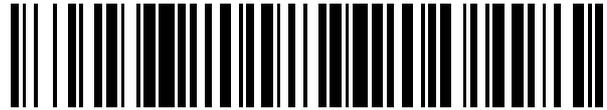


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 442**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2003 E 03765097 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 1529060**

54 Título: **Procedimiento para la producción de una mucina (MUC1) inmunoestimulante**

30 Prioridad:

22.07.2002 EP 02016440

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

09.12.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOLETZ, STEFFEN y
KARSTEN, UWE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 524 442 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

Procedimiento para la producción de una mucina (MUC1) inmunoestimulante

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una molécula de MUC1, que puede provocar una respuesta inmunitaria estimulante en el ser humano. La invención se refiere también a una molécula de MUC1 purificada, que puede obtenerse mediante el procedimiento según la invención y actúa de manera inmunoestimulante en el ser humano. Un objeto adicional de la presente invención es el uso de las moléculas de MUC1 que pueden obtenerse mediante el procedimiento según la invención para la producción de un fármaco para el tratamiento o la prevención de tumores.

La mucina MUC1 humana se denominó anteriormente entre otros también mucina epitelial polimórfica (PEM). Hasta la fecha es la única mucina de la que se conoce que es una glicoproteína transmembrana. El polipéptido de la MUC1 está compuesto en su parte extracelular principalmente por unidades repetitivas, denominadas repeticiones en tándem, cuyo número en la población humana es polimórfico por causa genética. De manera correspondiente a la característica general de las mucinas, MUC1 también porta una gran cantidad de cadenas de hidratos de carbono unidas de manera O-glicosídica. Cada repetición en tándem está compuesta por 20 aminoácidos conservativos (NH₂-HGVTSPDTRPAPGSTAPPA-COOH) con 5 posibles sitios de O-glicosilación (dos serinas y tres treoninas). Hasta hace poco la creencia general era que el posible sitio de glicosilación en la secuencia PDTR no está glicosilado (por ejemplo: Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Imm Revs* 145:61-89 (1995), pág. 67). Esto se justificó entre otros porque tras una inmunización de ratones con MUC1 a partir de fuentes tumorales o no tumorales se produjeron casi exclusivamente anticuerpos, que están dirigidos frente a la región PDTR, por lo que ésta también se denomina región inmunodominante. Un motivo adicional fue que los ensayos de glicosilación *in vitro* en este momento no pudieron lograr ninguna glicosilación en la región PDTR. Sin embargo recientemente se ha mostrado mediante investigaciones particularmente de espectrometría de masas de MUC1 de leche humana (de fuente no tumoral) que la treonina de la región PDTR de algunas repeticiones en tándem puede estar glicosilada, permaneciendo otras sin embargo sin glicosilar. Además la investigación de un grupo de anticuerpos específicos para MUC1 ha mostrado, que una glicosilación en la región PDTR intensifica o sólo posibilita la unión de anticuerpos (Ac) individuales a péptidos de MUC1 cortos en comparación con el péptido no glicosilado, mientras que otros se unen de manera completamente independiente de la glicosilación en este sitio.

MUC1 en sí misma es un marcador tumoral establecido. Las siguientes características conocidas caracterizan MUC1 como marcador tumoral: MUC1 se expresa en el epitelio normal, esencialmente en el epitelio glandular, exclusivamente de manera polar sobre la membrana apical de las células. Esta localización apical rigurosa se pierde durante la carcinogénesis y se produce una expresión apolar a través de toda la superficie celular, por lo que MUC1 se vuelve accesible para el sistema inmunitario. Una característica adicional de MUC1 es que durante la carcinogénesis se expresa de manera intensa. Como tercera característica tumoral conocida cambia la glicosilación de MUC1 durante la carcinogénesis, con lo que se produce una glicosilación aberrante. Debido a esto, por un lado, se produce la expresión de hidratos de carbono-antígenos *de novo*, y por otro lado parcialmente la liberación de epítopos peptídicos (Karsten, *Cancer Research* 58, 2541-2549, 1998; Price, *Tumor Biol. suppl. 1*: 1-5, 1998). MUC1 es, tal como se describe en el estado de la técnica, una molécula en sí conocida y reconocida como marcador tumoral. Sin embargo MUC1 no es una molécula estructuralmente definida con precisión sino una mezcla heterogénea de moléculas. La heterogeneidad se basa en distintas características de MUC1:

- a. MUC1 es genéticamente polimórfica en la población humana con respecto al número de repeticiones en tándem.
- b. La glicosilación y expresión es distinta en tejidos diferentes y en estadios de diferenciación diferentes.
- c. Las preparaciones de MUC1 a partir de tejidos o líneas celulares muestran una elevada heterogeneidad en cuanto a estructuras de hidratos de carbono y con ello en cuanto a moléculas de MUC1.
- d. Las preparaciones de MUC1 a partir de tejidos o líneas celulares muestran que en el interior de una molécula de MUC1 las repeticiones en tándem están glicosiladas de manera heterogénea, esto se refiere a las cadenas de azúcar, como también a los sitios de glicosilación.
- e. Las técnicas disponibles actualmente no permiten la asignación de una cadena de hidratos de carbono a una repetición en tándem determinada o un sitio de glicosilación determinado de MUC1 a partir de material natural.
- f. Hasta la fecha no se ha descrito completamente la glicosilación para ninguna MUC1.

En ningún caso se conoce completamente la estructura química de la molécula de MUC1 natural. Por el contrario, la glicosilación se conoce en pocos casos y entonces sólo parcialmente. Esto muestra que en el caso de MUC1 natural convencional no se trata de ninguna estructura definida, sino de un gran grupo heterogéneo de moléculas.

A esto se añade que en el caso de tumores aparecen modificaciones de la glicosilación de MUC1 por los cambios en el aparato de glicosilación, que introducen una complejidad adicional en la heterogeneidad. También esta glicosilación modificada es muy heterogénea con respecto al tipo de tumor, dentro de un tipo de tumor, con respecto

a cadenas de hidratos de carbono, distribución de las cadenas de hidratos de carbono.

Se describe que MUC1 asociada a tumores actúa de manera inmunosupresora sobre la proliferación de células T. (Agrawal *et al.*, Nat. Med., 1998, Oct. 4(10):1093). Se describe adicionalmente que a este respecto se trata en particular de moléculas de MUC1 más largas con más de 60 aminoácidos, que se obtienen a partir de células tumorales (documento WO 99/23114). Una inmunosupresión correspondiente es extraordinariamente desventajosa o impide el uso de moléculas de MUC1 asociadas a tumores correspondientes, que se obtuvieron a partir de células. En particular se describió, que MUC1, que se obtuvo con ayuda del anticuerpo B27.29, actúa de manera inmunosupresora (documentos US 20020044943, WO 9810783). Para una profilaxis o terapia tumoral adecuada y eficaz en base al marcador tumoral MUC1 es necesario encontrar la posibilidad de producir moléculas de MUC1, que no actúen de manera inmunosupresora o lo hagan en una medida reducida e incluso en el caso preferido actúen de manera inmunoestimulante. No se conoce una profilaxis o terapia tumoral establecida en base al marcador tumoral MUC1.

El documento DE 100 27 695 describe vacunas contra antígenos dependientes de la conformación, como por ejemplo anticuerpos anti-idiotipo contra epítomos de conformación de MUC1. Para ello se usan anticuerpos anti-MUC1 como antígeno para examinar una biblioteca de fago.

Ryuko *et al.* (2000), Tumor Biol 21:197-210 describen péptidos de MUC1 glicosilados, que se unen a distintos anticuerpos anti-MUC1. No se describe que estos péptidos de MUC1 provoquen una respuesta inmunitaria estimulante en el ser humano y por otro lado son péptidos.

El documento DE 195 34 630 describe el uso del anticuerpo A76-A/C7 para la preparación de MUC1 a partir de células de tumor de mama, epitelio pancreático o carcinomas colorrectales, véase la columna 3, 23-26. No se describe que las moléculas así aisladas actúen de manera inmunoestimulante.

Snijdwint *et al.* (1999), Cancer Immunol. Immunother 48:47-55 describen la obtención de MUC1 a partir del sobrenadante de células ZR-75-1 por medio de filtración y por medio del anticuerpo 139H2. La molécula de MUC1 así obtenida actúa, tal como se muestra en la ilustración 4 de D4, de manera inmunosupresora.

Price *et al.* (1998), Tumor Biol 19 (supl. 1):1-20 describen la caracterización de 56 anticuerpos monoclonales frente a MUC1. A este respecto también se usa una preparación que contiene MUC1 de la línea celular de cáncer de mama ZR-75 (véase la página 5, columna derecha). A este respecto D5 no describe cómo se produjo la preparación que contenía MUC1 de células ZR-75.

Gimmi *et al.* (1996), Nat. Med 2(12):1367-1370 describen la preparación de MUC-1 a partir del sobrenadante de células ZR-75.1 por medio de un anticuerpo denominado anticuerpo anti-DF3. La MUC1 así aislada actúa de manera inmunosupresora (véase la página 1368, ilustración 1a).

El problema técnico, en el que se basa la invención, es por consiguiente proporcionar medidas para la terapia y/o la profilaxis de tumores, que están asociados con el marcador tumoral MUC-1.

Este problema técnico se resuelve mediante las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

Por tanto la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una molécula de MUC1, que puede provocar una respuesta inmunitaria estimulante en el ser humano, que comprende:

a) poner en contacto una mezcla de moléculas de MUC1 a partir del sobrenadante de células ZR-75-1 con el anticuerpo A76-A/C7 durante un periodo que es suficiente y en condiciones que son adecuadas, para que se forme un inmunocomplejo;

b) aislar el inmunocomplejo; y

c) poner a disposición la molécula de MUC1 a partir del inmunocomplejo.

El término "producción" comprende además de las etapas mencionadas de manera explícita anteriormente también etapas adicionales, tales como tratamientos previos del material de partida o tratamientos adicionales del producto final. A continuación se explican en más detalle procedimientos de tratamiento previo, procedimientos de tratamiento adicional que comprenden por ejemplo la formulación definitiva de la molécula de MUC1 producida en formas farmacéuticas adecuadas. El tipo de forma farmacéutica, por ejemplo comprimido, disolución o liofilizado, depende a este respecto del uso previsto. A este respecto el experto en la técnica conoce qué forma farmacéutica es adecuada para qué uso. Según la forma farmacéutica la molécula de MUC1 producida mediante el procedimiento según la invención puede estar presente junto con excipientes, vehículos o principios activos adicionales. A este respecto excipientes son preferiblemente adyuvantes, principios activos adicionales son preferiblemente moléculas inmunoestimulantes, tales como interleucinas. La molécula de MUC1 producida con el procedimiento según la invención también puede modificarse químicamente en etapas de tratamiento adicionales. Preferiblemente la molécula de MUC1 se une a este respecto con una o varias moléculas adicionales de manera adecuada, es decir mediante interacción física o química. Como moléculas adicionales en el sentido de la invención sirven

preferiblemente otras proteínas o péptidos, que se fusionan con la molécula de MUC1 producida mediante el procedimiento según la invención. A este respecto la molécula de MUC1 se encuentra entonces como proteína de fusión. Como moléculas adicionales en el contexto del procedimiento según la invención son adecuadas especialmente sustancias que muestran un efecto terapéutico o diagnóstico, por ejemplo radioisótopos o toxinas. De igual manera, la invención también abarca como moléculas adicionales aquellas sustancias que son adecuadas para servir como materiales portadores o que pueden servir como componentes de acoplamiento para las moléculas de MUC1 con portadores. Tales materiales portadores o componentes de acoplamiento se conocen en el estado de la técnica.

El término "molécula de MUC1, que puede provocar una respuesta inmunitaria en el ser humano", comprende moléculas de MUC1 o fragmentos de las mismas, que pertenecen a una especie de glicoproteínas de MUC1, que solas o en combinación con adyuvantes y/o moléculas inmunoestimulantes adecuados provocan una respuesta inmunitaria contra células tumorales positivas para MUC1. Por respuesta inmunitaria se entiende en el sentido de la invención el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria humoral y/o respuesta inmunitaria celular. Por una respuesta inmunitaria humoral se entiende a este respecto la inducción de anticuerpos mediante las moléculas de MUC1 producidas con el procedimiento según la invención. Por una respuesta inmunitaria celular se entiende a este respecto la inducción de células inmunitarias, por ejemplo células positivas para CD4 y/o positivas para CD8, mediante las moléculas de MUC1 producidas con el procedimiento según la invención, que luchan contra células tumorales positivas para MUC1 directa o indirectamente. Las moléculas de MUC1 se caracterizan porque no actúan o sólo actúan débilmente de manera inmunosupresora sobre células T. A este respecto se prefieren las moléculas de MUC1, que estimulan células T, es decir estas moléculas actúan de manera estimulante en el sentido de la presente invención. Preferiblemente las moléculas de MUC1 están asociadas a tumores. Las características inmunoestimulantes de moléculas de MUC1 y las respuestas inmunitarias inducidas pueden detectarse mediante al menos uno de los procedimientos descritos en los ejemplos u otros procedimientos conocidos para el experto en la técnica *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo mediante ELISA, ensayos ADCC y CDC, ensayos de estimulación de células T y modelos de ratón NOD-SCID. Por tanto el experto en la técnica puede determinar fácilmente si determinadas moléculas de MUC1 pertenecen a la misma especie con respecto a sus características inmunoestimulantes. Preferiblemente los miembros de esta especie en una o más repeticiones en tándem comparten características químicas, que se definirán en más detalle a continuación.

Por el término "poner en contacto" se entienden todas las medidas, mediante las que se posibilita una interacción química, bioquímica o física entre la molécula de MUC1 y los anticuerpos utilizados en el procedimiento. Las moléculas de MUC1 y los anticuerpos se introducen para ello preferiblemente en un líquido adecuado. Como líquido adecuado sirven por ejemplo disoluciones tampón, que se utilizan, tal como se describe en el estado de la técnica o en los ejemplos, en sistemas de detección ELISA o RIA o disoluciones, que se describieron para procedimientos de purificación cromatográficos. Especialmente adecuadas son disoluciones, que se utilizan para cromatografía de afinidad con anticuerpos en el estado de la técnica. Las disoluciones adecuadas son de manera muy especialmente preferible las disoluciones que se describen en más detalle en los ejemplos.

El término "mezcla de moléculas de MUC1" comprende un gran número de moléculas de MUC1, que pueden pertenecer a la misma especie o a distintas especies. Tal como ya se expuso anteriormente, en el caso del marcador tumoral MUC1 descrito en el estado de la técnica se trata de una mezcla de especies moleculares diferentes, que se diferencian con respecto a su glicosilación y parcialmente en su composición de aminoácidos. La mezcla de moléculas de MUC1 utilizada en el procedimiento según la invención también puede contener junto a éstas moléculas adicionales, por ejemplo azúcar, lípidos o proteínas o péptidos, que no pertenecen al grupo de MUC1. Por ejemplo, tales mezclas de moléculas de MUC1 pueden obtenerse a partir de tejidos tumorales, células tumorales así como a partir de células o líneas celulares que, entre otros, producen MUC1 asociada a tumores. Por ejemplo pueden producirse lisados a partir de estos tejidos, células o líneas celulares. Estos lisados de células o partes de los mismos pueden servir también como mezclas de MUC1. Como mezcla de moléculas de MUC1 también pueden servir fragmentos o glicopéptidos sintéticos de la MUC1 asociada a tumores. La producción de glicopéptidos sintéticos se conoce en el estado de la técnica (Karsten, *loc. cit.*). Además los glicopéptidos pueden producirse mediante tratamiento con proteasas y/o glicosidasas a partir de preparaciones de MUC1. Se prefiere muy especialmente el sobrenadante de células ZR-75-1, que se usa en el procedimiento según la invención.

El término "anticuerpo" comprende en el sentido de la invención anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados, humanos, anticuerpos completos de isotipos diferentes o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo fragmentos de anticuerpos monocatenarios (ScFv), fragmentos Fab, fragmentos de anticuerpos multivalentes (por ejemplo dia, tria o tetracuerpos) o fragmentos de anticuerpos de otro formato, también aquéllos que se usan como proteínas de fusión acopladas con otros péptidos o estructuras proteicas, así como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que poseen junto a la especificidad para MUC1 según la invención también una o más especificidades adicionales, por ejemplo anticuerpos bispecíficos. La especificidad según la invención de los anticuerpos según la invención se explica adicionalmente a continuación. La producción de estos anticuerpos se produce según técnicas en sí conocidas. Los anticuerpos utilizados en los procedimientos según la invención se caracterizan por las características mencionadas anteriormente.

En este contexto por el término "región inmunodominante de la repetición en tándem de MUC1", en el sentido de la invención se entiende la región PDTR, que en un sentido estricto incluye aminoácidos adicionales de las secuencias

vecinales de la repetición en tándem de MUC1, por ejemplo APDTRPAP. El experto en la técnica puede determinar fácilmente si un anticuerpo puede unirse a esta región mediante los procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

5 El término “repetición en tándem de MUC1” indica una secuencia de 20 aminoácidos: HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA. Los cinco sitios de O-glicosilación posibles en dos serinas y tres treoninas están subrayados en la secuencia indicada anteriormente. Además este término incluye según la invención también aquellas variantes que presentan mutaciones y con ello cambios de aminoácido en una o varias repeticiones en tándem de una molécula de MUC1 más larga. La repetición en tándem presenta 20 aminoácidos y puede empezar en cualquier posición.

