para evitar la unión inespecífica. Se incubaron las células durante 1 hora a 4-8°C, se separaron del anticuerpo no unido mediante centrifugación a 4000 rpm durante 3 minutos y se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS/BSA al 1%. Se cuantificó la radiactividad de unión celular en un contador gamma. Se confirmó la comparabilidad de la inmunorreactividad de PankoMab marcado y no modificado mediante competición de ¹¹¹In-PankoMab con Pankomab usando el mismo protocolo experimental. Se añadieron 5 ng de ¹¹¹In-PankoMab a cantidades recientes de PankoMab y se incubó con las células. Se calcularon la afinidad y capacidad de unión de PankoMab para cada experimento individual mediante análisis de Scatchard.

A-4) Generación del lisado de membrana

20 Se generaron lisados de membrana tal como ya se describió (Vachon L. Costa T. y Hetz A. GTPase and adenylat cyclase desensitise at different rates in NG108-15 cells. Mol. Pharmacol., 31,159-168 (1987)) con las siguientes modificaciones: se lisaron 2,2x10⁸ células mediante congelación/descongelación en nitrógeno líquido 3 veces. Tras la adición de 7,5 ml de tampón hipotónico (Tris/HCl 5 mM, pH 7,6, EGTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, leupeptina 10 µg/ml, 250 µmoles de PMSF) se centrifugó el sedimento celular resuspendido a 1000 x g durante 10 min. a 4°C. Se resuspendió el sedimento y se centrifugó de nuevo a 1000 x g durante 10 min. a 4°C. Se combinaron los sobrenadantes de ambas etapas de centrifugación y se llevó a cabo el aislamiento de membrana mediante centrifugación a 25000 x g durante 20 min. a 4°C. Se resuspendió el sedimento en 5 ml de tampón de homogenización (Tris/HCl 50 mM, pH 7,6, EGTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, leupeptina 10 µg/ml, 250 µmoles de PMSF) y se centrifugó de nuevo a 25000 x g durante 20 min. a 4°C. Se aisló asialoglicoforina A a partir de las membranas homogeneizadas tal como ya se describió anteriormente (Pahlsson P, Douglas P, Blackall M.U., Biochemical, characterization of the O-glycans on recombinant glycoporphin A expressed in Chinese hamster ovary cells, Glycoconjugate Journal 11: 43-50, (1994)) usando tampón de lisis Nonidet. Se usó el lisado aclarado resultante para análisis de inmunotransferencia.

A-5) Análisis de inmunotransferencia

35 Se sometieron lisados de membrana a ebullición en tampón Laemmli de SDS-PAGE, se separaron mediante SDS-PAGE (al 12%) y se transfirieron sobre membrana de nitrocelulosa tal como se describe en otra parte (Goletz S, Hanisch FG, Karsten U. Novel alphaGalNAc containing glycans on cytokeratins are recognized invitro by galectins with type II carbohydrate recognition domains. J Cell Sci; julio de 1997; 110 (Pt 14):1585-96). Se bloquearon las membranas con BSA al 3% en TBS/Tween al 0,1% y se incubaron con el Acm primario A78-G/A7 (1:5) o A63-C/A9 (1:5) durante la noche y anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa alcalina (anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón, específico de cadena µ (1:5000)) a 37°C durante 1 h. Se realizó la tinción usando detección de NBT y BCIP como en (Goletz S, Hanisch FG, Karsten U. Novel alphaGalNAc containing glycans on cytokeratins are recognized invitro by galectins with type II carbohydrate recognition domains. J Cell Sci; julio de 1997; 110 (Pt 14):1585-96)).

A-6) ELISA

45 *ELISA 1:* se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con Acm PankoMab purificado (0,1 µg/pocillo; IgG1) durante la noche a 4°C en PBS. Se realizó el bloqueo de los pocillos con BSA al 5% y etapas de lavado con Tween 20 al 0,1% en PBS. En etapas de incubación sucesivas, se añadió en primer lugar sobrenadante celular (antes y después del tratamiento con sialidasa, tal como se describió anteriormente), después sobrenadantes de Acm A78-G/A7 (1:200, IgM) o Acm clon HB-Tn1 (1:1000, IgM), y seguido por anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón conjugado con peroxidasa, específico de cadena µ (1:5000). Se realizaron todas las etapas de incubación durante 1,5 h a temperatura ambiente y se combinaron con etapas de lavado intensivas entre éstas. Se tiñeron los complejos antígeno-anticuerpo de MUC1 positivos para TF o positivos para Tn mediante o-fenilendiamina tal como se describe en (Goletz S, Hanisch FG, Karsten U. Novel alphaGalNAc containing glycans on cytokeratins are recognized invitro by galectins with type II carbohydrate recognition domains. J Cell Sci; julio de 1997; 110 (Pt 14):1585-96)) y se detectaron mediante lector de ELISA doble a 492 nm/620 nm (ELISA-Reader, Dynax Technologies, Filadelfia, EE.UU.).

55 *ELISA 2:* como ELISA 1, excepto porque: se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza) con 0,1 µg/pocillo de TF-PAA, Tn-PAA o AGPA, o MUC1 purificados de sobrenadantes de células NM-F9 (1:40; se determinó la dilución de MUC1 óptima con anticuerpo anti-MUC1 A76-A/C7, preferiblemente, sin embargo, con PankoMab), cada uno diluido en PBS. Se incubaron sueros de ratones durante 2 h. Se usaron PankoMab

(1:500), A78-G/A7 (1:500) y Tn-HB1 (1:500) como controles positivos. Para el control negativo se sustituyó el suero de ratones por medio. Se usaron anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón o para los controles positivos anti-IgM de ratón conjugado con peroxidasa (1:5000) como reactivo secundario.

5 ELISA 3: como ELISA 2, excepto porque se usó el anticuerpo anti-IgG humana marcado con POD y se diluyó 1:10.000.

A-7) Determinación de ácidos siálicos unidos a glicoconjugados de membrana

10 Se realizó el aislamiento de ácidos siálicos unidos a glicoconjugados de membrana tal como ya se describió (Mantey L.R., Keppler O.T., Pawlita M., Reutter W., Hinderlich S. Efficient biochemical engineering of cellular sialic acids using an unphysiological sialic acid precursor in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase. FEBS Letters 503: 80-84 (2001)) lisando 10^7 células en tampón de lisis en combinación con cizallamiento con agujas. Tras la centrifugación se resuspendieron los sedimentos y se hidrolizaron en ácido acético. Se realizó la determinación de ácido siálico unido a glicoconjugado de membrana mediante el método de ácido tiobarbitúrico (Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem. Journal 81: 384-392 (1961)).

15 B) Resultados

B-1) Expresión en la superficie celular de TF y proteínas que portan TF

B-2) Caracterización de NM-F9 y NM-D4

20 TF, que está ausente en K562, se expresa fuertemente y de manera estable en NM-F9 y NM-D4 tal como se muestra mediante la unión de los anticuerpos específicos de TF, A78-G/A7, Nemo-TF1 y Nemo-TF2. El tratamiento con neuramidasa de NM-F9 fuertemente positivas para TF revela que la sialilación se reduce ampliamente pero algo de TF aún está sialilado (figura 2). Este último hecho depende de las condiciones de los medios.

25 **NM-F9:** Junto a la expresión muy fuerte de TF, Tn y Sialil-Tn, ambos de los cuales se expresan débilmente en K562wt (K562 de tipo natural; igual a K562 tal como se obtuvieron de DSMZ), están regulado por incremento y regulado por disminución, respectivamente (figura 1A-D y figura 2). Para determinar si el aumento de la expresión de proteína transportadora era responsable en parte de estos cambios en la expresión de TF, se analizó la expresión de glicoforina A (GPA) y MUC1, transportadores conocidos principales de TF. Claramente, no se observó un nivel de expresión diferente para MUC1 y sólo un aumento minoritario en GPA (figuras 1E, F, I, J y figura 2). En cambio, la unión del anticuerpo A63-C/A9, que reconoce la glicoforina A sólo si está glicosilada con TF en un determinado sitio actuando así como un marcador de asialoglicoforina A (AGPA), la versión glicosilada con TF de GPA, es muy fuerte en NM-F9 y no está por encima del fondo en K562wt (figuras 1G, H). Estos resultados indican que el aumento de la expresión de TF en NM-F9 está provocado por una capacidad fuertemente reducida de la célula de sialilar que está soportada por los estudios de unión con las lectinas SNA, PNA y MAA (figura 3A) y la determinación del contenido en ácido siálico en la fracción de membrana de células K562wt y NM-F9 (figura 3B). La tinción con lectina con MAA y SNA reveló que la cantidad total de ácidos siálicos con enlaces α 2-3 y 2-6 sobre proteínas y lípidos de membrana era aproximadamente cinco veces y dos veces, respectivamente, más baja en células NM-F9 (figura 3A). La unión de la lectina PNA sensible a la sialilación que se une preferentemente a TF pero también a otros residuos de galactosa terminal desialilada aumentó aproximadamente 33 veces en NM-F9 (figura 3A). Finalmente, el contenido determinado químicamente de ácidos siálicos en la membrana celular se redujo casi tres veces en NM-F9 (figura 3B).

45 De manera interesante, Le^x, un marcador tumoral de hidrato de carbono complejo en N- y O-glicanos, estaba presente en células K562-wt (es decir células K562 de tipo natural como por ejemplo las proporcionadas por la DSMZ) pero su síntesis estaba fuertemente inducida en células NM-F9 (figura 2). Sin embargo, la forma sialilada de Le^x (s-Le^x), así como otros antígenos de hidrato de carbono de Lewis (es decir Le^a, s-Le^a, Le^y), estaban ausentes en células K562-wt y NM-F9. UEAI, que detecta fucosa terminal en diversas uniones incluyendo fucosa en Le^x y sLe^x, sólo se unía débilmente a K562wt pero fuertemente a NM-F9. Se asume que el aumento de Le^x se genera por una regulación por incremento de la fucosilación que no se investigó adicionalmente.

50 **NM-D4:** El clon NM-D4 tiene propiedades similares a NM-F9. Muestran una expresión muy similar, por ejemplo, de TF y Le^x (muy fuerte), GPA (fuerte) y sialil-Tn y s-Lex⁺ (muy baja o ausente). Se observan diferencias en un fuerte aumento en TA-MUC1 y algo de disminución en Tn y el epítipo A63-C/A9, mediante lo cual este último se expresa fuertemente en NM-D4. Con el fin de observar si se aumenta el número de epítopos TA-MUC1 en MUC1 unido a membrana, se determinó el número de sitios de unión de PankoMab en K562wt, NM-F9 y NM-D4 y la afinidad de la unión mediante análisis de Scatchard usando ¹¹¹In-PankoMab radiomarcado (tabla 1). El análisis de Scatchard permite la determinación del número máximo de moléculas de anticuerpo unidas por célula y la constante de asociación aparente de la reacción de unión. La representación de la razón de anticuerpo unido específicamente y libre frente a la concentración de anticuerpo unido específicamente revela un línea recta. Se calculó la capacidad de unión por célula a partir del valor de la ordenada en el origen en el eje de abscisas y la constante de asociación a partir de la pendiente de la línea. Sorprendentemente, el número de sitios de unión de PankoMab no se elevó en

NM-F9 o NM-D4. Por el contrario, NM-D4 y NM-F9 tienen aproximadamente el 60-65% del número de sitios de unión que K562wt. Sin embargo, la afinidad de la interacción entre PankoMab y las células cambió. Mientras que PankoMab reconoce MUC1 en NM-F9 con sólo un leve aumento en la afinidad, MUC1 en NM-D4 se reconoce con una afinidad aumentada 5 veces en comparación con MUC1 en K562wt. Esto refleja que la glicosilación truncada alterada lleva a una accesibilidad y/o plegado mejor del complejo hidrato de carbono-epítipo tumoral conformacional inducido de MUC1 (TA-MUC1) que es más prevalente en NM-D4 que en NM-F9. Estas determinaciones también muestran que MUC1, incluyendo TA-MUC1 está presente en NM-F9, NM-D4 y K562wt con una cantidad de sitios de unión de anticuerpo de entre aproximadamente $1-1,5 \times 10^5$, que no es baja y contradice las cantidades no o escasamente detectables de MUC1 en K562wt notificadas anteriormente (Zhang K, Sikut R, Hansson GC. A MUC1 mucin secreted from a colon carcinoma cell line inhibits target cell lysis by natural killer cells. Cellular Immunology, 1997; 176:158-165).