10 El término “repeticiones en tándem en serie de MUC1 no glicosiladas” indica una sucesión lineal de varias repeticiones en tándem de MUC1, sin interrumpirse la sucesión por otras secuencias. Preferiblemente se encuentran al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco repeticiones en tándem en serie. Se prefieren más al menos seis repeticiones en tándem en serie.

15 Por el término “aumentado” en el sentido de la invención se entiende una unión del anticuerpo frente a un péptido de MUC1 con PDTR glicosilada entre 9 y 40 aminoácidos, que es significativamente más fuerte, que la unión frente a un péptido correspondiente, que no está glicosilado en la región PDTR. Esto es aplicable para repeticiones en tándem con PDTR glicosilada del punto ii ya explicado (ii, la unión a un fragmento de MUC1, que es de entre 9 y 40 aminoácidos de longitud y que contiene secuencias de la repetición en tándem de MUC1 y de la región inmunodominante, se posibilita o aumenta mediante la glicosilación de la treonina de una secuencia PDTR). Además con ello se entiende una unión del anticuerpo frente a varias repeticiones en tándem en serie, que es significativamente más fuerte, que una unión frente a repeticiones en tándem individuales. Esto es aplicable para repeticiones en tándem no glicosiladas del punto iii) se aumenta la unión a repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas, cuando están presentes las repeticiones en tándem en serie de MUC1 no glicosiladas;) y frente a repeticiones en tándem con PDTR glicosilada del punto iv) (iv, la unión a múltiples repeticiones en tándem de MUC1 glicosiladas, que portan glicosilaciones en las treoninas de varias secuencias PDTR de la región inmunodominante, se aumenta según un efecto aditivo de la longitud y la glicosilación de PDTR frente a fragmentos de MUC1 cortos de ii)). El experto en la técnica puede determinar fácilmente si una unión está aumentada significativamente mediante pruebas estadísticas adecuadas y se ilustrará en los ejemplos 1 a 3.

30 Por el término “posibilita” en el sentido de la invención se entiende una unión de un anticuerpo frente a un péptido de MUC1 con PDTR glicosilada entre 9 y 40 aminoácidos, que se posibilita mediante la glicosilación en ese sitio. Péptidos correspondientes, que no están glicosilados en la región PDTR, no se unen o la unión apenas puede detectarse con los métodos usados (véase también 2).

35 Por el término “inmunocomplejo” en el sentido de la invención se entiende el producto de una reacción anticuerpo-antígeno. A este respecto se une el anticuerpo mediante interacciones fisicoquímicas de manera reversible al antígeno. Los componentes que interaccionan forman el inmunocomplejo.

40 El término “aislamiento” comprende todas las medidas o procedimientos que sirven para separar el inmunocomplejo de anticuerpos, que no han formado ningún inmunocomplejo con un antígeno así como de moléculas de MUC1 u otras moléculas, que no se han unido a un anticuerpo. Estos procedimientos se conocen en el estado de la técnica y se describen en los ejemplos y comprenden por ejemplo medidas que llevan a la precipitación del inmunocomplejo o procedimientos cromatográficos. También se describen a continuación procedimientos adecuados adicionales en más detalle.

45 Además en el presente documento se describe un epítipo tumoral novedoso e inesperado de la molécula completa de MUC1, que puede obtenerse mediante el procedimiento según la invención. El epítipo tumoral de MUC1 novedoso de la molécula completa de MUC1 se caracteriza por las especificidades de unión comunes de anticuerpos monoclonales específicos para MUC1 del grupo 1, que se describirán a continuación en detalle. Todos los anticuerpos monoclonales investigados, que tienen las características de unión comunes descritas a continuación, se generaron a partir de la inmunización de ratones con MUC1 a partir de materiales tumorales:

Los anticuerpos del grupo 1 tienen las características de unión aplicables en conjunto 1 a 4:

50 1) Los anticuerpos se unen a la región inmunodominante (denominada región PDTR, véase la definición) de la repetición en tándem de MUC1.

55 2) La unión de los anticuerpos a un fragmento de MUC1 de las repeticiones en tándem de MUC1, que contiene la región PDTR y tiene una longitud de entre 9 y 40 aminoácidos, se posibilita o se aumenta mediante una glicosilación en la treonina de una secuencia PDTR de la región inmunodominante. La unión a los péptidos de MUC1 correspondientes, que no están glicosilados en la secuencia PDTR, es claramente inferior. A este respecto, una glicosilación con Tn (GalNAc α 1-O-Thr) es suficiente para alcanzar este efecto, sin embargo también es posible una glicosilación más larga como por ejemplo mediante TF (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Thr) para alcanzar el efecto. Las glicosilaciones en otros sitios de glicosilación de la repetición en tándem de MUC1 no tienen ninguna o significativamente ninguna influencia sobre el efecto inicial (véase el ejemplo 1 y la tabla 1).

3) Los anticuerpos se unen mejor a repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas, cuando están presentes en serie. A este respecto el péptido de repetición en tándem de MUC1 no glicosilada múltiple contiene al menos 3 repeticiones en tándem, pudiendo llevarse a cabo la intensificación de la unión también sólo mediante repeticiones en tándem adicionales y/o aumentándose de manera considerablemente más intensa mediante un número elevado de repeticiones en tándem. En el caso de la mayoría de anticuerpos se observa el mayor incremento de unión de péptidos de MUC1 con 4 repeticiones en tándem tras los péptidos de MUC1 con 6 repeticiones en tándem (véase el ejemplo 2 y la tabla 2).

4) Los anticuerpos muestran una característica de unión, que según la invención se denomina efecto aditivo. Los anticuerpos se unen mejor a repeticiones en tándem de MUC1 con PDTR glicosilada, cuando están presentes en serie. A este respecto el péptido de la repetición en tándem de MUC1 con PDTR glicosilada múltiple contiene al menos 2 repeticiones en tándem y al menos 2 regiones PDTR glicosiladas. La intensificación de la unión también puede llevarse a cabo sólo mediante repeticiones en tándem con PDTR glicosilada adicionales y/o aumentarse de manera considerablemente más intensa mediante un número elevado de repeticiones en tándem con PDTR glicosilada. En el caso de muchos anticuerpos se observa el mayor incremento de unión para péptidos de la repetición en tándem de MUC1 con PDTR glicosilada múltiple de 4 repeticiones en tándem a aquéllos con 6 repeticiones en tándem (véase el ejemplo 3 y la tabla 3).

El epítipo tumoral se describe mediante las especificidades de unión de los anticuerpos, que presentan las características de unión 1 y 2 y 3 y 4. A este respecto se prefiere la estructura del epítipo antigénico, que se une mediante los anticuerpos con efecto aditivo especialmente intenso, por ejemplo A76-A/C7 y VU-11E2 y a este respecto preferiblemente A76-A/C7. Una forma adicionalmente preferida del epítipo tumoral de MUC1 según la invención es la estructura que se une preferiblemente mediante los anticuerpos con un efecto de unión aditivo especialmente intenso, por ejemplo A76-A/C7, VU-11E2, y a este respecto especialmente mediante A76-A/C7, dado que A76-A/C7 presenta una unión muy reducida a MUC1 liberada al suero (MUC1 "extraída") en pacientes con carcinoma de colon. Por el contrario, HMFG-1 muestra una unión claramente mayor en pacientes con carcinoma de colon y páncreas. Este hecho es una gran ventaja para terapias inmunitarias, que usan moléculas de MUC1 o anticuerpos específicos para MUC1 con esta especificidad.

Dado que el efecto de la longitud de anticuerpos frente a repeticiones en tándem no glicosiladas solo no consigue ninguna diferenciación entre anticuerpos, que se produjeron mediante la inmunización con material tumoral, y anticuerpos, que se produjeron mediante una inmunización con material no tumoral, queda claro, que la estructura de bucle descrita en la bibliografía, que aparece en péptidos de MUC1 no glicosilados de múltiples repeticiones en tándem, no corresponde exactamente en esta forma allí descrita al epítipo tumoral según la invención.

Todos los anticuerpos sometidos a prueba de inmunizaciones con MUC1 a partir de material tumoral muestran una característica de unión que depende de la glicosilación de la región PDTR, a este respecto se prefiere una estructura de MUC1 que tiene una longitud de al menos 9 aminoácidos y contiene un entorno de al menos 3 aminoácidos adicionales alrededor de la región PDTR, y de que estén presentes repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas en serie. La mayor parte muestra el efecto de unión aditivo de repeticiones en tándem múltiples y glicosilación de PDTR.

Por el contrario casi todos los anticuerpos sometidos a prueba, que se obtuvieron mediante inmunización con material no tumoral, son independientes de la glicosilación. La mayoría de los anticuerpos son negativos para el efecto aditivo.

Anticuerpos preferidos para la definición y descripción según la invención del epítipo tumoral y para la aplicación de estos anticuerpos para el diagnóstico y el tratamiento de tumores así como para la obtención según la invención de moléculas de MUC1 adecuadas para el diagnóstico y el diagnóstico de tumores, son aquellos anticuerpos del grupo 1 que presentan un efecto de unión aditivo con respecto a la longitud y glicosilación de PDTR, tal como se describió en la característica de unión 4, por ejemplo A76-A/C7, VU-11E2, VU-11D1, BC4E549, VU-12E1, VU-3D1 y b-12 (véase la tabla 3; la fuente de los anticuerpos se describe en la tabla 1). Estos anticuerpos presentan una afinidad aumentada frente a repeticiones en tándem múltiples y repeticiones en tándem múltiples con PDTR glicosilada y por consiguiente frente a MUC1 de tumor nativa, que está compuesta por repeticiones en tándem múltiples, y por tanto se prefieren según la invención.

Se prefieren especialmente anticuerpos para la definición y descripción según la invención del epítipo tumoral y para la aplicación de estos anticuerpos para el diagnóstico y el tratamiento de tumores así como para la obtención según la invención de moléculas de MUC1 adecuadas para el diagnóstico y el diagnóstico de tumores, que presentan un fuerte efecto de unión aditivo. Estos anticuerpos se unen a péptidos de repetición en tándem de MUC1 con PDTR glicosilada múltiples según 4) claramente con una intensidad hasta un múltiplo mayor que a péptidos de MUC1 con PDTR glicosilada cortos según 2) y su unión a repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas múltiples según 3). Los anticuerpos de este subgrupo preferido muestran un efecto aditivo fuerte de la intensificación de la unión mediante glicosilación de la secuencia PDTR según 2) y la multimerización de las repeticiones en tándem según 3) (véase el ejemplo 3 y la tabla 3). Los anticuerpos de este grupo, preferiblemente A76-A/C7, VU-11E2 y VU-11D1 (véase el ejemplo 3 y la tabla 3) muestran un efecto aditivo especialmente fuerte y presentan una afinidad especialmente aumentada frente a repeticiones en tándem con PDTR glicosilada múltiples y por consiguiente frente

a MUC1 de tumor nativa, que se compone de repeticiones en tándem múltiples, y por tanto se prefieren según la invención.

5 Todos los anticuerpos específicos para MUC1 sometidos a prueba, que presentan las características de unión del grupo 1, se correlacionan con el inmunógeno, que se usó para su generación en ratones (véase el ejemplo 2 y la tabla 1), por ejemplo en forma de células tumorales completas o MUC1 obtenida a partir de material tumoral. Los anticuerpos monoclonales (Acm) específicos para MUC1, obtenidos a partir de inmunizaciones con material de MUC1 sin relevancia tumoral, no muestran esta combinación de características de unión. Todos son independientes o dependientes de manera inversa (negativa) de la glicosilación de la región PDTR según 2) o independientes de la longitud de los péptidos de MUC1 no glicosilados y por consiguiente del número de repeticiones en tándem según 3). Esta correlación inesperada muestra que los anticuerpos que presentan las características de unión del grupo 1, reconocen una estructura de antígeno especial sobre MUC1, que corresponde a un epítipo tumoral novedoso sobre MUC1 y por consiguiente es especialmente adecuada como estructura diana para una terapia tumoral y para fines diagnósticos. Los procedimientos terapéuticos y diagnósticos, que usan este epítipo tumoral novedoso e inesperado como estructura diana, mejoran de manera significativa los planteamientos hasta la fecha, que contemplaban MUC1 según las características de sobreexpresión, expresión apolar y glicosilación aberrante asociadas a tumores conocidas hasta la fecha.

En el presente documento se describe un epítipo tumoral novedoso y sorprendente sobre la mucina epitelial polimórfica humana MUC1. Además en el presente documento se describe este epítipo así como sustancias y procedimientos para su producción, que contienen este epítipo, tales como por ejemplo células, glicoproteínas o glicopéptidos y procedimientos para su aplicación en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades tumorales, incluyendo vacunas, tales como por ejemplo vacunas de células completas, vacunas de glicoproteínas o glicopéptidos, así como anticuerpos, que se obtuvieron con ayuda de MUC1 como inmunógeno, que se obtuvo mediante el procedimiento de producción según la invención, y que presentan un efecto aditivo aumentado y por tanto son especialmente adecuados para su aplicación en el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades tumorales.

Para aplicaciones de MUC1 en la terapia y la profilaxis tumoral es necesario aislar y/o identificar tales moléculas de MUC1, que portan epítopos con relevancia tumoral y en la medida de lo posible no tienen influencia inmunosupresora o la tienen en una medida reducida. Esto es válido también para el aislamiento y la producción de células u otras sustancias portadoras, que portan moléculas de MUC1 adecuadas en el sentido de la invención. Para el diagnóstico es ventajoso, lograr un diagnóstico diferencial, que pueda determinar si MUC1 está presente y en qué medida, que porte epítopos con relevancia tumoral o porte epítopos con menos relevancia o irrelevantes, y que no actúe de manera inmunosupresora, lo haga de manera reducida o aumentada (véase también en diagnóstico más abajo). Los procedimientos descritos a continuación según la invención permiten la definición, la caracterización y el aislamiento de las moléculas de MUC1 adecuadas anteriores según la invención.

La invención se refiere a procedimientos que permiten, a partir de la gran agrupación de moléculas de MUC1 diferentes, cuyas estructuras no se conocen en ningún caso químicamente en detalle, identificar y/u obtener tales moléculas de MUC1 o sus fragmentos o derivados, que pueden usarse de manera ventajosa para una aplicación en el tratamiento de tumores, la profilaxis de tumores y el diagnóstico de tumores. Tales moléculas de MUC1 se denominan además según la invención moléculas de MUC1 asociadas a tumores e incluyen además de moléculas también mezclas de moléculas, tales como por ejemplo glicopéptidos, glicoproteínas o mezclas de los mismos así como fragmentos y derivados de las moléculas, que contienen el epítipo tumoral según la invención. Según la invención, moléculas asociadas a tumores son también células u otras sustancias portadoras, tales como por ejemplo virus, bacterias, partes de células, tales como por ejemplo exosomas o lisados de células o liposomas, que contienen una o varias moléculas de MUC1 asociadas a tumores con el epítipo tumoral según la invención. Los procedimientos corresponden a ensayos de selección que permiten identificar y obtener la MUC1 adecuada para las aplicaciones mencionadas anteriormente y explicadas a continuación en detalle. La etapa central del procedimiento de producción es una identificación y/o un aislamiento de moléculas de MUC1 asociadas a tumores con ayuda de anticuerpos, que reconocen el epítipo tumoral de MUC1 según la invención, tales como por ejemplo anticuerpos del grupo 1 (A76-A/C7, VU-11E2, VU-11D1, BC4E549, VU-12E1, VU-3D1 y b-12). A este respecto un grupo preferido de anticuerpos son aquellos anticuerpos que presentan un efecto de unión aditivo con respecto a la longitud y glicosilación de PDTR, tales como por ejemplo A76-A/C7, VU-11E2, VU-11D1, BC4E549, VU-12E1, VU-3D1 y b-12. A este respecto un grupo adicionalmente preferido de anticuerpos son anticuerpos con un efecto aditivo especialmente fuerte, tales como por ejemplo A76-A/C7, VU-11E2 y VU-11D1. Según la invención se prefiere el anticuerpo A76-A/C7 para todas las aplicaciones, dado que presenta el efecto aditivo más fuerte. Un anticuerpo adicional, que sería adecuado para el procedimiento de producción según la invención, es el VU-4H5, que igualmente presenta un efecto aditivo fuerte, pero que por el contrario depende de la glicosilación de manera inversa con respecto a repeticiones en tándem con PDTR glicosilada más cortas (véase el ejemplo 4). En este grupo entran también otros anticuerpos con características de unión comparables.

El experto en la técnica conoce los métodos individuales usados en el procedimiento y se explican en los ejemplos a modo de ejemplo en detalle.

En un procedimiento según la invención se identifican y/o aíslan y se obtienen moléculas de MUC1 asociadas a

tumores mediante la unión a los anticuerpos descritos anteriormente.

Los métodos que se usan para la identificación son métodos en sí conocidos, por ejemplo ELISA, RIA, inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación, análisis de transferencia de Scatchard, análisis de FACS, análisis de MACS, inmunocitoquímica e inmunohistología. La mayoría de estos métodos se describen en detalle en los ejemplos.

Según el procedimiento según la invención, pueden obtenerse las moléculas de MUC1 descritas anteriormente a partir de sobrenadantes de cultivos celulares de células ZR-75-1 mediante una cromatografía de afinidad de uno o varios anticuerpos tal como se mostró anteriormente. A este respecto pueden combinarse etapas de purificación y/o concentración adicionales según métodos en sí conocidos con una o varias etapas de cromatografía de afinidad de los anticuerpos. De igual manera pudieron obtenerse moléculas de MUC1 asociadas a tumores a partir de células tumorales, tejidos tumorales o líneas celulares de tumor, anteponiendo una etapa adecuada según métodos en sí conocidos, que permite hacer accesible la MUC1 unida a membranas celulares o intracelular para la purificación por afinidad, por ejemplo mediante solubilización con detergentes adecuados o mediante separación de componentes de MUC1 extracelulares mediante proteólisis o mediante lisis celular. Se posibilita una purificación diferencial de las moléculas de MUC1 asociadas a tumores a partir de sobrenadantes de cultivos celulares y a partir de líquidos corporales separados de MUC1 asociadas a tumores unidas a membranas de células tumorales, tejidos tumorales o líneas celulares de tumor mediante una combinación de los métodos descritos anteriormente. A este respecto una etapa importante es la separación de sobrenadantes y células según métodos en sí conocidos por ejemplo mediante centrifugación. Para una producción de moléculas de MUC1 asociadas a tumores segregadas y constituyentes de membrana, se usa una combinación de ambos procedimientos, por ejemplo mediante purificación de los sobrenadantes de cultivos celulares con MUC1 constituyente de membrana solubilizada antes de etapas de cromatografía de afinidad correspondientes de anticuerpos adecuados. Moléculas de MUC1 asociadas a tumores según la invención son también aquellas que se purificaron o se purificaron previamente de manera adicional mediante etapas de cromatografía de afinidad adicionales con otros anticuerpos específicos frente a tumores, por ejemplo anticuerpos o lectinas frente a antígenos de hidratos de carbono asociados a tumores o específicos de tumores, por ejemplo el antígeno de Thomsen-Friedenreich, el antígeno Tn, el antígeno sialil-Tn o el antígeno de Lewis Y, para generar moléculas de MUC1 asociadas a tumores, que portan múltiples antígenos tumorales. Tales moléculas de MUC1 asociadas a tumores son ventajosas para la terapia tumoral, dado que respuestas inmunitarias, que se generan mediante las mismas contra el tumor, son más difíciles de evitar para mecanismos de huida del tumor.

Pueden producirse fragmentos de moléculas de MUC1 asociadas a tumores según métodos en sí conocidos antes o después de la cromatografía de afinidad de anticuerpos adecuados, por ejemplo mediante proteólisis enzimática o química, y purificarse mediante métodos en sí conocidos adecuados. A este respecto antes de una fragmentación puede realizarse una desglicosilación parcial, por ejemplo mediante una o varias etapas de desglicosilación enzimática, tales como por ejemplo una separación completa o parcial de ácidos siálicos mediante sialidasas, o una separación completa o parcial de unidades de fucosa mediante una o varias etapas de desglicosilación química, tales como por ejemplo según el método de TFMSA en sí conocido (tratamiento con ácido trifluorometilsulfónico).

Las moléculas de MUC1 asociadas a tumores y sus fragmentos pueden modificarse además según métodos en sí conocidos. Dentro de las modificaciones según la invención se encuentran a este respecto por ejemplo los cambios de la glicosilación en una o varias etapas, por ejemplo la glicosilación o desglicosilación enzimática con glicosiltransferasas y/o glicosidasas y/o desglicosilaciones químicas. Las modificaciones pueden llevarse a cabo antes o después de las etapas de cromatografía de afinidad de anticuerpos. Los fragmentos resultantes pueden purificarse o fraccionarse además mediante etapas de purificación y/o concentración adecuadas según métodos en sí conocidos. Modificaciones adicionales según la invención son acoplamiento con otras sustancias, por ejemplo aquellas que aumentan una respuesta inmunitaria frente a MUC1 sobre células tumorales y/o favorecen una aplicación para el tratamiento y/o la profilaxis de tumores y/o metástasis en el ser humano, por ejemplo el acoplamiento de las moléculas de MUC1 asociadas a tumores a moléculas portadoras, por ejemplo KLH, o a moléculas inmunoestimulantes, por ejemplo interleucina, GM-CSF, interferones y/o TNF-alfa, o aquellas que aumentan la estabilidad de las moléculas *in vivo* y durante el almacenamiento, o aquellas que aumentan una expresión, o aquellas que causan otras ventajas técnicas para la producción, tales como por ejemplo solubilidad. Los acoplamiento se llevan a cabo según métodos en sí conocidos, por ejemplo químicamente mediante espaciadores adecuados o bioquímicamente en forma de proteínas de fusión, que se expresan de manera recombinante en células (véase más abajo), por ejemplo interleucina 12 o péptido toxoide del tétanos.

Un procedimiento para la producción de moléculas de MUC1 asociadas a tumores es también la síntesis de glicopéptidos según métodos en sí conocidos, que se unen mejor a los anticuerpos descritos, que reconocen el epítipo tumoral de MUC1 que los glicopéptidos idénticos, que sin embargo no están glicosilados en la región PDTR. A este respecto puede ser ventajoso sintetizar moléculas de MUC1 asociadas a tumores completamente o en partes, que se obtuvieron mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente, y acoplarlas mediante uno o varios aminoácidos adicionales, por ejemplo cisteína o lisina y moléculas portadoras, con moléculas en sí conocidas, por ejemplo KLH. Un análisis completo o parcial se lleva a cabo mediante métodos en sí conocidos, por ejemplo el análisis de espectrometría de masas de fragmentación, por ejemplo PSD-MALDI-EM o ESI-EM/EM, o RMN o métodos inmunocitoquímicos.

Debido a esto se obtienen glicopéptidos de MUC1, glicopéptidos que se sintetizan según métodos en sí conocidos y se somete a prueba su unión a anticuerpos frente a MUC1. Los glicopéptidos de MUC1, que se unen a anticuerpos, que reconocen el epítipo tumoral de MUC1 descrito en el presente documento, y se unen mejor a los mismos que los glicopéptidos idénticos, que sin embargo no están glicosilados en la región PDTR, corresponden a los criterios según la invención para glicopéptidos de MUC1 (las características de unión mencionadas de estos anticuerpos ya se han explicado anteriormente en el punto ii)). Glicopéptidos de MUC1 preferidos son aquellos que se unen mejor mediante anticuerpos, que los glicopéptidos más cortos correspondientes con 1 ó 2 repeticiones en tándem pero con la misma glicosilación y en los mismos sitios de glicosilación (las características de unión mencionadas de estos anticuerpos ya se han explicado anteriormente en el punto iv)). En una variante preferida se usa la tecnología de chip de péptidos. A este respecto se produce un gran número de péptidos de MUC1, que están glicosilados en posiciones diferentes y/o de longitud diferente. Con ayuda de la unión de anticuerpos frente al epítipo tumoral de MUC1 descrito en el presente documento se obtienen aquellos glicopéptidos de MUC1 en el procedimiento HT (de alto rendimiento) que corresponden a los criterios según la invención para glicopéptidos de MUC1. En una variante adicionalmente preferida con el mismo método pueden obtenerse aquellos glicopéptidos de MUC1, que además son especialmente inmunógenos para epítipos de hidratos de carbono, sometiendo a prueba los chips de péptidos descritos anteriormente de manera adicional con anticuerpos anti-hidratos de carbono específicos para tumores e identificando aquellos glicopéptidos, que se unen a anticuerpos frente al epítipo tumoral de MUC1 según la invención y a anticuerpos frente al antígeno de hidratos de carbono específicos para tumores. Los procedimientos HT en principio se conocen para péptidos y pueden aplicarse para glicopéptidos.

Los procedimientos para la producción de estructuras, que portan de varias a muchas moléculas de MUC1 asociadas a tumores, se llevan a cabo según procedimientos en sí conocidos, por ejemplo mediante acoplamiento químico a liposomas o acoplamiento a lípidos y el almacenamiento posterior en liposomas o mediante acoplamiento a otras estructuras portadoras.

Tal como se explicará además a continuación, también podrían utilizarse células o líneas celulares, que portan o segregan o segregan y portan moléculas de MUC1 o sus fragmentos, que pueden producirse mediante los procedimientos descritos anteriormente, en los procedimientos según la invención. Los procedimientos para la producción de tales células incluyen la selección de células, que portan las moléculas de MUC1 asociadas a tumores mediante la unión a anticuerpos, que reconocen el epítipo tumoral (grupo 1, preferiblemente A76-A/C7). Para esto se usan métodos en sí conocidos. Por ejemplo las células con moléculas de MUC1 asociadas a tumores se obtienen mediante separación magnética con ayuda de partículas cargadas con los anticuerpos, que se unen a un imán (clasificación MACS) y se separan de aquellas células que no portan o portan cantidades reducidas de moléculas de MUC1 asociadas a tumores. Un ejemplo adicional es la obtención por clasificación, con ayuda de un clasificador de FACS, de las células, que portan los anticuerpos, que se marcaron de manera fluorescente. El experto en la técnica conoce ambos métodos. A este respecto es ventajoso, clonar las células obtenidas mediante la unión a anticuerpo mediante aislamiento (diluciones limitadas) en medios adecuados según métodos en sí conocidos, para obtener clones de células estables e identificar y seleccionar mediante la unión a anticuerpo, por ejemplo con ayuda de ELISA cuantitativo, según métodos en sí conocidos aquellos clones de células con ayuda de anticuerpos, que segregan, portan o portan y segregan una cantidad adecuada de MUC1 asociada a tumores (véase el ejemplo 5). Una parte del procedimiento de producción es a este respecto de manera preferida un ELISA de sándwich cuantitativo, que se explica a continuación en más detalle (procedimiento de prueba de ELISA de sándwich cuantitativo; véase el ejemplo 5). Un método alternativo, que también va a usarse de manera complementaria, es una determinación cuantitativa de las células positivas para MUC1 y de la cantidad de moléculas de MUC1 asociadas a tumores sobre las células mediante una determinación de FACS o un análisis de transferencia de Scatchard, que el experto en la técnica ya conoce, con ayuda de los anticuerpos descritos en el presente documento, que reconocen el antígeno tumoral de MUC1.

Las células o líneas celulares podrían usarse o bien en sí mismas como moléculas de MUC1 asociadas a tumores o bien a partir de las células según procedimientos descritos anteriormente se obtienen glicoproteínas, glicopéptidos o sus fragmentos segregados o constituyentes de la membrana o segregados y constituyentes de la membrana. También se producen lisados de células según métodos en sí conocidos, por ejemplo mediante congelación alternativa con nitrógeno líquido y descongelación.

Un procedimiento adicional para la producción de células o líneas celulares contiene además de los procedimientos descritos anteriormente una transformación de células con MUC1 recombinante. Para ello se seleccionan células o líneas celulares adecuadas y o bien se aumenta la expresión de MUC1, se expresan nuevas formas, por ejemplo fragmentos, de MUC1 o bien se expresa MUC1 *de novo* con el objetivo de obtener moléculas de MUC1 asociadas a tumores, o para obtener células, que portan o segregan más o mejores moléculas de MUC1 asociadas a tumores. Para ello se usa el gen de MUC1 o partes del mismo. Preferiblemente el gen de MUC1 comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de secuencias depositadas en el NCBI compuesto por: números de registro NM 002456, XM 053256, AF125525, AF348143, S81781, X80761, X69118, J05582 y M21868. Se prefieren aquellas partes del gen de MUC1, que codifican para versiones acortadas, que contienen una o varias repeticiones en tándem, en un vector de expresión adecuado clonado según métodos en sí conocidos y se introducen en la células, por ejemplo mediante electroporación. La selección de las células transformadas se lleva a cabo según métodos en sí conocidos por ejemplo mediante selección con antibióticos adecuados cuyas resistencias se codifican conjuntamente en el material genético introducido de manera recombinante (véase el ejemplo 5). Las células

transformadas de manera estable se clonan preferiblemente, tal como se describió anteriormente, por ejemplo mediante dilución limitante, preferiblemente en relación con un enriquecimiento de las células que expresan moléculas de MUC1 asociadas a tumores por ejemplo mediante FACS o MACS (véase el ejemplo 5).

5 En un procedimiento adicional las células o líneas celulares positivas para la molécula de MUC1 asociada a tumores, mediante transferencia de genes, pueden hacerse sensibles para el tratamiento con citostáticos, por ejemplo mediante la introducción del gen de HSV-TK, que lleva a que las células sean sensibles para un tratamiento con ganciclovir. La introducción de los genes y la selección de células transformadas se llevan a cabo según métodos en sí conocidos. Las células sensibles a ganciclovir se destruyen mediante ganciclovir según la invención o bien antes de su empleo en seres humanos o bien después de su aplicación a seres humanos. Este procedimiento permite el control de células o líneas celulares vivas aplicadas en el ser humano en el tratamiento de tumores y se aplicará alternativa o complementariamente para la irradiación de células con este fin (véanse también los usos según la invención).

10 En un procedimiento adicional pueden obtenerse moléculas de MUC1 asociadas a tumores a partir de tejidos, obteniendo la molécula de MUC1 asociada a tumores con ayuda de las técnicas descritas más arriba a partir de las membranas de las células. Para ello se abre el tejido según métodos en sí conocidos, para hacer accesibles las moléculas de MUC1 asociadas a tumores constituyentes de membrana, por ejemplo mediante métodos proteolíticos o mecánicos.

Los procedimientos se explican en más detalle en los ejemplos, sin embargo no se limitan a los mismos.

20 Con ayuda de los procedimientos de producción pueden obtenerse moléculas de MUC1 asociadas a tumores, que no son inmunosupresoras o lo son de manera reducida, y producirse una respuesta inmunitaria frente a la MUC1 de tumor nativa y frente a células tumorales. En el ejemplo 5 se muestra cómo las moléculas de MUC1 asociadas a tumores según la invención no actúan de manera inmunosupresora o lo hacen de manera reducida. Tales moléculas de MUC1 asociadas a tumores según la invención son inmunógenas y pueden generar una respuesta inmunitaria antitumoral.

25 A este respecto una parte del procedimiento de producción es preferiblemente un ELISA de tipo sándwich cuantitativo, en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-MUC1, se colocan células o MUC1 obtenidas a partir de sobrenadantes o preparaciones de membrana en diluciones adecuadas y se detecta mediante un segundo anticuerpo anti-MUC1. A este respecto, al menos un anticuerpo está dirigido frente a la molécula de MUC1 asociada a tumores descrita en el presente documento. El segundo anticuerpo está dirigido preferiblemente frente a un epítipo de MUC1, que no se encuentra en la región PDTR o frente a un epítipo de hidrato de carbono, por ejemplo antígeno de Thomsen-Friedenreich. Este ELISA de tipo sándwich cuantitativo es un procedimiento de prueba para la producción de moléculas de MUC1 asociadas a tumores, incluyendo células, así como un procedimiento de prueba para el diagnóstico.

30 Los anticuerpos frente a MUC1 ya se utilizan parcialmente en el diagnóstico y se han sometido a prueba para el tratamiento de tumores en la clínica. Sin embargo los anticuerpos específicos para MUC1 reconocen epítopos diferentes de MUC1, que presenta un gran número de epítopos diferentes y además, tal como se describió anteriormente, no es una molécula definida estructuralmente con precisión sino una mezcla heterogénea de moléculas, que se diferencia entre pertenecientes a tumor y pertenecientes a tejido normal, por ejemplo en la glicosilación. Así, hasta la fecha por ejemplo, en la clínica se ha sometido a prueba el HMFG-1, que no reconoce el epítipo tumoral de MUC1 descrito en el presente documento.

35 En este documento se muestra, qué anticuerpos son ventajosos debido a las características de unión para el tratamiento de tumores. Por consiguiente se posibilita la elección de anticuerpos más adecuados para el tratamiento de tumores en forma de un procedimiento de selección (ensayo de selección). Además se describe un procedimiento para la determinación de la idoneidad de anticuerpos para el tratamiento de tumores y para el diagnóstico y para el reconocimiento del epítipo tumoral. Este procedimiento comprende una combinación de pruebas bioquímicas, que se describen en los ejemplos 1 y 2 y preferiblemente también 3. Los anticuerpos, que presentan las características de unión definidas del grupo 1 o del ejemplo 4 en el procedimiento, son adecuados en el sentido de la invención, tal como se describió anteriormente. Con ayuda de este procedimiento también se caracterizan y se obtienen anticuerpos para la idoneidad de la determinación del epítipo tumoral de MUC1 descrito en el presente documento y para la caracterización, el aislamiento y la obtención de moléculas de MUC1 asociadas a tumores.