B-3) Identificación de proteínas glicosiladas con TF

Asialoglicoforina A: La unión de A63-C/A9 muestra que TF está presente en GPA. A63-C/A9 reconoce específicamente un hidrato de carbono-epítipo peptídico mixto de un determinado TF en la parte extracelular de GPA (datos no mostrados, manuscrito en preparación). La unión aumentada 12 veces de A63-C/A9 en NM-F9 (figuras 1G, H y figura 2) y su aumento sólo muy leve en la unión tras el tratamiento de las células con neuraminidasa (figura 2) supone que GPA de NM-F9 está casi libre de ácidos siálicos y la mayoría de los 15 grupos de TF expuestos se parecen a asialoglicoforina A (AGPA). Esto se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western de lisados de membrana en los que, al contrario que en células K562wt, pudieron detectarse muchas proteínas positivas para TF unidas a membrana en células NM-F9 mediante tinción con A76-G/A7 (figura 4A), incluyendo GPA mediante migración conjunta con una proteína principal individual que puede teñirse con A63-C/A9 (figura 4B). La movilidad electroforética de la proteína positiva para A63-C/A9 se parecía a la del monómero desialilado de AGPA generado a partir de eritrocitos con un peso molecular aparente y teórico de 24 kDa.

MUC1 secretor: MUC1 no sólo se expresa en la superficie celular sino que también se secreta en el sobrenadante de cultivo celular (tabla 2). MUC1 secretor a partir NM-F9 y NM-D4 es positivo para TF mediante lo cual MUC1 de NM-D4 porta más TF que a partir de NM-F9. MUC1 a partir de K562wt es negativo y sólo puede alcanzar un nivel de TF comparable a NM-F9 tras el tratamiento con neuraminidasa. Por el contrario, MUC1 secretado por células ZR75-1, que se conoce que secretan altas cantidades de MUC1, es negativo para TF e incluso cuando se trató con neuraminidasa solo pudieron detectarse cantidades bajas de MUC1 positivo para TF, aunque células ZR75-1 son positivas para TF incluso sin tratamiento con neuraminidasa (resultados no mostrados). El MUC1 de NM-D4, atrapado por el HMFG-1 independiente de glicosilación, también muestra un aumento de la unión de PankoMab en comparación con K562wt y NMF9 (tabla 2).

Ejemplo 4: Estimulación de reacciones inmunitarias *in vitro* e *in vivo*

A) Métodos:

A-1) Ensayo de proliferación de células T

Se prepararon células dendríticas humanas inmaduras mediante diferenciación de monocitos (CDmoh) usando el método de Romani (Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. Journal of Experimental Medicine 180: 83-93 (1994)). Se aislaron monocitos de sangre periférica a partir de sangre periférica de donante humano sano mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Se cultivaron células adherentes que se adhieren sobre plástico durante 6 días en RPMI-1640, FCS al 10%, GM-CSF 1000 U/ml (Leukomax; Novartis Pharma GmbH, Nümburg, Al.), $\text{TNF}\alpha$ 2,5 ng/ml e IL-4 1000 U/ml (ambos de PreproTech EC, Londres, RU). Se incubaron CD inmaduras (10^6 células/muestra) 1:1 durante la noche con lisados de células tumorales, que se obtuvieron a partir de 5×10^6 células K562-F9 incubadas a 46°C durante 22 h antes de la lisis mediante congelación/descongelación en nitrógeno líquido. Tras lavar las células dendríticas con PBS estéril y se añadió $\text{TNF}\alpha$ 75 ng/ml. Tras 2 días las CDmoh maduras se volvieron CD14-, CD1a+, CD80hi, CD86hi, CD40hi, MHCIIhi, CD83hi, CD-Sign+ (citometría de flujo usando anticuerpos correspondientes a 1:20 en PBS, sufijo: - = sin expresión, hi = alta expresión, + = expresión positiva). Antes de la sensibilización de células T, se irradiaron las CDmoh cargadas con antígeno con 30 Gy.

Se aislaron las células T a partir de la fracción no adherente de PBMC de donante sano positivo para HLA-A2 mediante una columna de lana de nailon (Polisciences Inc., Eppelheim, Al.). Alternativamente, se aislaron células T CD4+ o CD8+ a partir de PBMC mediante kits de aislamiento de células T CD4+ o CD8+ MACS según las especificaciones del fabricante (Miltenyi). Se incubaron células T totales, células T CD4+ o CD8+ en medios libres de suero (medio AIM-V) con CDmoh maduras cargadas 1:1 con lisado de células. La razón de respondedor con respecto al estimulador (célula T:CD) era de 10:1. Tras incubación durante la noche se añadieron IL-2 10 U/ml, IL-1 β 1,5 U/ml e IL-7 5 ng/ml. Tras incubación durante cuatro días se reestimularon células T mediante CDmoh maduras cargadas con lisado celular. Se analizó la proliferación de células T mediante el ensayo de BrdU.

Se incorporó BrdU en células T en proliferación según el protocolo del fabricante (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Al.). Tras fijar, se incubaron las células con anticuerpo anti-BrdU marcado con POD. Se detuvo la

siguiente reacción de tinción mediante ácido sulfúrico 1 M. Se logró la detección del marcado de anticuerpo mediante fotometría a una densidad óptica de 450 nm (Ref. 690 nm).

A-2) Activación de células CD8+ no expuestas frente MUC1 y AGPA con lisados de células NM-F9

5 NMDC11 inmaduras son células derivadas de MUTZ-3 optimizadas que son células dendríticas humanas completamente funcionales que presentan características tal como se describe en el documento PCT/EP02/09260 en el estado inmaduro. NMDC11 inmaduras se generan y se maduran adicionalmente tal como se describe para MUTZ-3 en el documento PCT/EP02/09260. También pueden usarse MUTZ-3 en estos ensayos aunque con una eficacia más baja. Se cargaron NMDC11 inmaduras con lisados a partir de F9 y se maduraron adicionalmente para dar células dendríticas funcionales m-NMDC11 que presentan antígenos procesados. Se incubaron m-NMDC11 cargadas con CTL a partir de un donante A2+. Se reestimularon células T una vez mediante m-NMDC11 cargadas con lisado de F9, péptido MUC1 A2 y AGPA, se usaron m-NMDC11 no cargadas como controles. Se realizó el análisis de ELISPOT midiendo la secreción de INFgamma.

A-3) Vacunación de ratones NMRI y NOD/SCID

15 Se inmunizaron ratones NMRI y se les administraron dosis de refuerzo 2 semanas más tarde por vía subcutánea con lisados de células K562 tratadas con temperatura (5×10^6 células/ratón) y adyuvante de Freund incompleto. Un día antes de la inmunización y 9 y 27 días tras la inmunización se les extrajo sangre a los ratones para analizar el suero para detectar anticuerpos contra TF-, Tn-, MUC1 y asialoglicoforina A mediante ELISA 2.