40 Además en el presente documento se describe un procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales especialmente adecuados para la terapia y el diagnóstico de enfermedades tumorales, dado que éstos en comparación con los anticuerpos sometidos a prueba hasta la fecha presentan un efecto aditivo especialmente fuerte. A este respecto se usa material de MUC1 en forma de moléculas, que se obtuvieron con los procedimientos según la invención, en un procedimiento para la inmunización de animales o seres humanos. La producción y caracterización de los anticuerpos se lleva a cabo a este respecto según métodos en sí conocidos con la inclusión de al menos uno de los sistemas de prueba descritos anteriormente. La especificidad de los anticuerpos se somete a prueba a este respecto para determinar los efectos aditivos especialmente altos.

De manera ventajosa los procedimientos según la invención posibilitan la producción o la identificación de moléculas de MUC1 asociadas a tumores, que en el ser humano pueden provocar una respuesta inmunitaria estimulante, y por consiguiente representan una sustancia de partida adecuada para vacunas frente a tumores, que producen MUC-1 asociada a tumores. La producción de estas moléculas de MUC1 se posibilita solo mediante los procedimientos según la invención. La invención se basa, entre otros, en la sorprendente observación, de que en anticuerpos frente a MUC1 asociada a tumores producidos en ratones, que presentan las características descritas anteriormente, en el grupo heterogéneo de moléculas de MUC1 asociadas a tumores pueden unirse de manera específica a aquéllas que en el ser humano pueden desencadenar una respuesta inmunitaria, tal como puede mostrarse por ejemplo con ayuda de ensayos en ratones NOD-SCID. Preferiblemente estas moléculas de MUC1 se caracterizan porque presentan un número elevado de epítomos con acción inmunoestimulante y un número reducido de o ningún epítomo inmunosupresor.

Las definiciones introducidas anteriormente de los términos también son aplicables para los términos en los a procedimientos descritos a continuación cambiando lo que se deba cambiar.

Además en el presente documento se describe un procedimiento para la identificación de una molécula de MUC1, que puede provocar una respuesta inmunitaria en el ser humano, que comprende:

a) poner en contacto una mezcla de moléculas de MUC1 con un anticuerpo que presenta las siguientes características:

i) la unión a la región inmunodominante de las repeticiones en tándem de MUC1; y

ii) la unión a un fragmento de MUC1, que tiene una longitud de entre 9 y 40 aminoácidos y contiene secuencias de las repeticiones en tándem de MUC1 y de la región inmunodominante, se posibilita o se aumenta mediante la glicosilación de la treonina de una secuencia PDTR; y

iii) la unión a repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas se aumenta, cuando las repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas están presentes en serie; y

iv) la unión a repeticiones en tándem de MUC1 glicosiladas múltiples que portan glicosilaciones en las treoninas de varias secuencias PDTR de la región inmunodominante, aumenta según un efecto aditivo con respecto a la longitud y la glicosilación de PDTR frente a fragmentos de MUC1 cortos según ii)

durante un periodo que es suficiente y en condiciones que son adecuadas, para que se forme un inmunocomplejo; e

b) identificación del inmunocomplejo.

Por el término "identificar" se entienden todas las medidas, mediante las que puede detectarse un inmunocomplejo. En el estado de la técnica se conocen métodos adecuados y comprenden por ejemplo ELISA, MACS, RIA, análisis de transferencia de Scatchard, inmunotransferencia de tipo Western, inmunocitoquímica, inmunohistología o procedimiento de FACS. A continuación también se describen con más detalle procedimientos adecuados.

En una forma de realización preferida los procedimientos según la invención comprenden además al menos una de las siguientes etapas:

1) obtención de la molécula de MUC1 o de la mezcla de la misma en la etapa (a) del procedimiento según la invención a partir de tejido tumoral, células tumorales y/o líquidos corporales que contienen moléculas de MUC1 asociadas a tumores, que se aisló/aislaron previamente;

2) obtención de la molécula de MUC1 o de la mezcla de la misma en la etapa (a) del procedimiento según la invención, células o líneas celulares, que expresan y/o segregan moléculas de MUC1 asociadas a tumores o mezclas de las mismas;

3) obtención de la molécula de MUC1 o de la mezcla de la misma en la etapa (a) del procedimiento según la invención a partir de células o líneas celulares recombinantes, que previamente se cambiaron mediante ingeniería genética de tal manera que expresan y/o segregan moléculas de MUC1 asociadas a tumores o mezclas de las mismas;

4) obtención de la molécula de MUC1 o de la mezcla de la misma en la etapa (a) del procedimiento según la invención a partir de lisados de células y/o del sobrenadante celular de tejidos tumorales, células tumorales y/o líquidos corporales tal como se describe en (1) o a partir de células o líneas celulares tal como se describe en (2) y (3), que contienen MUC1 asociada a tumores.

Pueden obtenerse tejidos tumorales o células tumorales adecuados a partir de pacientes con tumores o personas sin tumor, pudiendo ser necesario en el último caso un tratamiento adicional, tal como se describe en otra parte, mediante por ejemplo desglicosilación parcial antes de la purificación por afinidad.

Una forma preferida son moléculas de MUC1 asociadas a tumores en forma de glicoproteínas y glicopéptidos, que

se obtienen a partir del sobrenadante de células, que segregan moléculas de MUC1 asociadas a tumores en gran cantidad. En el procedimiento preferido se identificó y caracterizó una sublínea celular de la línea celular de carcinoma de mama ZR-75-1 con ayuda de técnicas de ELISA, análisis de FACS y pruebas inmunocitoquímicas como línea celular adecuada, que expresa moléculas de MUC1 asociadas a tumores sobre la superficie y se liberan (segregan) al sobrenadante de cultivo celular, véase también el ejemplo 5. Dado que la tasa de expresión de las células individuales es diferente, se produjeron a partir de la línea celular de partida mediante dilución limitante, clones (sublíneas), que portan y/o segregan cantidades aumentadas de manera estable de moléculas de MUC1 asociadas a tumores, véase también el ejemplo 5. En una etapa de procedimiento preferida adicional, para aumentar adicionalmente la expresión de las moléculas de MUC1 asociadas a tumores secretoras, el gen de MUC1 o partes del mismo en un vector de expresión y un procedimiento descrito en más detalle en el ejemplo 5 se integró en la célula. Se volvieron a clonar las células mediante diluciones limitantes en medios de cultivo adecuados. A partir de las sublíneas creadas, a partir del sobrenadante con ayuda de una cromatografía de afinidad DE A76-A/C7, se obtuvieron moléculas de MUC1 asociadas a tumores, que se utilizan en procedimiento en el tratamiento de tumores como agente antitumoral y en el diagnóstico de tumores.

En un procedimiento preferido adicional se produjeron fragmentos, a partir de las moléculas asociadas a tumores obtenidas, mediante proteólisis limitada con Clostripain según métodos en sí conocidos.

En un procedimiento preferido adicional se produjeron de manera sintética mediante métodos en sí conocidos glicopéptidos de MUC1 asociados a tumores. A este respecto se trata de glicopéptidos de MUC1, que se unen mediante anticuerpos, que reconocen el epítipo tumoral de MUC1 descrito en el presente documento y se unen mejor a los mismos que los glicopéptidos idénticos, que sin embargo no están glicosilados en la región PDTR. Glicopéptidos de MUC1 según la invención preferidos son aquéllos que se unen mejor mediante anticuerpos que los glicopéptidos más cortos correspondientes con 1 ó 2 repeticiones en tándem pero la misma glicosilación en los mismos sitios de glicosilación. Las características de unión correspondientes ya se explicaron anteriormente.

El procedimiento según la invención para su aplicación en seres humanos incluye formulaciones farmacológicas adecuadas, preferiblemente en combinación con adyuvantes y/o moléculas coestimulantes, tales como por ejemplo GM-CSF y en el caso de glicopéptidos de MUC1 más cortos un acoplamiento a KLH. A este respecto una variante preferida es la carga de células dendríticas o células, que presentan una función inmunoestimulante comparable a las células dendríticas, con lisados de células o la fusión de células, que portan la molécula de MUC1 asociada a tumores con células dendríticas según procedimientos en sí conocidos y la administración de estas células, preferiblemente tras la irradiación, a seres humanos según métodos en sí conocidos. El tratamiento con células dendríticas y glicopéptidos y/o glicoproteínas cargados se combinará preferiblemente, realizándose refuerzos más adelante preferiblemente con los glicopéptidos y/o las glicoproteínas según la invención en formulaciones farmacológicas según la invención adecuadas, preferiblemente con adyuvantes o moléculas coestimulantes (por ejemplo GM-CSF).

El uso preferido según la invención de los glicopéptidos y las glicoproteínas o células dendríticas cargadas con glicopéptidos y/o glicoproteínas es para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades tumorales positivas para MUC1, tales como por ejemplo carcinomas de mama, carcinomas de ovario, carcinomas de colon, carcinomas gastrointestinales, carcinomas de páncreas, carcinoma de pulmón, mieloma múltiple y a este respecto frente a tumores primarios, enfermedades tumorales residuales mínimas, metástasis y como tratamiento adyuvante. Preferiblemente se administran los glicopéptidos y las glicoproteínas o las células dendríticas cargadas con glicopéptidos y/o glicoproteínas según métodos en sí conocidos por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intrarrectal, por vía intraganglionar (ganglios linfáticos) o por vía sistémica.

Además en el presente documento se describe un procedimiento para la producción de células, que comprenden una molécula de MUC1, que puede provocar una respuesta inmunitaria en el ser humano, que comprende:

a) poner en contacto una mezcla de células, que comprenden moléculas de MUC1, con un anticuerpo que presenta las siguientes características:

i) la unión a la región inmunodominante de las repeticiones en tándem de MUC1; y

ii) la unión a un fragmento de MUC1, que tiene una longitud de entre 9 y 40 aminoácidos y contiene secuencias de la repetición en tándem de MUC1 y de la región inmunodominante, se posibilita o se aumenta mediante la glicosilación de la treonina de una secuencia PDTR; y

iii) la unión a repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas se aumenta, cuando las repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas están presentes en serie; y

iv) la unión a repeticiones en tándem de MUC1 glicosiladas múltiples que portan glicosilaciones en las treoninas de varias secuencias PDTR de la región inmunodominante, aumenta según un efecto aditivo con respecto a la longitud y la glicosilación de PDTR frente a fragmentos de MUC1 cortos según ii)

durante un periodo que es suficiente y en condiciones que son adecuadas, para que se forme un inmunocomplejo;

- b) aislar las células, que han formado un inmunocomplejo; y
- c) poner a disposición las células a partir del inmunocomplejo.

5 El término “células, que comprenden una molécula de MUC1, que puede provocar una respuesta inmunitaria en el ser humano”, comprende todas las células, que producen una molécula de MUC1 asociada a tumores tal como se describió anteriormente. Tales células son preferiblemente células, que pueden aislarse o producirse a partir de tejido tumoral, líneas celulares de tumor, o células o líneas celulares, que se cambiaron mediante ingeniería genética de tal manera que producen una molécula de MUC1 asociada a tumores tal como se describió anteriormente. Las células o líneas celulares mencionadas en último lugar pueden producirse mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Estos son por ejemplo procedimientos, mediante los que puede introducirse ADN foráneo de manera estable o transitoria en las células o líneas celulares. Procedimientos adecuados adicionales se describirán también a continuación en más detalle.

15 Por el término “aislar las células” se entienden todas las medidas para la separación de células, que mediante las moléculas de MUC1 asociadas a tumores producidas por las mismas han formado un inmunocomplejo con anticuerpos. El experto en la técnica conoce estos procedimientos. Preferiblemente para ello se utiliza el método de FACS o MACS. A continuación se describen en más detalle procedimientos adecuados adicionales.

Las definiciones introducidas anteriormente de los términos también pueden aplicarse para los términos en los procedimientos descritos a continuación cambiando lo que se deba cambiar.

Además en el presente documento se describe un procedimiento para la identificación de células, que comprenden una molécula de MUC-1, que puede provocar una respuesta inmunitaria en el ser humano, que comprende:

- 20 a) poner en contacto una mezcla de células, que comprenden moléculas de MUC1, con un anticuerpo, que presenta las siguientes características:

- i) la unión a la región inmunodominante de las repeticiones en tándem de MUC1; y

- 25 ii) la unión a un fragmento de MUC1, que tiene una longitud de entre 9 y 40 aminoácidos y contiene secuencias de las repeticiones en tándem de MUC1 y de la región inmunodominante, se posibilita o se aumenta mediante la glicosilación de la treonina de una secuencia PDTR; y

- iii) la unión a repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas se aumenta, cuando las repeticiones en tándem de MUC1 no glicosiladas están presentes en serie; y

- 30 iv) la unión a repeticiones en tándem de MUC1 glicosiladas múltiples que portan glicosilaciones en las treoninas de varias secuencias PDTR de la región inmunodominante, aumenta según un efecto aditivo con respecto a la longitud y la glicosilación de PDTR frente a fragmentos de MUC cortos según ii)

durante un periodo que es suficiente y en condiciones que son adecuadas, para que se forme un inmunocomplejo; e

- b) identificación del inmunocomplejo.

Preferiblemente los procedimientos descritos en el presente documento comprenden además al menos una de las siguientes etapas:

- 35 1) obtención de células, líneas celulares o sublíneas celulares, que portan y/o segregan moléculas de MUC1 asociadas a tumores, o mezclas de las mismas en la etapa (a) del procedimiento según la invención a partir de tejido tumoral o células tumorales, que contienen moléculas de MUC1 asociadas a tumores, que se aislaron previamente, con o sin clonación celular posterior;

- 40 2) obtención de células, líneas celulares o sublíneas celulares, que portan y/o segregan moléculas de MUC1 asociadas a tumores, o mezclas de las mismas en la etapa (a) del procedimiento según la invención a partir de células o líneas celulares que contienen moléculas de MUC1 asociadas a tumores, con o sin clonación de células posterior;

- 45 3) obtención de células, líneas celulares o sublíneas celulares, que portan y/o segregan moléculas de MUC1 asociadas a tumores, o mezclas de las mismas en la etapa (a) del procedimiento según la invención a partir de células o líneas celulares recombinantes, que se cambiaron por ingeniería genética anteriormente de tal manera que expresan y/o segregan moléculas de MUC1 asociadas a tumores o mezclas de las mismas, con o sin clonación de células posterior;

- 50 4) obtención de células, líneas celulares o sublíneas celulares, que portan y/o segregan moléculas de MUC1 asociadas a tumores, o mezclas de las mismas en la etapa (a) del procedimiento según la invención, que se cambiaron por ingeniería genética de tal manera que portan y/o segregan moléculas inmunoestimulantes, con o sin clonación de células posterior);

5) obtención de lisados de células o mezclas de lisados de células a partir de células, líneas celulares o sublíneas celulares tal como se describe de (1) a (4), que contienen MUC1 asociada a tumores.

Se prefiere especialmente el anticuerpo A76-A/C7 y formas recombinantes del mismo, tal como se describe en más detalle a continuación.

5 El anticuerpo A76-A/C7 reconoce el epítipo tumoral de MUC1 y presenta un efecto aditivo especialmente fuerte. Al contrario que el HMFG-1 existente en el desarrollo clínico, el A76-A/C7 según la invención presenta una serie de ventajas: el A76-A/C7 reconoce el epítipo tumoral de MUC1 según la invención y se produjo con ayuda de una línea celular de cáncer de mama desialilada (T47D) como inmunógeno. Por el contrario HMFG-1 no reconoce el epítipo tumoral de MUC1 según la invención y se produjo con ayuda de MUC1 a partir de leche humana como inmunógeno
 10 (véanse también los ejemplos 1 a 3). A76-A/C7 diferencia por ejemplo tejido claramente normal y adenomas benignos (negativo) de tumores de colon malignos tales como carcinomas *in situ*, carcinomas y metástasis (fuertemente positivo), mientras que HMFG-1 no presenta esta clara distinción. A76-A/C7 es un buen marcador sérico para el diagnóstico de tumores, mientras que HMFG-1 no es tan adecuado como marcador tumoral en suero. Además la afinidad del A76-A/C7 es un múltiplo mayor que HMFG-1. Por tanto A76-A/C7, en comparación con el
 15 HMFG-1 existente en el desarrollo clínico, es una clara mejora para aplicaciones según la invención.

Por lo demás, en el presente documento también se describe un procedimiento para la producción de un anticuerpo, que comprende:

- (a) realizar las etapas de los procedimientos de producción e identificación descritos más arriba;
- (b) introducir la molécula de MUC1, de la célula o de los lisados celulares en un animal; y
- 20 (c) poner a disposición un anticuerpo, que reconoce específicamente la molécula de MUC1 y que muestra un efecto aditivo especialmente fuerte.

En este contexto por la expresión "efecto aditivo especialmente fuerte" como tal se entiende que el aumento de la unión del anticuerpo frente a repeticiones en tándem con PDTR glicosilada múltiples tal como se describe en 4), en comparación con péptidos de MUC1 con PDTR glicosilada cortos, tal como se describe en 2), y ambos en
 25 comparación con péptidos de MUC1 cortos con PDTR no glicosilada es más fuerte que los aumentos de la unión de los anticuerpos A76-A/C7, VU-11E2, VU-11D1, BC4E549, VU-12E1, VU-3D1 y b-12 (o es comparable con los aumentos más fuertes de estos anticuerpos).