20 Se establece un sistema inmunitario humano mediante aplicación intraperitoneal de linfocitos de sangre periférica humana en ratones NOD-SCID irradiados un día antes (PBL, preparación convencional, 5×10^7 células/ratón). 2-4 h tras la aplicación de PBL, se inmunizaron los ratones por vía subcutánea y se les administraron dosis de refuerzo tal como se describió anteriormente. Se usaron lisados celulares de células Mel624 (5×10^6 células/ratón) como control negativo. Para el análisis de los sueros, se les extrajo sangre a los ratones en los días 13 y 28 tras la primera inmunización. Se llevaron a cabo los análisis mediante ELISA 3.

B) Resultados:

25 *B-1) Inducción de respuestas inmunitarias celulares y humorales*

Con el fin de investigar el potencial de lisados de NM-F9 para inducir respuestas inmunitarias celulares y humorales se realizaron los siguientes ensayos: Pudo demostrarse *in vitro* que se indujo proliferación de células T cuando se cultivaron conjuntamente con CD derivadas de monocitos maduras cargadas con lisados de células NM-F9 (figura 5). Se cargaron las CD con el lisado en el estado inmaduro y se maduraron adicionalmente lo que llevó a la captación, procesamiento y presentación de antígeno en el contexto de moléculas del CMH de clase I y II en CD maduras (CDmoh). Se observó este efecto inmunogénico de lisados de células NM-F9 para células T totales, células cooperadoras T CD4+ y células T CD8+ citotóxicas.

35 El MUC1 obtenido a partir de NM-D4 mediante purificación del sobrenadante usando PankoMab para inmunopurificación no mostró un efecto inmunoinhibidor sobre la proliferación de células T mediada mediante ensayo de BrdU en un experimento que se realizó de manera similar al experimento en el documento PCT/EP03/08014 ejemplo 5B) pero usando MUC1 purificado a partir de NM-D4.

40 Se sometió a prueba la activación de células T citotóxicas no expuestas específicas frente a MUC1 y AGPA con células dendríticas humanas maduras funcionales m-NMDC11 cargadas con lisados de NM-F9 en la reacción de sensibilización y reestimulación con m-NMDC11 cargadas con un péptido MUC1 A2 y proteína AGPA respectivamente, mostrando que CTL no expuestas pueden activarse frente a estos antígenos usando NM-F9 (figura 6).

45 Se sometió a prueba la inducción de una respuesta de anticuerpos frente a varios antígenos en ratones NMRI y en ratones NOD/SCID reconstituidos con PBMC humanos que se vacunaron con lisados de células NM-F9. Pudo observarse una respuesta de anticuerpos en forma de IgG murina y humana (tabla 3) contra TF, Tn, MUC1 y AGPA en ratones NMRI y NOD-SCID reconstituidos, respectivamente. La inducción de una respuesta de IgG indica un cambio de la clase de anticuerpo asociada con una respuesta inmunitaria de células cooperadoras T así como la inducción de respuestas inmunitarias de memoria frente a los antígenos anteriores.

Ejemplo 5: Las células NM-F9 son más sensibles a la lisis celular mediante linfocitos citolíticos naturales que las células K562 de tipo natural.

50 Las células K562 son células diana bien conocidas para la lisis celular mediante linfocitos citolíticos naturales (NK). Aunque este fenómeno se describe en muchas publicaciones el/los mecanismo(s) molecular(es) y las dianas en las células K562 aún deben aclararse (Voshol *et al.* Glycobiology 1993). El efecto de glicoestructuras, por ejemplo ácidos siálicos, en la superficie de células K562 en la lisis celular mediante células NK se trata de manera muy controvertida (Voshol *et al.* Glycobiology 1993). En una publicación anterior (Werkmeister *et al.* Int. J. Cancer 1983) los autores describieron un aumento en la sensibilidad de células K562 a células NK cuando se trataron con

neuraminidasa que elimina ácidos siálicos en la superficie celular. Esta observación no pudo confirmarse mediante otros en ensayos similares (Dall'Olio *et al.* Glycobiology 1997, el Ouagari *et al.* J. Biol. Chem. 1995). Por el contrario, mediante la adición de ácidos siálicos conjugados con diversos portadores, se inhibió la lisis de células K562 (Van Rinsum *et al.* Int. J. Cancer 1986) sugiriendo que la presencia de ácidos siálicos es un prerrequisito para la lisis celular. Además, en dos publicaciones muy recientes (Ohyama *et al.* Embo J. 1999; Ohyama *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 2002) se mostró que las células hipersialiladas son células diana mejores para la lisis por células NK que las células hiposialiladas. Los autores identificaron la forma sialilada del antígeno de Lewis X (sLe^x) como hidrato de carbono sobre la célula diana que se reconoce por CD94 en células NK que median la sensibilidad a células NK. La lisis celular se inhibe en presencia de anticuerpos anti-sLe^x pero no en presencia de anticuerpos que reconocen Le^x (la forma no sialilada del antígeno de Lewis).

Con células NM-F9 y -D4 se dispone de dos clones celulares que difieren de células K562 de tipo natural por un grado de sialilación muy bajo en la superficie celular. Para aclarar si estas diferencias en el fenotipo dan como resultado actividades biológicas distintas, se realizaron ensayos de citotoxicidad con células NK y NM-F9 así como células K562 de tipo natural como células diana.

Se aislaron aproximadamente 8×10^6 células NK a partir de 2×10^8 monocitos de sangre periférica (PBMC) usando microperlas anti-CD3 (Miltenyi Biotec, Alemania) según el fabricante y mediante cultivo adicional durante la noche para eliminar los monocitos adherentes. Al día siguiente, se confirmó la presencia de células NK mediante tinción conjunta de las células con anticuerpos anti-CD56 conjugado con PE y anti-CD16 conjugado con FITC y análisis mediante citometría de flujo (Coulter Epics, Beckman/ Coulter). La inmunotinción de células para la citometría de flujo se describió anteriormente. Se realizó el análisis de células NK mediante citometría de flujo con una dispersión frontal de 55 voltios y aumento 2, una dispersión lateral de 400 voltios y aumento 20, en el canal FL1 (FITC, 650 voltios, aumento 1) y el canal FL2 (PE, 750 voltios, aumento 1) y una compensación FL1-FL2 de 3,8 y una compensación FL2-FL1 de 3,4. De manera habitual, aproximadamente el 20% de las células aisladas eran células NK CD56+, CD16+.

Para analizar la citotoxicidad de las células NK se realizó un ensayo de liberación de europio tal como se describió anteriormente (Blomberg *et al.* J. Immunol. Methods 1986). En resumen, se lavaron aproximadamente 5×10^6 células diana vitales una vez con medio RPMI helado (RPMI 1640 con suero de ternero fetal al 5%) y tras esto se resuspendieron en 800 μ l de un tampón de europio (pH 7,4) que contenía HEPES 50 mM, NaCl 93 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, DTPA 10 mM (Fluka, Alemania), acetato de europio III 2 mM (Aldrich-Sigma, Alemania). Para transferir iones europio³⁺ al interior de las células diana se sometieron a electroporación todas las células resuspendidas (Multiporator, Eppendorf, Alemania) en una cubeta de 4 mm con un pulso de 30 μ s y 710 voltios. Antes y después de la electroporación, se mantienen las células en hielo durante 6-10 min. Tras esto se lavan de nuevo las células cinco veces en el medio de cultivo celular helado mencionado anteriormente y finalmente se resuspenden en medio de cultivo celular (RPMI 1640, suero de ternero fetal al 10%, glutamina 2 mM) a un título celular de 10^5 células por ml. Para la reacción de citotoxicidad se administran 10^4 células diana (100 μ l) a una placa de microtitulación de fondo redondo y se incuban durante 4 h a 37°C en un incubador de CO₂ con células NK a la razón de diana:efector indicada o para control sin células NK. Tras esto, se centrifugan las células (400 x g, 5 min.) y se añaden 20 μ l del sobrenadante de cultivo celular a una disolución de potenciación (Perkin-Elmer, Alemania) proporcionada en una placa de microtitulación con fondo plano. Tras 15 min. de incubación a temperatura ambiente, se detecta la liberación de iones Eu³⁺ en un lector de fluorescencia de resolución temporal (Vector 2, Perkin-Elmer).

Para determinar el porcentaje de lisis específica de células diana se calcula el porcentaje de liberación específica de Eu³⁺ tal como sigue:

$$\% \text{ de liberación espontánea de Eu}^{3+} = \frac{SR (\text{recuentos}) - BR (\text{recuentos})}{MR (\text{recuentos}) - BR (\text{recuentos})} \times 100$$

$$\% \text{ de liberación específica de Eu}^{3+} = \frac{\text{efector/diana (recuentos)} - SR (\text{recuentos})}{MR (\text{recuentos}) - SR (\text{recuentos})} \times 100$$

Cuando la liberación espontánea y de fondo de Eu³⁺ (SR) y (BR) corresponden a la liberación tras la incubación de las células diana (SR) o sólo al sobrenadante de cultivo celular de las células diana (BR) durante 4 h a 37°C sin adición de células NK. Se logra la liberación máxima (MR) a partir de células diana mediante una incubación de 4 h a 37°C en presencia de etanol al 50%. Las liberaciones espontánea y máxima fueron de 1530 ± 865 recuentos y 149861 ± 16994 recuentos para células NM-F9 y de 10393 ± 1856 recuentos y 237325 ± 40542 recuentos para células K562 de tipo natural (wt) cuando ya se había restado la BR. A partir de esto se calculó un % de SR del $10,2\% \pm 4\%$ para células NM-F9 y del $4,3\% \pm 0,3\%$ para células K562wt, respectivamente, que está muy por debajo del límite del 30% de SR para un ensayo satisfactorio. Se realizó el ensayo por triplicado y se repitió cinco veces.

5 Los resultados presentados en la figura 7 demostraron claramente que las células NM-F9 hiposialiladas difieren de células K562wt hipersialiladas en que son mucho más sensibles a la actividad citolítica de células NK que las células K562wt. Por tanto, las diferencias de células NM-F9 y K562wt que se observaron para el fenotipo tal como se describió anteriormente dieron como resultado actividades biológicas distintas. La mayor sensibilidad de células NM-F9 frente a la citotoxicidad de células NK contrasta con la bibliografía en donde se ha descrito que los hidratos de carbono sialilados median la lisis citotóxica mediante células NK.

	n	K _{as.}	sitios de unión/ célula
K562wt	3	1,8*10 ⁸ l/Mol	1,5*10 ⁵
NM-F9	4	2,2*10 ⁸ l/Mol	0,9*10 ⁵
NM-D4	12	9*10 ⁹ l/Mol	1 *10 ⁵

Tabla 1: análisis de Scatchard de la unión de ¹¹¹In-PankoMab radiomarcado a K562wt, NM-F9 y NM-D4

Acm de captura	HMFG-1	PankoMab	
Acm secundario	PankoMab	A-78-G/A7	
Línea celular		- sialidasa	+ sialidasa
K562wt	+	-	+
NM-F9	+	+	+
NM-D4	++	++	++

Tabla 2 En el sobrenadante de células NM-F9 y NM-D4 la cantidad de MUC1 positivo para TF secretor aumentó. Se detectó MUC1 positivo para TF mediante ELISA

modelo de ratón	ratones con respuesta inmunitaria de IgG / recuento total de ratones*			
	AGPA	TF	Tn	MUC1
NMRI	2/3	3/3	3/3	3/3
NOD/SCID**	3/3	3/3	3/3	3/3

Tabla 3: Vacunación de ratones NMRI y NOD/SCID con lisados de células K562-F9

* Se vacunaron tres ratones por grupo con los lisados de células NM-F9 y se les extrajo sangre antes de la inmunización y en el día 9 y 27 (NMRI) o en el día 13 y 28 (NOD/SCID) tras la inmunización para análisis de una respuesta de IgG frente a los antígenos indicados. Los ratones con respuesta positiva mostraron al menos un aumento de tres veces en título de antisuero en comparación con el suero antes de la inmunización (NMRI) o la primera extracción de sangre.