Las definiciones de los términos, que se realizaron anteriormente, se aplican cambiando lo que se deba cambiar a éstas formas de realización y las formas de realización siguientes.

- 30 Por el término "anticuerpos" se entiende:
- anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados, humanos
 - anticuerpos completos de distintos isotipos o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo fragmentos de anticuerpos monocatenarios (ScFv), fragmentos Fab, fragmentos de anticuerpos multivalentes (por ejemplo dia, tria, tetracuerpos), o fragmentos de anticuerpos de distintos formatos, también aquéllos que se usan como proteínas de
 35 fusión acoplados con otros péptidos o estructuras proteicas.
 - Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que junto a la especificidad según la invención para MUC1 presentan además una o varias especificidades adicionales, por ejemplo anticuerpos biespecíficos.
 - Moléculas, que en un sentido estricto no son anticuerpos, sin embargo presentan características de unión idénticas, como los anticuerpos según la invención, que portan el epítipo tumoral de MUC1, y/o portan partes de
 40 anticuerpos, por ejemplo regiones CDR o partes de las mismas, como por ejemplo anticuerpos u otras estructuras portadoras, que portan dominios de unión para la unión específica. La invención se refiere también a anticuerpos, que se derivan de los anticuerpos descritos en el presente documento y por ello reciben un efecto de unión aditivo, aumentan y/o se unen mejor frente a repeticiones en tándem con PDTR glicosilada múltiples que el anticuerpo de partida. Un derivado correspondiente del anticuerpo puede llevar a cabo mediante métodos en sí conocidos
 45 mediante modificaciones dirigidas o al azar del anticuerpo y se somete a prueba con ayuda de la unión comparativa a glicopéptidos de MUC1 correspondientes tal como se somete a prueba en los ejemplos 1 a 3.

La preparación de estos anticuerpos se lleva a cabo según técnicas en sí conocidas. Los anticuerpos pueden obtenerse como anticuerpos policlonales directamente del suero de los animales o ponerse a disposición mediante los procedimientos conocidos para la producción de anticuerpos monoclonales como tales (ejemplo 6).

50 Los anticuerpos producidos mediante el procedimiento descrito en el presente documento pueden usarse ventajosamente frente al epítipo tumoral de MUC1 para el tratamiento de enfermedades tumorales. Estos anticuerpos pueden utilizarse directamente en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades tumorales o acoplados a estructuras efectoras. Por estructuras efectoras se entienden según la invención aquellos compuestos químicos o bioquímicos, moléculas o átomos, que provocan directa o indirectamente una destrucción o un daño, incluyendo por

ejemplo ralentización del crecimiento o inhibición del crecimiento de células tumorales. A esto pertenecen por ejemplo: radioisótopos, toxinas, citostáticos y otras moléculas efectoras tales como por ejemplo citocinas y quimiocinas u otras estructuras, que presentan por sí mismas efectores o que se acoplan a las moléculas efectoras, por ejemplo con liposomas cargados con toxinas o citostáticos, que portan anticuerpos anti-MUC1. En el caso del último ejemplo se hace referencia precisamente a aquellas estructuras efectoras, que junto al anticuerpo anti-MUC1 para la especificidad tumoral también portan aquellas moléculas que son responsables para una recepción de las estructuras efectoras o partes de las mismas en las células, tales como por ejemplo anticuerpos frente a receptores, que provocan una endocitosis mediada por receptor y por consiguiente mejoran la recepción mediada por MUC1. La unión de los anticuerpos con las estructuras efectoras se lleva a cabo según métodos en sí conocidos. A este respecto los acoplamiento pueden llevarse a cabo por ejemplo directamente mediante carga covalente o no covalente, mediante acoplamiento químico, pudiendo ser necesaria una molécula química o biológica adicional, por ejemplo un quelante o un ligador, o en forma de proteínas de fusión, o péptidos mediante fusión.

Los anticuerpos se utilizan en el tratamiento de enfermedades tumorales con células tumorales que portan MUC1 o para la profilaxis, que impiden por ejemplo la formación de tumores primarios o metástasis. Un objetivo preferido es a este respecto el tratamiento de la enfermedad residual mínima y de metástasis. Los anticuerpos se administran a este respecto en una formulación adecuada una vez o varias veces en intervalos de tiempo y dosis adecuados. Una forma preferida son anticuerpos marcados radiactivamente. Una forma preferida adicional son dia, tira o tetracuerpos marcados radiactivamente. Formas preferidas adicionales son fragmentos de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos quiméricos marcados radiactivamente.

En procedimientos para el diagnóstico de tumores y el pronóstico se utilizan anticuerpos específicos para MUC1, que reconocen el epítipo tumoral descrito en el presente documento, en procedimientos en sí conocidos, para detectar MUC1 en suero o en preparados de tejido. A este respecto se detectan MUC1 libre, MUC1 presente en inmunocomplejos y MUC1 unido a células y se determina la existencia de las moléculas de MUC1 asociadas a tumores de manera cualitativa, de manera cuantitativa y/o en cantidades relativas según métodos en sí conocidos. Se utilizan los mismos procedimientos también para el control de la evolución de enfermedades tumorales y para el control de evoluciones del tratamiento. Los métodos usados en los procedimientos son en sí conocidos, por ejemplo ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, FACS (separación de células activada por fluorescencia), MACS (separación de células activada por magnetismo), ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), CDC (citotoxicidad dependiente de complemento), inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Un ejemplo de esto es el ELISA de tipo sándwich según la invención descrito más abajo con los anticuerpos allí descritos y en los métodos descritos en los ejemplos. En un procedimiento preferido se usan a este respecto anticuerpos comparativos, que reconocen el epítipo tumoral descrito en el presente documento, con aquellos anticuerpos que no reconocen el epítipo tumoral, para lograr una mejor diferenciación y evaluación. Esto sirve para el diagnóstico de tumores positivos para MUC1, la monitorización del desarrollo de la enfermedad tumoral y del pronóstico. La unión de los anticuerpos determina igualmente el porcentaje de MUC1 inmunosupresora, dado que MUC1, que se ha unido a anticuerpos frente al epítipo tumoral según la invención, no presenta inmunosupresión o presenta una inmunosupresión reducida y puede activar el sistema inmunitario en formulaciones adecuadas de manera específica frente a MUC1 de tumor.

En un procedimiento correspondiente se utilizan los anticuerpos, que reconocen el epítipo tumoral descrito en el presente documento y aquellos que se produjeron mediante el procedimiento según la invención, para un diagnóstico *in vivo*. Para ello se marcan los anticuerpos con procedimientos en sí conocidos adecuados y por consiguiente se hacen accesibles para procedimientos de obtención de imágenes en sí conocidos en el ser humano, por ejemplo radioinmunodiagnóstico, procedimiento PET-Scan o endoscopia inmunofluorescente, por ejemplo mediante acoplamiento y/o carga con moléculas correspondientes, por ejemplo isótopos radiactivos, por ejemplo indio, o colorantes fluorescentes por ejemplo Cy3, Cy2, Cy5 o FITC.

Además la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un fármaco que comprende las etapas de los procedimientos según la invención y además comprende la etapa de formular la molécula de MUC1 en una forma farmacéuticamente compatible.

Por el término "fármaco" se definen según la invención sustancias y preparaciones de sustancias, que están destinadas para curar, mitigar o impedir, mediante aplicación a o en el cuerpo humano, enfermedades, dolencias, trastornos corporales o molestias patológicas. Durante el procedimiento de producción según la invención se le pueden añadir a los compuestos identificados con los procedimientos según la invención excipientes médicos y/o de la técnica farmacéutica. Excipientes médicos son según la invención aquellas sustancias que se utilizan para la producción (como principios activos) de fármacos en un procedimiento según la invención. Los excipientes de la técnica farmacéutica sirven únicamente para la formulación adecuada del fármaco e incluso, siempre que sólo sean necesarios durante el procedimiento, pueden eliminarse posteriormente o pueden formar parte del fármaco como vehículos farmacéuticamente compatibles. A continuación se explican ejemplos para vehículos farmacéuticamente compatibles.

La formulación del fármaco tiene lugar dado el caso en combinación con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente compatible.

El experto conoce ejemplos de vehículos farmacéuticamente compatibles adecuados y comprenden soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como por ejemplo emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de detergentes, soluciones estériles, etc. Los fármacos que comprenden tales vehículos pueden formularse por medio de métodos convencionales conocidos. Estos fármacos pueden administrarse a un individuo en una dosis adecuada, por ejemplo en un intervalo de desde 1 µg hasta 100 mg por día y paciente. La administración puede tener lugar de diferentes maneras, por ejemplo directamente sobre la piel, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía intramuscular, localmente o por vía intradérmica. La administración de ácidos nucleicos puede producirse también en forma de terapia génica. El tipo de dosificación se determinará por el médico responsable de manera correspondiente a los factores clínicos. El experto conoce que el tipo de dosificación depende de diferentes factores, tal como por ejemplo la altura, la superficie corporal, la edad, el género o la salud general del paciente, pero también del agente especial que se administre, la duración y el tipo de la administración y de otros medicamentos, que puedan administrarse posiblemente en paralelo.

Los agentes antitumorales según la invención comprenden una sustancia farmacológica, que contiene una o varias moléculas de MUC1 asociadas a tumores según la invención, células que las comprenden o lisados celulares producidos a partir de estas células en una disolución o forma de administración adecuada. Éstos pueden administrarse solos o en combinación con uno o varios adyuvantes u otra sustancia adecuada para reforzar la acción. Como adyuvantes preferidos se usan QS-21, GPI-0100 u otras saponinas, emulsiones de agua-aceite tal como por ejemplo adyuvantes Montanide, polilisina, compuestos de poliarginina, compuestos de ADN tales como por ejemplo CpG, Detox, vacunas bacterianas tales como por ejemplo vacunas antitíficas o vacunas antituberculosas y se mezclan de una manera correspondientemente adecuada según métodos en sí conocidos con las moléculas de MUC1 asociadas a tumor y/o anticuerpos según la invención. La producción de los agentes antitumorales tiene lugar según métodos en sí conocidos. Según la invención, un agente antitumoral también es una combinación de 2 o más de los agentes antitumorales según la invención, así como una combinación con otras vacunas tumorales o tratamientos de tumores, tales como por ejemplo terapias con anticuerpos, quimioterapias o radioterapias que se administran o se aplican de manera adecuada simultáneamente o de manera separada en el tiempo. La producción de los agentes antitumorales tiene lugar según métodos en sí conocidos.

El uso según la invención de los agentes antitumorales es para el tratamiento de enfermedades tumorales positivas para MUC1, tales como por ejemplo carcinomas de mama, carcinomas de ovario, carcinomas de colon, carcinomas gastrointestinales, carcinomas de páncreas, carcinoma de pulmón, mieloma múltiple. El tratamiento también es válido como tratamiento adyuvante por ejemplo contra tumores primarios, enfermedades tumorales residuales mínimas, metástasis. El uso según la invención de los agentes antitumorales es igualmente para la profilaxis de enfermedades tumorales positivas para MUC1. La aplicación profiláctica va dirigida por ejemplo a una profilaxis del tumor así como de metástasis. Los agentes antitumorales se administran en una forma adecuada según métodos en sí conocidos. Una variante preferida es la inyección o administración de la vacuna tumoral por vía subcutánea, por vía intradérmica, sistémicamente, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intrarrectal, localmente en cavidades corporales, tal como por ejemplo el peritoneo, o de manera local directamente en órganos o ganglios linfáticos. Los tipos de administración también pueden combinarse preferiblemente, pudiendo administrarse en diferentes días de tratamiento o en un día de tratamiento. A este respecto, según la invención también pueden combinarse 2 o más de los agentes antitumorales según la invención o uno o varios agentes antitumorales según la invención con uno o varios agentes antitumorales o tratamientos de tumores, tales como por ejemplo terapias con anticuerpos, quimioterapias o radioterapias que se administran o aplican simultáneamente o de manera separada en el tiempo.

El procedimiento según la invención comprende también la producción de un agente antitumoral, que contiene una vacuna celular, que puede obtenerse cargando células dendríticas según métodos en sí conocidos con las moléculas de MUC1 asociadas a tumores según la invención y dado el caso una maduración posterior de las células. La vacuna celular así obtenida puede administrarse según métodos en sí conocidos. Por ejemplo, células dendríticas sin madurar se mezclan con moléculas de MUC1 asociadas a tumores según métodos en sí conocidos. Las células dendríticas absorben las moléculas de MUC1 asociadas a tumores, las procesan y presentan fragmentos de las mismas en su superficie en el contexto con moléculas MHC y moléculas coestimulantes. Tras una maduración adicional según métodos en sí conocidos, las células se aplican en una formulación adecuada al ser humano. Un ejemplo adicional es la carga de las células dendríticas maduras según métodos en sí conocidos de "pulsado". En el caso de las células dendríticas se trata de células dendríticas autólogas, alogénicas o semialogénicas o sus células precursoras o células a partir de líneas celulares, que presentan las propiedades funcionales de células dendríticas, que reciben *ex vivo* según métodos en sí conocidos de manera correspondiente el tratamiento adecuado para el desarrollo y la maduración. La producción de estas vacunas tumorales con células dendríticas adecuadas y moléculas de MUC1 según la invención tiene lugar según métodos en sí conocidos (véase el ejemplo 7). Según la invención, existe una variante adicional de los agentes antitumorales en una terapia con células T, en la que las células T reconocen las moléculas de MUC1 asociadas a tumores según la invención adecuadas, inclusive fragmentos de las mismas, o derivados procesados, que corresponden a las mismas mediante el procesamiento y la presentación *in vivo*, en el contexto con moléculas de clase de MHC y moléculas coestimulantes y se activan en la presentación a través de una célula presentadora de antígeno adecuada. La producción de tales terapias con células T tiene lugar según métodos en sí conocidos (véase el ejemplo 7).

En una forma de realización especialmente preferida del procedimiento se producen lisados celulares de células, que se enriquecieron para las moléculas de MUC1 asociadas a tumores en las células, y se utilizan en las aplicaciones descritas en el presente documento en el tratamiento y la profilaxis de tumores. El procedimiento según la invención para su aplicación al ser humano contiene formulaciones farmacológicas adecuadas, preferiblemente en combinación con adyuvantes y/o moléculas coestimulantes, tales como por ejemplo GM-CSF. Una variante preferida a este respecto es la carga de células dendríticas o células, que presentan una función inmunoestimulante como las células dendríticas, con lisados celulares y la administración de estas células, preferiblemente tras irradiación, al ser humano según métodos en sí conocidos. El tratamiento con células dendríticas cargadas y lisados celulares se combina preferiblemente, realizándose refuerzos posteriores preferiblemente con lisados celulares en formulaciones farmacológicas según la invención adecuadas, preferiblemente con adyuvantes o moléculas coestimulantes (por ejemplo GM-CSF).

El uso preferido de los lisados celulares o las células dendríticas cargadas con lisados celulares es para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades tumorales positivas para MUC1, tales como por ejemplo carcinomas de mama, carcinomas de ovario, carcinomas de colon, carcinomas gastrointestinales, carcinomas de páncreas, carcinoma de pulmón, mieloma múltiple, y a este respecto frente a tumores primarios, enfermedades tumorales residuales mínimas, metástasis y como tratamiento adyuvante. Preferiblemente, los lisados celulares o las células dendríticas cargadas con lisados celulares se administran según métodos en sí conocidos por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intrarrectal, por vía intraganglionar (ganglios linfáticos) o sistémicamente.

Las definiciones explicadas anteriormente de los términos también son aplicables para los términos en las formas de realización descritas a continuación cambiando lo que se deba cambiar.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de un agente de diagnóstico que comprende las etapas del procedimiento según la invención y que comprende además la etapa de formular la molécula de MUC-1 en una forma que pueda usarse desde el punto de vista de diagnóstico. Con el término "agente de diagnóstico" se definen según la invención sustancias y preparaciones a partir de sustancias, que están destinadas a reconocer mediante su aplicación a o en el cuerpo humano o partes del mismo enfermedades, dolencias, trastornos corporales o molestias patológicas. Como partes del cuerpo humano deben entenderse preferiblemente muestras de tejido corporal o líquidos corporales, tales como sangre, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo o esperma, o biopsias de tejido.

La formulación del agente de diagnóstico comprende preferiblemente la modificación de las moléculas de MUC1 producidas con sustancias que permiten detectar la molécula. En el estado de la técnica se conocen sustancias adecuadas. Partiendo de la elección de la sustancia, el experto puede tomar medidas adecuadas para la formulación del agente de diagnóstico.

Para el diagnóstico, según la invención también pueden acoplarse sustancias según métodos en sí conocidos a las moléculas de MUC1 asociadas a tumores, que facilitan una detección de los anticuerpos específicos para MUC1, por ejemplo mediante la biotinylación de las moléculas de MUC1 asociadas a tumores y posterior inmovilización sobre placas de ELISA.