** Se inyectaron PBMC antes de la inmunización

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular que expresa en la superficie celular TF, MUC1 y asialoglicoforina (AGPA).
2. La línea celular según la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en
 - (a) una línea celular denominada NM-F9 que tiene el número de registro de DSMZ, DSM ACC2606;
 - 5 (b) una línea celular denominada NM-D4 que tiene el número de registro de DSMZ, DSM ACC2605; y
 - (c) subclones de (a) o (b) que expresan en la superficie celular TF, MUC1 y asialoglicoforina.
3. La línea celular según la reivindicación 1 ó 2, que comprende un vector que comprende una molécula de ácido nucleico.
- 10 4. La línea celular según la reivindicación 3, en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica al menos un polipéptido de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una citocina, molécula de CMH de clase I, molécula de CMH de clase II y molécula coestimuladora, epítipo de células T o multímeros del mismo, antígeno tumoral, hormona, hormona sexual, adyuvante, anticuerpo u otras moléculas o fragmentos de los mismos que tienen actividad biológica o cualquier combinación de los mismos.
- 15 5. Un lisado de la línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una molécula o mezcla de moléculas obtenido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Células dendríticas cargadas con el lisado, una molécula o una mezcla de moléculas según la reivindicación 5 o células dendríticas incubadas conjuntamente o fusionadas con células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 7. Una composición que comprende la línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el lisado, la molécula o mezcla de moléculas según la reivindicación 5, o las células dendríticas según la reivindicación 6.
8. La composición según la reivindicación 7, que es una composición farmacéutica o de vacuna.
9. Uso de la línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el lisado, la molécula o mezcla de moléculas según la reivindicación 5, o las células dendríticas según la reivindicación 6, para la preparación de una composición farmacéutica o de vacuna para el tratamiento o la prevención de cánceres y/o enfermedades tumorales.
- 25 10. La línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el lisado, la molécula o mezcla de moléculas según la reivindicación 5, o las células dendríticas según la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento o la prevención de cánceres y/o enfermedades tumorales.
- 30 11. El uso según la reivindicación 9, o línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, lisado, molécula o mezcla de moléculas según la reivindicación 5, o células dendríticas según la reivindicación 6 para el uso según la reivindicación 10, en el que dicho cáncer o enfermedad tumoral es un cáncer de cabeza y cuello, de pulmón, del mediastino, del tracto gastrointestinal, del sistema genitourinario, del sistema ginecológico, de mama, del sistema endocrino, de piel, infantil, un cáncer de localización primaria desconocida o metastásico, un sarcoma del tejido blando y el hueso, un mesotelioma, un melanoma, una neoplasia del sistema nervioso central, un linfoma, una leucemia, un síndrome paraneoplásico, una carcinomatosis peritoneal, un cáncer metastásico y/o tumor maligno relacionado con inmunosupresión.
- 35 12. Uso de la línea celular según la reivindicación 2(a) o 2(b) en un método de producción de un anticuerpo, que comprende obtener dicho anticuerpo a partir de dicha línea celular o a partir del medio de dicha línea celular.
- 40

Figura 1

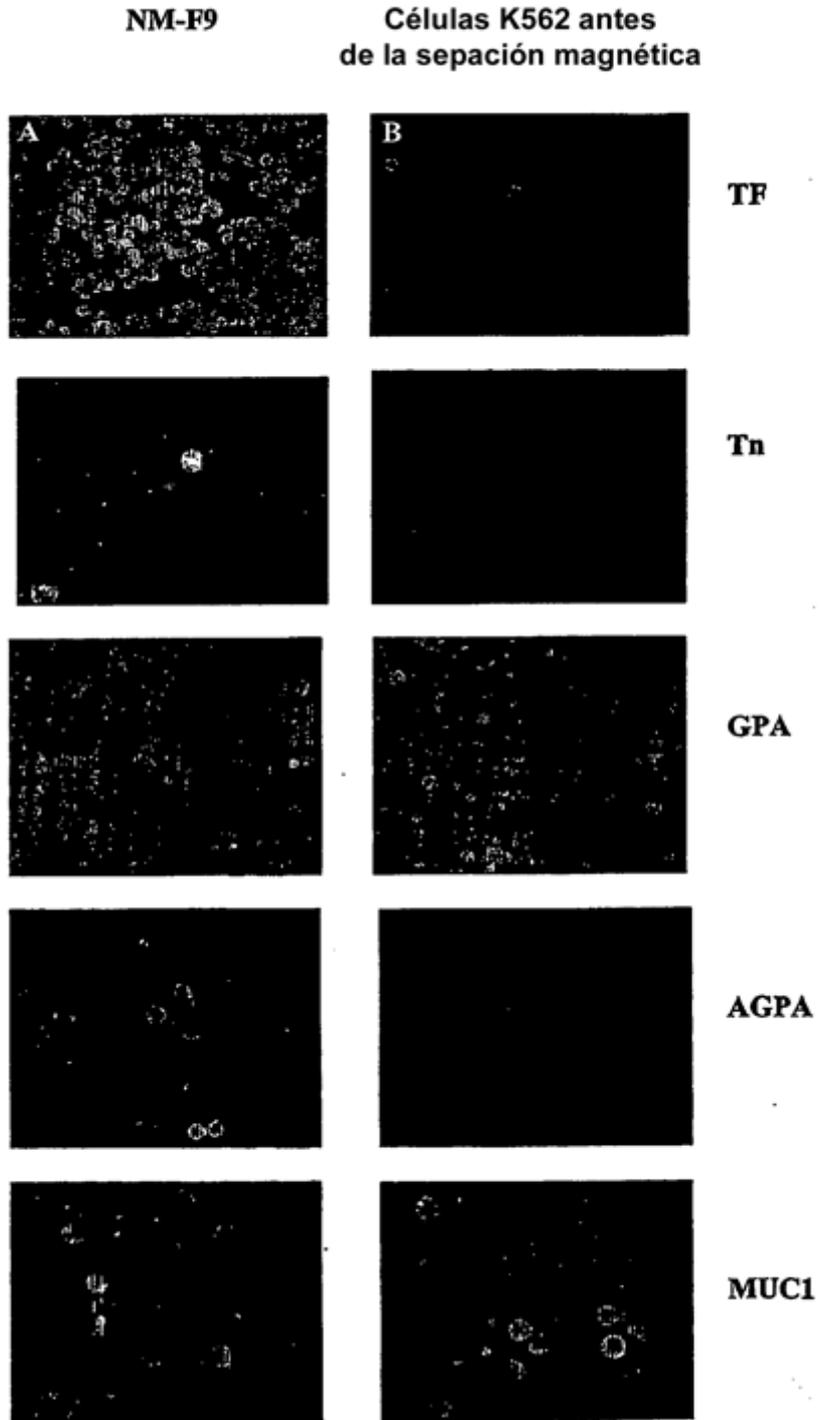


Figura 2

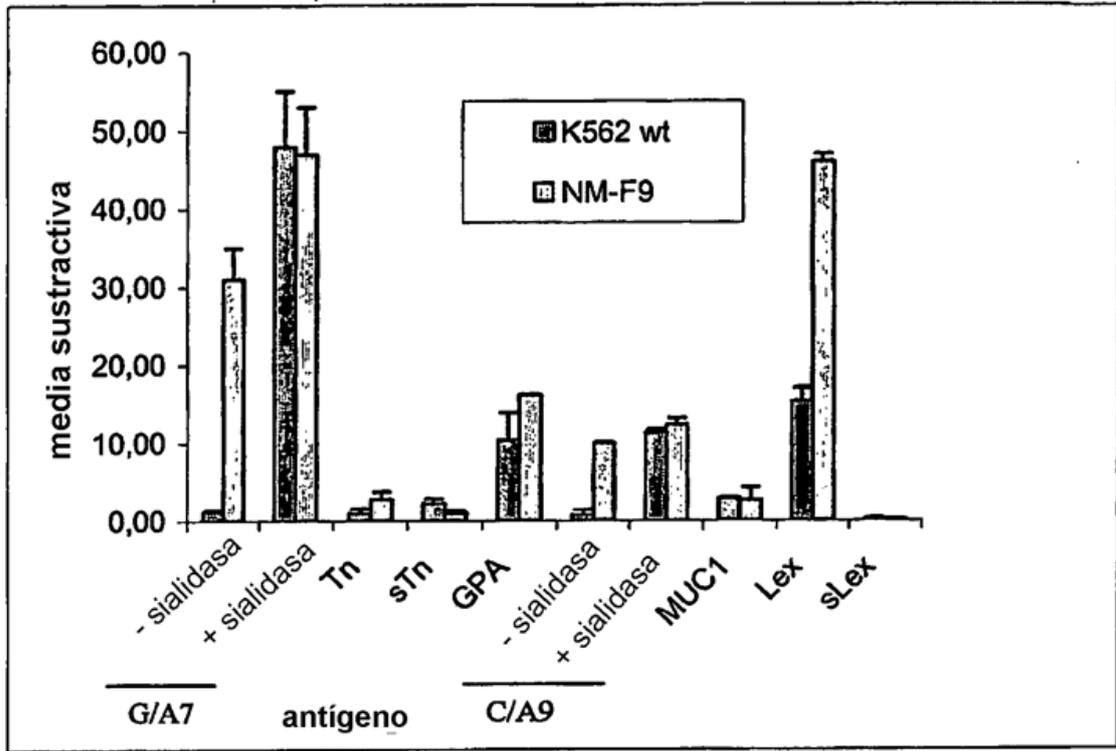
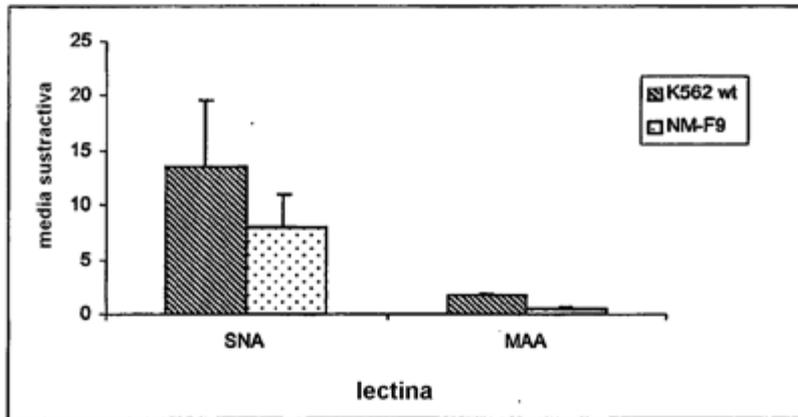
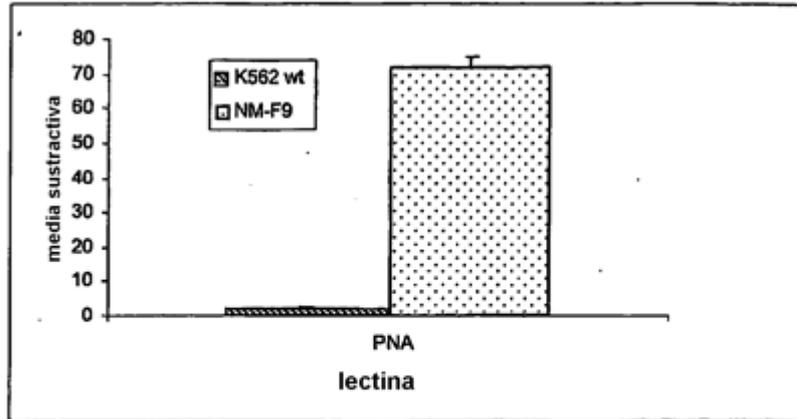


Figura 3

A



B

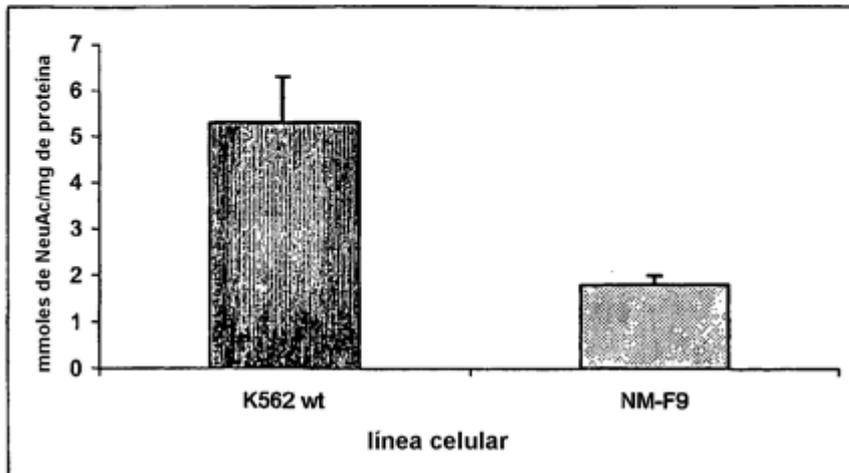


Figura 4

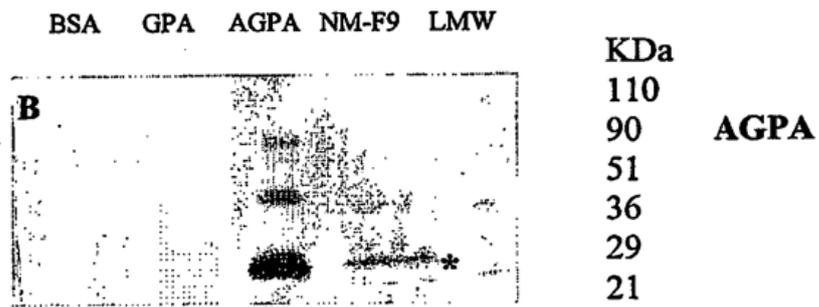
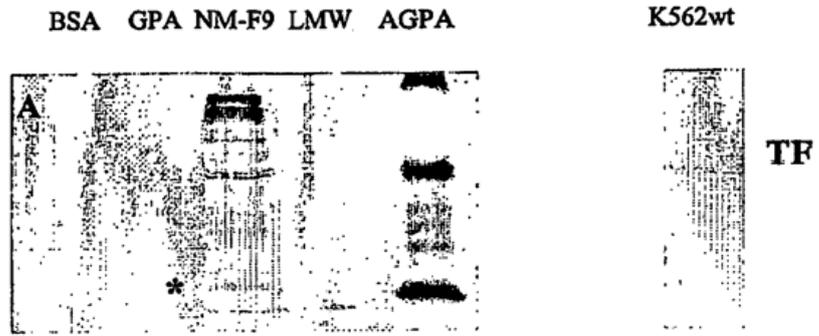