En un procedimiento adicional según la invención para el diagnóstico y pronóstico de tumores se usan moléculas de MUC1 asociadas a tumores según la invención, que portan el epítipo tumoral, para la detección de anticuerpos anti-MUC1 en suero de seres humanos, que reconocen el epítipo tumoral. A este respecto, en un procedimiento preferido se usan de manera comparativa aquellas moléculas de MUC1 o fragmentos de las mismas, que portan el epítipo tumoral según la invención, con aquellos anticuerpos, que no portan el epítipo tumoral, para conseguir una mejor diferenciación y estimación. A este respecto, según la invención se detectan anticuerpos libres y anticuerpos presentes en complejos inmunitarios y se determinan sus especificidades con respecto al epítipo tumoral de MUC1 según la invención y preferiblemente otros epítipos en la MUC1, incluyendo antígenos de hidratos de carbono, de manera cualitativa, cuantitativa y/o en cantidades relativas según métodos en sí conocidos. Los mismos procedimientos se utilizan según la invención también para el control de la evolución de enfermedades tumorales y para el control de evoluciones del tratamiento inclusive de la monitorización de respuestas inmunitarias, por ejemplo respuestas de anticuerpos IgG e IgM frente a diferentes epítipos inclusive el epítipo tumoral de MUC1 en MUC1, para el control y la dosificación de tratamientos de tumores. Los métodos usados en los procedimientos son en sí conocidos, por ejemplo ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, FACS (separación de células activada por fluorescencia), MACS (separación de células activada por magnetismo), ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), CDC (citotoxicidad dependiente de complemento), inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Un ejemplo de esto son glicopéptidos acoplados a una molécula portadora o biotina inmovilizada en un ELISA, en el que se detecta la unión de anticuerpos anti-suero de ser humano mediante anticuerpo anti-IgG humana o anticuerpos anti-IgM humana de manera específica según un método de detección en sí conocido, se cuantifica y con ello se determina su especificidad. Un procedimiento de este tipo se emplea por ejemplo para determinar el título de anticuerpo natural de anticuerpos específicos para MUC1 en suero y a este respecto dividirlos en las diferentes especificidades. Esto es adecuado, por ejemplo, para el pronóstico de tumores de cáncer de mama. Las pacientes con un alto título de anticuerpos frente al epítipo tumoral de MUC1 según la invención tiene un pronóstico claramente mejorado con respecto a aquellas con un título más reducido frente al epítipo tumoral de MUC1 según la invención.

Las definiciones explicadas anteriormente de los términos también son aplicables para los términos en las formas de realización descritas a continuación cambiando lo que se deba cambiar.

5 Además, la presente invención se refiere al uso de una molécula de MUC1, a una célula, a un lisado celular o a un anticuerpo que puede obtenerse mediante un procedimiento según la invención para la producción de un fármaco para la prevención o el tratamiento de tumores.

Preferiblemente, el fármaco en el contexto del uso según la invención es una vacuna.

A partir de las explicaciones realizadas anteriormente, resulta que la presente invención se refiere además al uso de un anticuerpo que puede obtenerse mediante un procedimiento según la invención para la producción de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de tumores.

10 Finalmente, la presente invención comprende una molécula de MUC1 asociada a tumores purificada, que actúa de manera inmunoestimulante en el ser humano y puede obtenerse mediante un procedimiento según la invención.

15 El término "purificada" define una molécula de MUC1, tal como puede producirse mediante el procedimiento según la invención. Por tanto, una molécula de MUC1 asociada a tumores purificada comprende también un grupo de determinadas glicoproteínas de MUC1, que se caracterizan porque pueden desencadenar una respuesta inmunitaria en el ser humano, pero que tienen poca acción inmunosupresora o preferiblemente ninguna acción inmunosupresora. En los ejemplos a continuación también se describen propiedades funcionales y estructurales adicionales de la molécula de MUC1 purificada según la invención.

Las figuras muestran:

20 La figura 1 muestra ejemplos del patrón de unión de diferentes anticuerpos anti-MUC1. En total se definieron 4 patrones de comportamiento:

- 1) GD-1: Anticuerpos, que no se unen al motivo PDTR hasta su glicosilación (GD representa dependiente de la glicosilación). Ejemplo: A76-A/C7 (figura 1A).
- 2) GD-2: Anticuerpos, cuya unión se mejora mediante la glicosilación en el motivo PDTR. Ejemplo: VU-3D1 (figura 1B).
- 25 3) iGD: Anticuerpos, cuya unión se reduce o se impide mediante la glicosilación en el motivo PDTR (dependencia de la glicosilación inversa). Ejemplo: VU-4H5 (figura 1B).
- 4) GI: Anticuerpos, cuya unión a la región PDTR es independiente de su glicosilación (independiente de la glicosilación). Ejemplo: HMFG-1 (figura 1B).

30 La figura 2 muestra ejemplos de patrones de unión de anticuerpos anti-MUC1 con respecto a péptidos de MUC1 no glicosilados de diferente longitud (1-6 repeticiones en tándem).

Los resultados muestran que los anticuerpos, que se generaron mediante una inmunización de ratones con material tumoral,

- son dependientes de manera positiva de la glicosilación en la región PDTR de péptidos de MUC1 cortos (GD-1 y GD-2)
- 35 y
- son dependientes de manera positiva de la longitud creciente de péptidos de MUC1 no glicosilados y con ello del número de las repeticiones en tándem

los anticuerpos, que se generaron mediante una inmunización de ratones con material no tumoral,

- 40 - son independientes (GI) o dependientes de manera negativa (dependientes de manera inversa; iGD) de la glicosilación en la región PDTR de péptidos de MUC1 cortos (GI)
- o
- son independientes de la longitud de los péptidos de MUC1 y con ello del número de las repeticiones en tándem.

45 La figura 3 muestra 2 ejemplos de la unión de anticuerpos monoclonales específicos para MUC1 a péptidos de MUC1 glicosilados de diferente longitud (= diferente número de repeticiones en tándem).

La figura 4 muestra la unión del anticuerpo VU-4H5 a péptidos de MUC1 glicosilados de diferente longitud.

Figura 5A: Tinción inmunocitoquímica de células ZR-75-1 (1) y células de la sublínea celular (2) con el anticuerpo

A76-A/C7.

5 Figura 5B: Secreción de MUC1 positiva para A76-A/C7 de células ZR-75-1 sub y MCF-7. Se detectó la MUC1 secretada 3, 4, 5, 6 y 7 días tras la siembra de 10^5 células en el sobrenadante de cultivo celular mediante ELISA con los anticuerpos HMFG1 y A76-A/C7. Deben tenerse en cuenta las diferentes diluciones de los sobrenadantes de cultivos celulares.

Figura 5C: Vector de expresión para la integración del ADNc de MUC1 bajo el control del promotor de CMV en el genoma de ZR-75-1 así como la secuencia de ADNc de MUC1.

Figura 5D: Vector Rec site para la integración del sitio de recombinación en el genoma de ZR-75-1 y representación del método de integración.

10 Figura 5E: Análisis de SDS-gel de poli(acrilamida) de diferentes preparaciones de MUC1.

Figura 5F: Las MUC1 asociadas a tumores secretadas purificadas no muestran ningún efecto inmunosupresor sobre células T *in vitro*.

Figura 6: Estimulación de células T vírgenes con ayuda de células dendríticas eficaces cargadas con la MUC1 según la invención y su actividad antitumoral específica para MUC1 (para detalles véase el texto del ejemplo).

15 Ahora se ilustrará la invención mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos sirven exclusivamente a modo de explicación y no limitan el alcance de protección de la invención.

Ejemplo 1: Patrón de unión de diferentes anticuerpos anti-MUC1 a un péptido de MUC1 en función de la glicosilación del motivo PDTR

20 Se sometieron a prueba anticuerpos monoclonales anti-MUC1 (ratón) en un inmunoensayo enzimático (ELISA) para determinar su capacidad de unión frente a péptidos y glicopéptidos de MUC1 sintéticos con la siguiente secuencia: biotina-APPAHGVTSA PDTR(GalNAc)RPAPGSTAPP AHGVTSA. Como control sirvió el mismo péptido, pero no glicosilado. Se inmovilizaron los antígenos sobre placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina (BioTeZ, Berlín) en una concentración de 0,5 µg/ml (100 µl/pocillo). Tras lavar tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% se aplicaron diversos anticuerpos anti-MUC1 purificados en series de dilución y se incubaron durante 2 h a 37°C. Como
25 segundo anticuerpo sirvió anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón marcado con peroxidasa (Dako, Hamburgo) en una dilución de 1:4000 (1,5 h, 37°C). Tras lavar tres veces se reveló la placa con orto-fenilendiamina y se detuvo la reacción cromática con ácido sulfúrico 2,5 N. Se midió la DO a 492 nm.

La figura 1 muestra ejemplos del patrón de unión de diferentes anticuerpos anti-MUC1. En total se definieron 4 patrones de comportamiento:

- 30 1) GD-1: Anticuerpos, que no se unen al motivo PDTR hasta su glicosilación (GD representa dependiente de la glicosilación). Ejemplo: A76-A/C7 (figura 1A).
- 2) GD-2: Anticuerpos, cuya unión se mejora mediante la glicosilación en el motivo PDTR. Ejemplo: VU-3D1 (figura 1B).
- 35 3) iGD: Anticuerpos, cuya unión se reduce o se impide mediante la glicosilación en el motivo PDTR (dependencia de la glicosilación inversa). Ejemplo: VU-4H5 (figura 1B).
- 4) GI: Anticuerpos, cuya unión a la región PDTR es independiente de su glicosilación (independiente de la glicosilación). Ejemplo: HMFG-1 (figura 1B)

40 La tabla 1 contiene una visión general del patrón de unión de un panel de anticuerpos monoclonales anti-PDTR(MUC1) con péptidos de MUC1 con PDTR glicosilada y no glicosilada. La tabla se divide en dos subtablas (A) y (B). La tabla 1A contiene anticuerpos, que se realizaron mediante una inmunización con MUC1 a partir de material tumoral. La tabla 1B contiene anticuerpos, que se realizaron mediante una inmunización con MUC1 a partir de material no tumoral.

Tabla 1:

45 Anticuerpos frente a la región PDTR inmunodominante de la MUC1: Patrón de unión con respecto a péptidos de MUC1 con PDTR glicosilada y no glicosilada en función del tipo del inmunógeno

A. MUC1 a partir de material tumoral

Anticuerpo	Inmunógeno	Patrón de unión			
		GD-1	GD-2	iGD	GI
A76-A/C7	línea celular tumoral T-47D	+			

VU-11E2	línea celular tumoral ZR75-1	+			
VU-11D1	línea celular tumoral ZR75-1	+			
Ma552	línea celular tumoral ZR75-1		+		
VU-3C6	línea celular tumoral ZR75-1		+		
BC4E549	preparación de membrana de la línea celular tumoral T-47D			+	
VU-12E1	línea celular tumoral ZR75-1			+	
VU-3D1	línea celular tumoral ZR75-1			+	
b-12	mezcla de varias líneas celulares tumorales			+	
B27.29	MUC1 de ascitis tumoral			+	
MF 06	MUC1 de quiste ovárico			+	

B. Péptidos de MUC1 (sin glicosilar) o preparaciones a partir de material no tumoral

Anticuerpo	Inmunógeno	Patrón de unión			
		GD-1	GD-2	iGD	GI
VU-4H5	de 60-meros, conjugado con BSA			+	
HMPV	HMFG de leche materna			+	
HMFG-1	HMFG de leche materna				+
BC2	HMFG de leche materna				+
VA2	proteína de fusión de 100-meros				+
Mc5	HMFG de leche materna				+
E29	HMFG de leche materna				+
BC3	HMFG de leche materna				+
214D4	péptido de MUC1 (proteína de fusión)				+
BCP8	péptido de MUC1				+
VA1	proteína de fusión de 100-meros				+
C595	MUC1 de orina				+
BC4W154	HMFG de leche materna		+		

Ejemplo 2: Unión de anticuerpos específicos para MUC1 frente a la región PDTR inmunodominante a péptidos de MUC1 no glicosilados de diferente longitud (repeticiones en tándem múltiples no glicosiladas)

Se inmovilizaron los péptidos de MUC1 de la siguiente secuencia con diferente longitud (oligomerización)

5 [VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG]_n; n = 1-6

en una concentración de 0,5 µg/pocillo en tampón de recubrimiento a 37°C durante la noche sobre una placa de microtitulación TC de 96 pocillos mediante adhesión. Se lavaron las placas (PBS/Tween 20 al 0,05%) y a continuación se incubaron durante 2 h con 50 µl/pocillo de anticuerpo purificado en una concentración de 10 µg/ml. Tras lavar tres veces se incubó la placa con anticuerpo policlonal de conejo anti-suero de inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa (P260, Dako) en una dilución de 1:2000. Tras lavar tres veces se reveló la placa con o-fenilendiamina y se detuvo la reacción cromática con ácido sulfúrico 2,5 N. Se determinó la DO a 492 nm.

10

Se mantuvo constante el número de las repeticiones en tándem por mezcla básica en los experimentos porque de todos los péptidos comparados se utilizaron las mismas cantidades en peso por pocillo.

Los resultados se resumen en la tabla 2:

15 La clasificación se llevó a cabo según la relación de la DO de 100-meros/20-meros = X tal como sigue:

Sin unión destacable al de 20-meros, sin embargo una unión clara al de 100-meros: grupo LD1 (absolutamente dependiente de la longitud)

X > 3,0 : grupo LD2 (muy dependiente de la longitud)

X = 1,5 - 3,0 : grupo LD3 (moderadamente dependiente de la longitud)

20

X < 1,5 : grupo LI (independiente de la longitud)

Además en la tabla se han recogido también los datos sobre la dependencia de la glicosilación de la tabla 1 para su comparación.

Tabla 2:

25 Patrón de unión de anticuerpos monoclonales anti-MUC1 frente al motivo PDTR inmunodominante: Patrón de unión con respecto a péptidos de MUC1 con PDTR glicosilada y no glicosilada en función del tipo del inmunógeno y con péptidos de MUC1 no glicosilados de diferente longitud (1-6 repeticiones en tándem).

Patrón de unión de anticuerpos en función de:

A. MUC1 a partir de material tumoral

	Glicosilación				Longitud			
	GD-1	GD-2	iGD	GI	LD-1	LD-2	LD-3	LI
A76-A/C7	+				+			
VU-11E2	+				+			
VU-11D1	+				+			
Ma552		+			+			
VU-3C6		+			+			
BC4E549		+				+		
VU-12E1		+				+		
VU-3D1		+					+	
b-12		+					+	
B27.29		+					+	
MF 06		+					+	

B. Péptidos de MUC1 (sin glicosilar) o preparaciones a partir de material no tumoral

	Glicosilación				Longitud			
	GD-1	GD-2	iGD	GI	LD-1	LD-2	LD-3	LI
VU-4H5			+			+		
HMPV			+			+		
HMFG-1				+		+		
BC2				+		+		
VA2				+		+		
Mc5				+		+		
E29				+			+	
BC3				+			+	
214D4				+			+	
BCP8				+			+	
VA1				+			+	
C595				+				+
BC4W154		+						+

5 La figura 2 muestra ejemplos de patrones de unión de anticuerpos anti-MUC1 con respecto a péptidos de MUC1 no glicosilados de diferente longitud (1-6 repeticiones en tándem).

Ejemplo 3: Unión de anticuerpos específicos para MUC1 a repeticiones en tándem múltiples con PDTR glicosilada

Se inmovilizaron glicopéptidos de MUC1 sintéticos del tipo:

[AHGVTAPDT(GalNAc)RPAPGSTAPPA]_n; n = 1-5

10 en una concentración de 0,5 µg/pocillo en agua a 4°C durante la noche sobre una placa de microtitulación TC de 96 pocillos mediante adhesión. Se lavaron las placas (PBS con Tween 20 al 0,05%) y a continuación se incubaron durante 2 h con 50 µl/pocillo de una disolución de 10 µg/ml de anticuerpo purificado en PBS/BSA a 37°C. Tras lavar tres veces se incubó la placa con anticuerpo policlonal de conejo anti-suero de inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa (Dako) en una dilución de 1:2000 durante 1,5 h a 37°C. Tras lavar tres veces se reveló la placa con orto-fenilendiamina y se detuvo la reacción cromática con ácido sulfúrico 2,5 N. Se midió la DO a 492 nm.

15 Se mantuvo constante el número de las repeticiones en tándem por mezcla básica en los experimentos porque de todos los glicopéptidos comparados se utilizaron las mismas cantidades en peso por pocillo.

La figura 3 muestra 2 ejemplos de la unión de anticuerpos monoclonales específicos para MUC1 a péptidos de MUC1 glicosilados de diferente longitud (= diferente número de repeticiones en tándem).

Tabla 3:

20 Patrón de unión de anticuerpos monoclonales anti-MUC1 frente al motivo PDTR inmunodominante: Patrón de unión con respecto a péptidos de MUC1 con PDTR glicosilada y no glicosilada de diferente longitud (1-6 repeticiones en tándem) en función del tipo del inmunógeno.