Figura 5

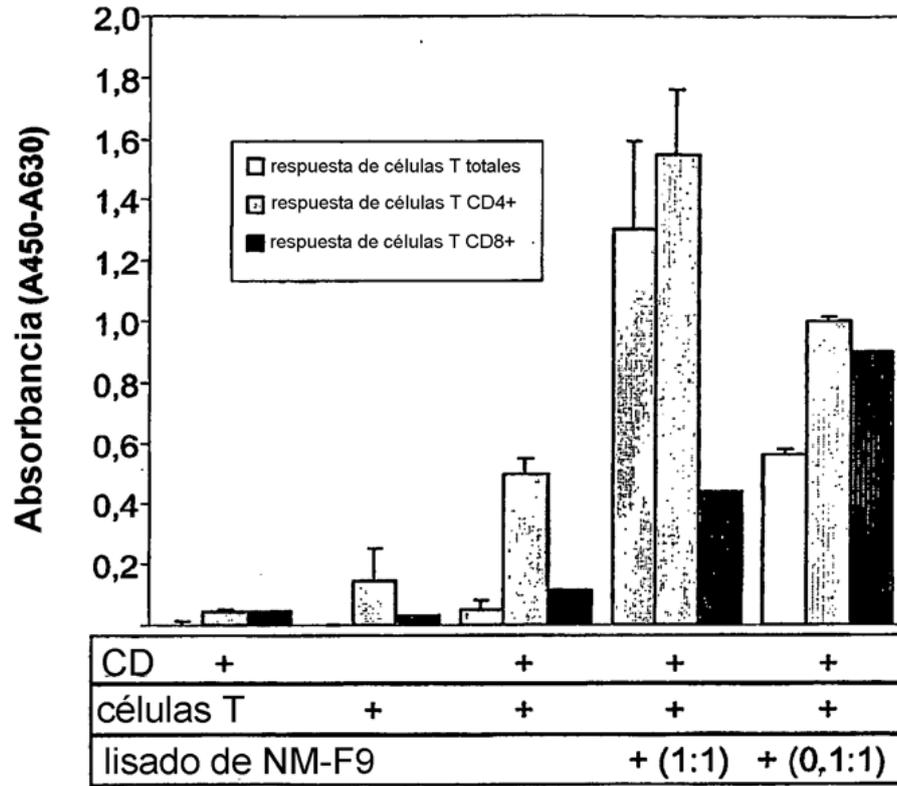


Figura 6

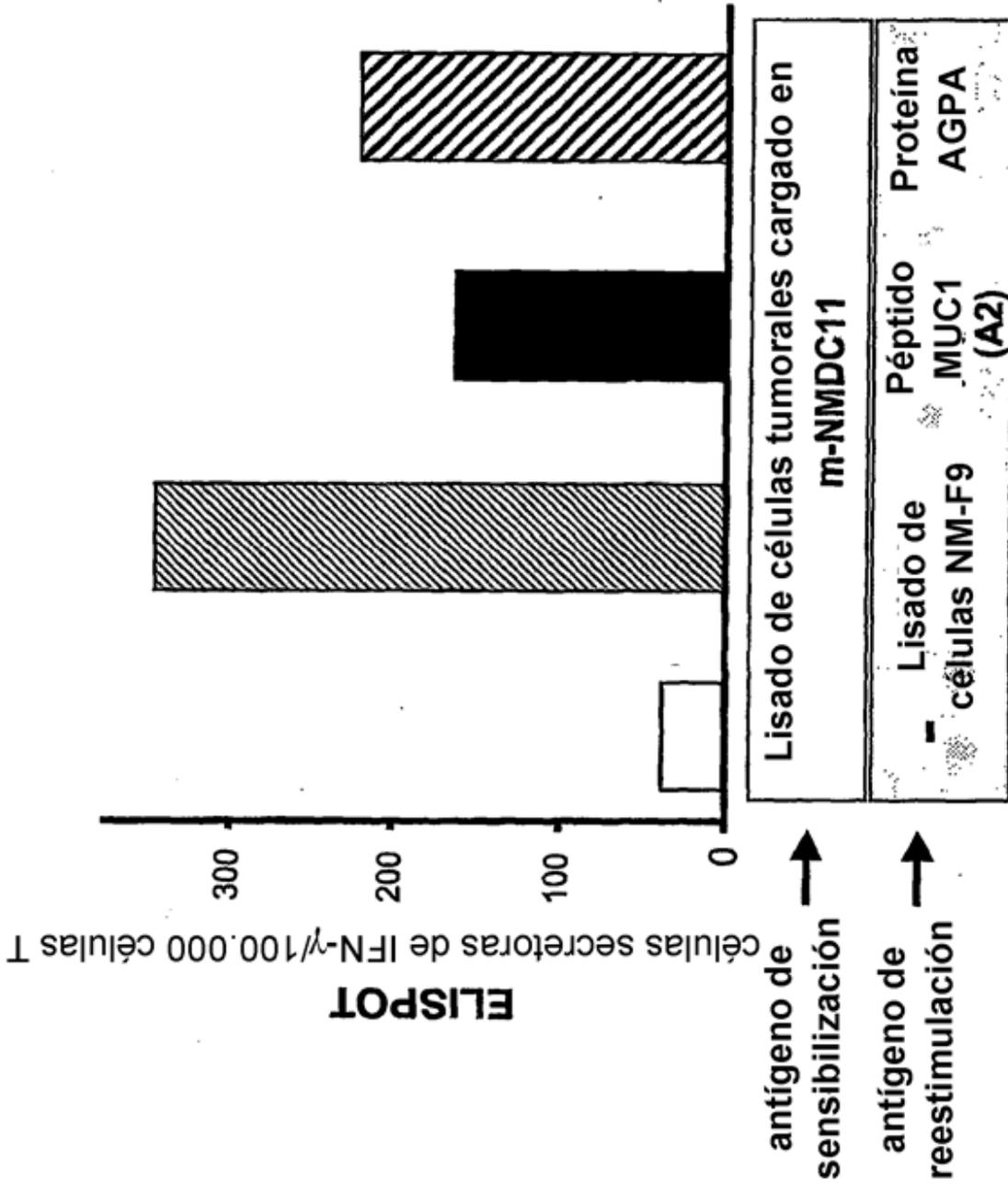


Figura 7