Patrón de unión de anticuerpos en función de:

A. Inmunógeno: MUC1 a partir de material tumoral

	Glicosilación				Longitud				Longitud con glicosilación
	GD-1	GD-2	iGD	GI	LD-1	LD-2	LD-3	LI	
A76-A/C7	+				+				+
VU-11E2	+				+				+
VU-11D1	+				+				(+)
Ma552		+			+				-
VU-3C6		+			+				-
BC4E549		+				+			(+)
VU-12E1		+				+			(+)
VU-3D1		+					+		(+)
b-12		+					+		(+)
B27.29		+					+		-
MF 06		+					+		-

B. Inmunógeno:

Péptidos de MUC1 (sin glicosilar) o preparaciones a partir de material no tumoral

	Glicosilación				Longitud				Longitud con glicosilación
	GD-1	GD-2	iGD	GI	LD-1	LD-2	LD-3	LI	
VU-4H5			+			+			+
HMPV			+			+			(+)
HMFG-1				+		+			-
BC2				+		+			-
VA2				+		+			-
Mc5				+		+			-
E29				+			+		-
BC3				+			+		-
214D4				+			+		-
BCP8				+			+		-
VA1				+			+		-
C595				+				+	-
BC4W154		+						+	(+)

5 Los resultados muestran que la mayoría de los anticuerpos, que se generaron mediante una inmunización de ratones con material tumoral, son positivos en función de la longitud creciente de glicopéptidos de MUC1 con PDTR glicosilada. Esto corresponde a un efecto aditivo de los anticuerpos con respecto a la glicosilación de PDTR y a la longitud con repeticiones en tándem múltiples. Un subgrupo (A76-A/C7, VU-11E2, VU-11D1) muestra un efecto aditivo especialmente fuerte porque la unión de los anticuerpos a glicopéptidos de MUC1 con varias repeticiones en tándem con PDTR glicosilada en comparación con la unión a glicopéptidos de MUC1 con PDTR glicosilada cortos (tal como en el ejemplo 1) así como en comparación con la unión a péptidos de MUC1 no glicosilados con varias repeticiones en tándem (tal como en el ejemplo 2) está claramente aumentada hasta un múltiplo (véase la figura 3A).
10 Los anticuerpos con un efecto de unión aditivo presentan una afinidad especialmente alta con respecto a MUC1 de tumor natural, que está compuesta por repeticiones en tándem múltiples.

15 Los anticuerpos, que se generaron mediante una inmunización de ratones con material no tumoral, y que son independientes de la glicosilación de PDTR, no muestran por regla general ningún efecto aditivo, tampoco cuando las uniones con respecto a péptidos de MUC1 no glicosilados son dependientes de la longitud (LD-3 y LD-2).

La figura 3B muestra un ejemplo de una unión de anticuerpo sin efecto aditivo.

Los anticuerpos VU-4H5 y HMPV, que muestran una unión iGD, muestran un efecto aditivo, que se describe más detalladamente en el ejemplo 4 como caso especial.

20 Ejemplo 4: Unión de anticuerpos específicos para MUC1 del grupo GI a glicopéptidos con PDTR glicosilada con repeticiones en tándem múltiples.

La metodología correspondió a la descrita en el ejemplo 3.

25 Los resultados muestran que la unión del anticuerpo VU-4H5 del grupo GI es dependiente del número de las repeticiones en tándem por glicopéptido de MUC1. Este resultado es sorprendente, dado que este anticuerpo prácticamente no se une a péptidos de MUC1 con DTR glicosilada cortos. Sin embargo, se une mejor de manera creciente a glicopéptidos de MUC1 con DTRP glicosilada con un número creciente de repeticiones en tándem. Este anticuerpo muestra un efecto aditivo similar al descrito en el ejemplo 3 y adopta con ello una posición intermedia, y hace que sea útil igualmente en el sentido de la invención para las diversas aplicaciones.

La figura 4 muestra la unión del anticuerpo VU-4H5 a péptidos de MUC1 glicosilados con diferente número de repeticiones en tándem.

Ejemplo 5A) Producción de MUC1 inmunoestimulante, que porta el epítipo tumoral de MUC1, para vacunación

a) Identificación de células humanas, que expresan intensamente MUC1 con el epítipo tumoral

5 Se cultivaron células ZR-75-1 (ATCC: CRL 1500) en medio RPMI con un 10% de FKS y un 1% de glutamina a 37°C, un 8% de CO₂ y un 95% de humedad del aire. Estas células ya expresan, en comparación con otras líneas celulares, grandes cantidades de la proteína con el epítipo tumoral sobre la superficie celular. La figura 5A muestra tinciones inmunocitoquímicas de las células ZR-75-1 con el anticuerpo A76-A/C7. La tinción inmunocitoquímica se realizó añadiendo gota a gota células sobre un portaobjetos, que entonces se inmovilizaron mediante incubación en el incubador de cultivo celular en una cámara húmeda durante 30 min y a continuación a temperatura ambiente durante 15 min sobre el portaobjetos. Se fijaron las células en formalina al 5% en PBS durante 5 min. Tras lavar tres veces con PBS se incubaron las células durante 1,5 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, que se diluyó 1:5 en forma de un sobrenadante de cultivo de hibridoma. Tras lavar de nuevo tres veces con PBS se añadió el anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón acoplado a Cy3, Dianova) en una dilución de 1:1000 y se incubó durante 30 min más a temperatura ambiente. La inclusión tras lavar de nuevo tres veces tuvo lugar en disolución de Mowiol (Calbiochem, Heidelberg, Alemania). Como control negativo se utilizó el anticuerpo isotípico anti-IgG MOPC-21 (Sigma). La tinción inmunocitoquímica de las células ZR-75-1 con A76-A/C7 puso de manifiesto que la población celular no era homogénea con respecto a la expresión del epítipo tumoral (figura 5A1). Para aumentar la expresión y para obtener una población de células ZR-75-1 positiva para A76-A/C7 homogénea, se seleccionaron las células ZR-75-1 positivas para A76-A/C7 a través de perlas magnéticas y a continuación se clonaron mediante dilución limitada aquellos clones que portan una expresión especialmente intensa y homogénea de moléculas adecuadas de MUC1. La selección tuvo lugar mediante la unión de 10⁷ células y el anticuerpo A76-A/C7 (50 µl del sobrenadante de cultivo de hibridoma) y anticuerpos anti-IgM acoplados a perlas magnéticas así como columnas de EM de Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Alemania) en condiciones estándar (MACS; véase la descripción de producto de las columnas de EM). Se clonaron las células seleccionadas mediante dilución limitada, ajustando las células a un título celular de desde 150 hasta 300 células por 15 ml de medio de cultivo. Se distribuyeron 100 µl de esta dilución sobre una placa de microtitulación, de modo que se cultivan 1-2 células por pocillo. Esta distribución sobre la placa de microtitulación se comprueba al microscopio. De esta manera pudieron aislarse sublíneas ZR-75-1, que expresan el epítipo tumoral de manera homogénea y más intensa, tal como muestra la tinción inmunocitoquímica en la figura 5A2.

La figura 5B muestra que la proteína MUC1 en comparación con otras líneas celulares (por ejemplo: MCF-7) también se libera en grandes cantidades al medio de cultivo celular. Éste es el resultado de análisis de ELISA con el HMFG-1 (clon 1.10.F3, Beckman/Coulter) como anticuerpo de captura y el A76-A/C7 como anticuerpo de detección (figura 5B). Las muestras para este ELISA se obtuvieron sembrando 10⁵ células por ml de medio de cultivo celular, cultivándolas 3 días en condiciones estándar (véase anteriormente), tomando a continuación cada día una alícuota y separando el sobrenadante de cultivo celular mediante la centrifugación del sedimento celular. Se utilizaron 50 µl de estos sobrenadantes sin diluir o en las diluciones indicadas (figura 5B) en el ELISA. Se realizó el ELISA de tipo sándwich de HMFG-1-A76-A/C7, recubriendo las placas de microtitulación con el anticuerpo de captura HMFG-1, diluido 1:250 en PBS (sin indicaciones de concentración del fabricante), durante la noche en 50 µl de PBS por "pocillo" a 4°C. A continuación se bloquearon las placas recubiertas dos veces con Tween 20 al 0,1% en PBS a temperatura ambiente. Se retiró el tampón de bloqueo y se lavaron las placas de nuevo tres veces con tampón de lavado, para añadir entonces 50 µl de las muestras, sin diluir o en las diluciones indicadas con medio de cultivo celular, a cada "pocillo" e incubar durante 1,5 h a temperatura ambiente. Como control negativo se substituyó el anticuerpo primario mediante medio de cultivo celular o BSA al 2%, Tween 20 al 0,1% en PBS. Tras lavar tres veces con tampón de lavado se añadió el anticuerpo A76-A/C7 purificado por afinidad, biotinilado, en una dilución de 1:500 y se incubó durante 1 h más a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo tres veces tuvo lugar la unión de estreptavidina acoplada a peroxidasa del rábano (*horseradish-peroxidase*) (diluida 1:500) durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron las placas dos veces en tampón de lavado y una vez en PBS. La reacción cromática tuvo lugar en 50 µl de tampón acetato 50 mM pH 6,0 con TMB 1 mg/ml (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, disolución madre: 100 mg/ml en DMSO, Sigma) y H₂O₂ al 0,025% (Sigma) durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción cromática mediante la adición de 25 µl de ácido sulfúrico 2,5 N (concentración final 0,07 N) y se midió en el lector de ELISA a 450 nm con un filtro de referencia de 620 nm.

Se analizó la glicosilación de la MUC secretada en el ELISA con ayuda de diferentes anticuerpos. A este respecto, en comparación con el ELISA tipo sándwich de HMFG-1-A76-A/C7 descrito anteriormente se cambió el anticuerpo A76-A/C7 por anticuerpos que se unen a los hidratos de carbono asociados con tumores Tn (HB-1, Dako, Glostrup, Dinamarca) o TF (A78-G/A7, U. Karsten *et al.*, 1995) con alta afinidad. La detección de los anticuerpos secundarios (HB-1 y A78-G/A7) tuvo lugar con un anticuerpo anti-IgM de ratón acoplado a POD (diluido 1:5000). La reacción cromática se realizó en ácido cítrico 25 mM, tampón fosfato pH 5,0 con un 0,04% de H₂O₂ y 0,4 mg/ml de o-fenilendiamina (Sigma) durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 2,5 N (concentración final 0,07 N) y se midió en el lector de ELISA a 490 nm con un filtro de referencia de 630 nm. Pudieron detectarse los epítipos de hidratos de carbono asociados a tumores Tn y TF, el

último sólo tras tratamientos con neuraminidasa de la MUC1.

b) Sobreexpresión de moléculas de MUC1 asociada a tumores secretora

5 La sobreexpresión de la MUC1 secretora se consigue mediante la integración del ADNc de MUC1, cuya expresión se encuentra bajo el control de un promotor fuerte (figura 5C) en una posición en el genoma de las células ZR-75-1, que es especialmente activa desde el punto de vista de la transcripción. En primer lugar se transfectaron las células con el vector Rec site, que tras la integración de Rec site en el genoma, lo que se consiguió mediante la selección de antibióticos, proporciona una expresión estable del gen LacZ. Las células transfectadas de manera estable se clonaron mediante dilución limitada (véase el párrafo siguiente) y se identificaron aquellas células que mostraban la actividad LacZ más intensa. Estas células permitían la integración del ADNc de MUC1 con el promotor de CMV a través de Rec site en una posición activa desde el punto de vista de la transcripción en el genoma (figura 5D). Se amplificó el ADNc de MUC1 mediante RT-PCR a partir de células ZR-75-1 y se clonó mediante restricción en el vector de expresión.

Clonación celular mediante dilución limitada

15 Se realizó la clonación celular mediante dilución limitada ajustando las células a un título celular de desde 150 hasta 300 células por 15 ml de medio de cultivo. Se distribuyeron 100 μ l de esta dilución sobre una placa de microtitulación, de modo que se cultivaron 1-2 células por pocillo. Esta distribución sobre la placa de microtitulación se comprueba al microscopio.

c) Purificación de la MUC1 secretora

20 Se purificó la MUC1 secretora a partir de varios litros de sobrenadante de cultivo celular con ayuda de una columna de cromatografía de afinidad A76-A/C7 en condiciones estándar. El análisis de la proteína purificada dio como resultado en SDS-gel de poli(acrilamida) varias bandas, que migraron conjuntamente con una preparación de MUC1 obtenible comercialmente (figura 5E).

Ejemplo 5B) Influencia de la activación de células T mediante MUC1 secretora purificada, que porta el epítipo tumoral de MUC1

25 Con ayuda de la MUC1 asociada con tumores secretada purificada con A76-A/C7 se incubó con células T enriquecidas (véase anteriormente) junto con PBL irradiadas. Las células T y PBL procedían de dos pacientes diferentes, de modo que se provocó una reacción alogénica, que se detectó por medio de la proliferación de células T en el ensayo de BrdU (véase anteriormente). En presencia de MUC1 asociada a tumores secretada purificada no se estableció ninguna indicación de un efecto inmunosupresor de MUC1 en esta "reacción leucocitaria mixta". Por el contrario, en la concentración más elevada pudo observarse un efecto estimulante claro. Las sustancias de referencia eran PBS o mucina submaxilar bovina (BSM) 10 μ g/ml (figura 5F).

Ejemplo 6

Producción de un anticuerpo monoclonal con ayuda de MUC1 inmunoestimulante purificada con A76-A/C7, que presenta un efecto de unión aditivo especialmente intenso.

35 1. Origen de las células de partida

a) Se obtuvieron las células de bazo en condiciones estériles (Laminarbox) de un ratón hembra inmunizado según el punto 2 de la línea consanguínea Balb/c.

40 b) Como línea celular de fusión se empleó X63-Ag8.653 (línea celular de plasmocitoma de Balb/c; Kearney *et al.*, J. Immunol 123:1548-1550, 1979). Se mantuvieron en medio RPMI 1640 con adición de suero bovino fetal inactivado al 10% y β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M.

c) Como células alimentadoras sirvieron células peritoneales de ratones Balb/c del mismo origen que en a). Se extrajeron en condiciones estériles según la metodología publicada el día antes del experimento de fusión o de la clonación y se sembraron en placas de microtitulación de cultivo celular (Karsten, en: Friemel, Immunologische Arbeitsmethoden, 4ª ed., Jena 1991, págs. 309-320).

45 2. Inmunización

Como inmunógeno sirvieron 100 μ g de MUC1 que se obtuvo mediante cromatografía de afinidad con A76-A/C7 (véase el ejemplo 5). Se aplicó i.p. MUC1 en PBS con adyuvante incompleto de Freund y 5 semanas y 9 semanas más tarde se reforzó en cada caso con la MUC1 purificada con A76-A/C7.

3. Generación de los hibridomas

50 Se realizó la técnica del hibridoma según los métodos convencionales publicados (Peters *et al.*, Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung, Berlín 1985). La fusión tuvo lugar 4 días tras el último refuerzo. Como

agente de fusión su utilizó PEG. La selección de los hibridomas tuvo lugar por medio de azaserina/hipoxantina; para apoyar el crecimiento se usaron células peritoneales de ratón.

5 Se sometieron a prueba los hibridomas generados por medio de ELISA en MUC1, glicopéptidos de MUC1 inmovilizados y en pruebas de inmunofluorescencia en líneas celulares positivas para MUC1 (por ejemplo células T-47D, células ZR-75-1 y sublíneas celulares) para determinar la secreción de anticuerpos específicos. Las clonaciones tuvieron lugar por medio de dilución limitante según técnicas convencionales en presencia de células peritoneales de ratón (Karsten, en: Friemel, Immunologische Arbeitsmethoden, 4^a ed., Jena 1991, págs. 309-320). Se determinaron los isotipos por medio de un kit de ELISA para isotipos comercial (Pharmigen).

Ejemplo 7: Investigaciones con respecto a la citotoxicidad específica de tumores

10 a) Identificación y generación de una subpoblación de células MCF-7 humanas, que expresan intensamente MUC1 con el epítipo tumoral

15 Se cultivaron células MCF-7 (ATCC: HTB-22), tal como se describe en detalle en el ejemplo 5 para ZR75-1, y se aislaron a partir de las células con ayuda de perlas magnéticas con células A76-A/C7 y a continuación se clonaron mediante dilución limitada aquellos clones que portan una expresión especialmente intensa y homogénea de moléculas de MUC1 adecuadas. De esta manera pudieron aislarse sublíneas MCF-7, que expresan el epítipo tumoral de manera homogénea y más intensa que la línea de partida.

b) Generación de células Nemod-mDC maduras cargadas con lisados de MCF-7

20 Como células dendríticas se produjeron células dendríticas eficaces (documento DE 10139428.4) a partir de células NemodDC-1, que procedían de MUTZ-3. Se diferenciaron células dendríticas eficaces mediante la diferenciación a partir de células NemodDC-1 (células precursoras, prec-NemodDC) a células dendríticas sin madurar (i-NemodDC), se cargaron con antígeno y a continuación se maduraron para dar células dendríticas eficaces maduras (m-NemodDC), que pueden activar las células T específicas de antígeno. I-NemodDC, que se cargan con antígenos, las captan, las procesan y presentan fragmentos peptídicos de los antígenos en el contexto de sus moléculas de clase de MHC, por ejemplo MHC I-A2. Con ayuda de estas células dendríticas eficaces pueden estimularse células tanto T
25 cooperadoras como CTL específicas a partir de células T vírgenes, así como estimularse células NKT y expandirse.

30 Se diferenciaron 4×10^6 células prec-Nemod-DC en 40 ml de volumen de reacción en α MEM + FCS al 20% + CM5637 al 10% con 1000 U/ml de GM-CSF, 1000 U/ml de IL-4 y 2,5 ng/ml de TNF α durante 7 días. A continuación se cargaron las células (i-NemodDC) durante 6 h con una cantidad adecuada de lisado de células tumorales de las células MCF-7 descritas anteriormente, que se produjo mediante múltiples congelaciones y descongelaciones
35 alternas con ayuda de nitrógeno líquido, y a continuación se maduraron con TNF α durante 24 h más, se irradiaron (30 Gy) y se utilizaron para la estimulación de linfocitos T.

c) Aislamiento de células T CD8+ por medio de microperlas

35 Se purificaron células T CD8+ de donantes positivos para HLA-A2 a través de un aislamiento MACS con ayuda de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo (Miltenyi, información de producto del fabricante) según procedimientos conocidos a partir de PBMC de preparaciones Buffy Coat convencionales.

d) Generación de células T citotóxicas (CTL)

40 Se estimularon los linfocitos T CD8+ (1×10^6 linfocitos T CD8+/ml) de un donante positivo para HLA-A2 semanalmente con m-NemodDC cargadas con lisado de células tumorales (lisados MCF7) (razón 1:10) en medio (AIM V + 10 U/ml de IL- 2 a partir del día 7) (Prime + Restimulation).

e) Prueba de citotoxicidad

45 En primer lugar se lavaron las células diana (MCF-7, LS 174 T y T2), que se encuentran en un estado vital y fisiológicamente estable, en medio frío (DMEM + FCS al 5%) y tras la centrifugación (300 x g, 7 min, TA) se absorbieron en tampón europeo (HEPES 50 mM, cloruro de sodio 93 mM, cloruro de potasio 5 mM, cloruro de magnesio 2 mM, DTPA 10 mM, acetato de europio III 2 mM). A este respecto se pasaron 5×10^6 células diana a un volumen de 800 μ l en una cubeta de electroporación (d = 4 mm). Antes y tras la electroporación tuvo lugar un tiempo de incubación de 6 a 10 minutos sobre hielo. La electroporación se realizó con un multiporador Eppendorf (30 μ s, 710 V o 1100 V y 1 pulso). Tras lavar 5 veces con medio, la célula diana marcada está disponible para su uso en la prueba de citotoxicidad. A este respecto se utilizó o bien directamente tras la determinación de la vitalidad y densidad celular (MCF-7 o LS 174 T) o bien se marcó para la investigación de células efectoras específicas para
50 péptidos durante 2 horas más con péptido (A2-péptido de MUC1: por ejemplo LLLLVTLT; HIV-gag A2-péptido irrelevante; en cada caso 5 mg/ml) (células T2). Para la prueba de citotoxicidad se dispusieron previamente células diana marcadas (de 5×10^3 a 10^5) en un volumen de 100 μ l/depresión en una placa de microtitulación con fondo redondo. A continuación se añadieron células efectoras, igualmente en un volumen de 100 μ l, en diferentes concentraciones celulares, de modo que se obtuvo como resultado una razón de célula efectora con respecto a
55 célula diana de desde 1,25:1 hasta 100:1. Además de estas mezclas básicas se aplicaron muestras para la

determinación de la señal de fondo (BR), de la liberación espontánea y máxima. La señal de fondo consistía en una muestra de medio libre de células al inicio del ensayo. La liberación espontánea (SR) da información sobre la estabilidad del marcaje de la célula diana con europio. Para la determinación se cultivaron células diana marcadas sin células efectoras y tras la finalización del tiempo de incubación se determinó la concentración del europio liberado. Se determinó la liberación máxima (MR) mediante células diana marcadas, que se incubaron igualmente sin células efectoras, pero con un reactivo artificial (en este caso con etanol con una pureza del 50%), a lo largo de la duración de la prueba y se llevaron hasta lisis total. Mediante las magnitudes definidas anteriormente se calculó la proporción porcentual de liberación espontánea, que para la valoración de una prueba como satisfactoria debería encontrarse por debajo del 30%. Además se caracterizó la proporción porcentual de la actividad citotóxica específica de la célula efectora.

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

$$\% \text{de liberación específica} = \frac{\text{Célula efectora / diana}(\text{recuentos}) - SR(\text{recuentos})}{MR(\text{recuentos}) - SR(\text{recuentos})} \times 100$$

Tras el tiempo de incubación de 4 horas se separó mediante la centrifugación de la placa de microtitulación (500 x g, 5 min, TA) el sobrenadante de cultivo que contenía europio. A continuación se pasaron 20 µl de este sobrenadante de cultivo a una placa de microtitulación con fondo plano en la que se dispusieron previamente 200 µl de disolución de potenciación/depresión y se incubó durante 15 min más en un agitador de placas. Durante este tiempo de incubación se genera a partir del quelato de europio-DTPA, con formación de un quelato de europio-NTA, un complejo fluorescente. Se midieron las muestras en un fluorímetro con retardo de tiempo (Victor², PerkinElmer), a una longitud de onda de 613 nm.

En el ensayo se usó MCF-7 como célula diana relevante (figura 6, MCF7) y LS 174 T (figura 6, LS174T) como célula diana irrelevante. Además se usaron células T2, que no pueden procesarse y sólo pueden cargarse mediante A2-péptidos definidos en sus moléculas MHC de clase I A2. A este respecto se usó un A2-péptido de MUC1 para someter a prueba una estimulación eficaz de células T originariamente vírgenes, que están dirigidas específicamente contra MUC1, con ayuda de la molécula de MUC1 según la invención, que en el presente ejemplo están presentes en lisados celulares correspondientes, (T2 + MUC1). Como control negativo se usó un HIV-gag A2-péptido (T2 + HIV).

Los datos muestran que con ayuda de las moléculas de MUC1 según la invención puede generarse en un lisado celular una respuesta inmunitaria citotóxica específica para MUC1 frente a células, que portan MUC1 en la superficie en el contexto de HLA-A2. Estos datos inmunológicos muestran que las moléculas de MUC1 según la invención pueden usarse tanto como tales para la activación de una respuesta antitumoral eficaz como en forma de células dendríticas, que se cargaron con las moléculas de MUC1 según la invención. Además, los datos muestran que las células T específicas para MUC1 pueden expandirse y activarse de manera específica *ex vivo* con ayuda de las moléculas de MUC1 y células dendríticas según la invención, con lo que se muestra idoneidad para terapias con células T adoptivas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Nemod AG
- <120> procedimiento para la producción de una MUC1 inmuoestimulante
- <130> G 1623 PCT S3
- <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 1721
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 524 442 T3

gaattccctg gctgcttgaa tctgttctgc cccctcccca cccatttcac caccaccatg 60
 acaccgggca cccagtctcc tttcttctctg ctgctgctcc tcacagtgtt tacagttggt 120
 acaggttctg gtcattgcaag ctctacccca ggtggagaaa aggagacttc ggctaccag 180
 agaagttcag tgcccagctc tactgagaag aatgctgtga gtatgaccag cagcgtactc 240
 tccagccaca gccccggttc aggctcctcc accactcagg gacaggatgt cactctggcc 300
 ccggccacgg aaccagcttc aggttcagct gccacctggg gacaggatgt cacctcggtc 360
 ccagtcacca ggccagccct gggctccacc accccgccag cccacgatgt cacctcagcc 420
 ccggacaaca agccagcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc 480
 ccggacacca ggccgcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc 540
 ccggacacca ggccgcccc gggctccacc gcccccccag cccacggtgt cacctcggcc 600
 ccggacacca ggccgcccc gggctccacc gcccccccag cccatggtgt cacctcggcc 660
 ccggacaaca ggccccctt ggcgtccacc gccctccag tccacaatgt cacctcggcc 720
 tcaggctctg catcaggctc agcttctact ctggtgcaca acggcacctc tgccagggct 780
 accacaacc cagccagcaa gagcactcca ttctcaattc ccagccacca ctctgatact 840
 cctaccacc ttgccagcca tagcaccaag actgatgcca gtagcactca ccatagcacg 900
 gtacctctc tcacctctc caatcacagc acttctcccc agttgtctac tggggtctct 960
 ttctttttcc tgtcttttca catttcaaac ctccagttta attcctctct ggaagatccc 1020
 agcaccgact actaccaaga gctgcagaga gacatttctg aaatgttttt gcagatttat 1080
 aaacaagggg gttttctggg cctctccaat attaagttca ggccaggatc tgtggtggta 1140
 caattgactc tggccttccg agaaggtacc atcaatgtcc acgacgtgga gacacagttc 1200
 aatcagtata aaacggaagc agcctctcga tataacctga cgatctcaga cgtcagcgtg 1260
 agtgatgtgc catttccttt ctctgcccag tctggggctg ggtgcccagg ctggggcatc 1320
 gcgctgctgg tgctggtctg tgttctgggt gogctggcca ttgtctatct cattgccttg 1380
 gctgtctgtc agtgccgccc aaagaactac gggcagctgg acatctttcc agcccgggat 1440
 acctaccatc ctatgagcga gtaccccacc taccacacc atgggcgcta tgtgccccct 1500
 agcagtaccg atcgtagccc ctatgagaag gtttctgcag gtaatggtgg cagcagcctc 1560
 tcttacacaa acccagcagt ggcagccact tctgccaact ttaggggca cgtcgcctc 1620
 tgagctgagt ggccagccag tgccattcca ctccactcag ggctctctgg gccagtcctc 1680
 ctgggagccc ccaccacaac acttcccagg catggaattc c 1721

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para la producción de una molécula de MUC1, que puede provocar una respuesta inmunitaria estimulante en el ser humano, que comprende:
 - 5 (a) poner en contacto una mezcla de moléculas de MUC1 a partir del sobrenadante de células ZR-75-1 con el anticuerpo A76-A/C7 durante un periodo, que es suficiente y en condiciones, que son adecuadas, para que se forme un inmunocomplejo;
 - (b) aislar el inmunocomplejo; y
 - (c) poner a disposición la molécula de MUC1 a partir del inmunocomplejo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se usa cromatografía de afinidad.
- 10 3. Procedimiento para la producción de un fármaco que comprende las etapas del procedimiento según la reivindicación 1 o 2 y que comprende además la etapa de formulación de la molécula de MUC1 en una forma farmacéuticamente compatible.
4. Uso de una molécula de MUC1 inmunoestimulante que puede obtenerse mediante un procedimiento según la reivindicación 1 o 2 para la producción de un fármaco para el tratamiento o la prevención de tumores.
- 15 5. Molécula de MUC1 inmunoestimulante que puede obtenerse mediante un procedimiento según la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento o la prevención de tumores.
6. Molécula de MUC1 purificada, que actúa de manera inmunoestimulante en el ser humano y que puede obtenerse mediante un procedimiento según la reivindicación 1 o 2.

Figura 1A

Unión del Acm A76-A/C7 (tipo GD-1) a una MUC1 de 30-meros en función de la glicosilación en el motivo PDTR

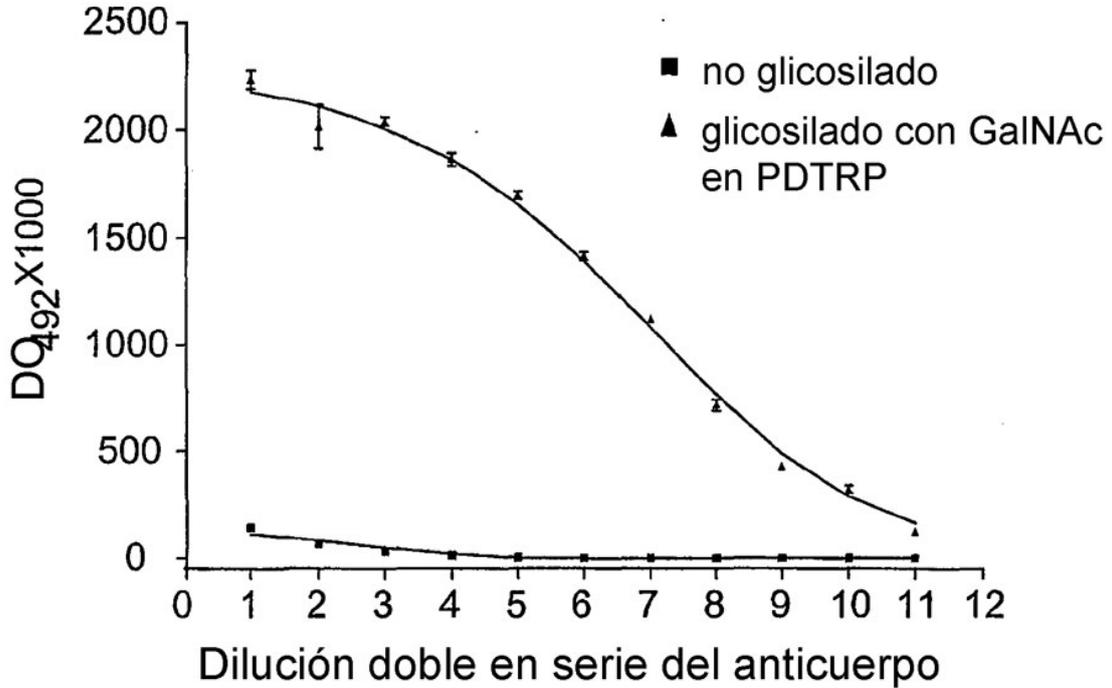


Figura 1B

Patrón de unión de Acm frente a MUC1 del epítipo con GalNAc:
 VU-3C6 (tipo GD-2), VU-4H5 (tipo iGD),
 HMFG-1 (tipo GI)

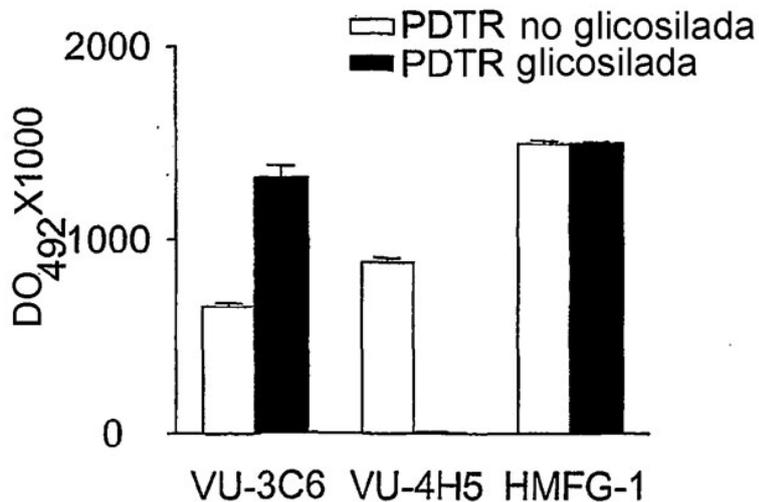


Figura 2

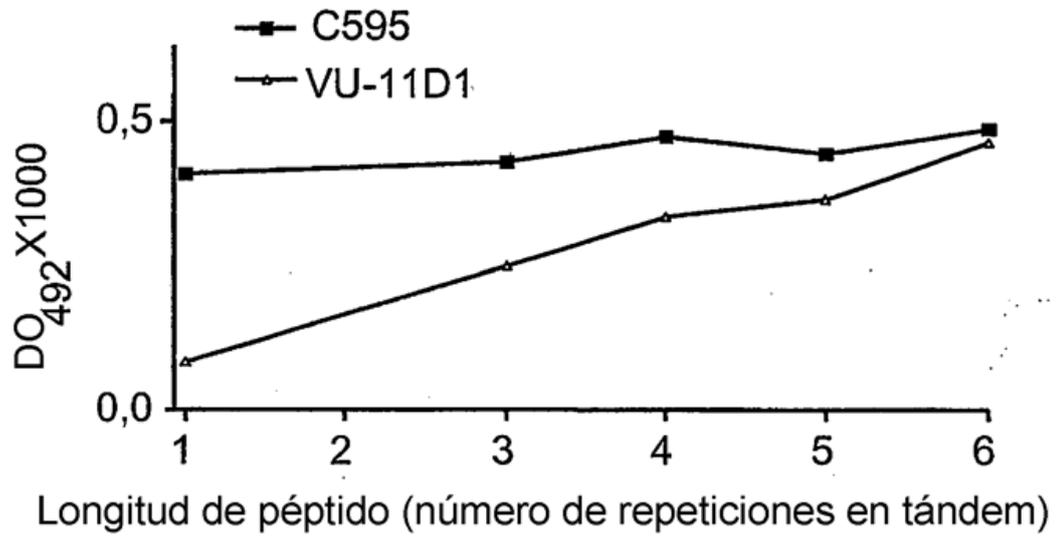


Figura 3A

Unión del Acm A76-A/C7 a péptidos de MUC1 glicosilados de diferente longitud (1-5 repeticiones en tándem) (glicosilados con Tn en el motivo PDTR)

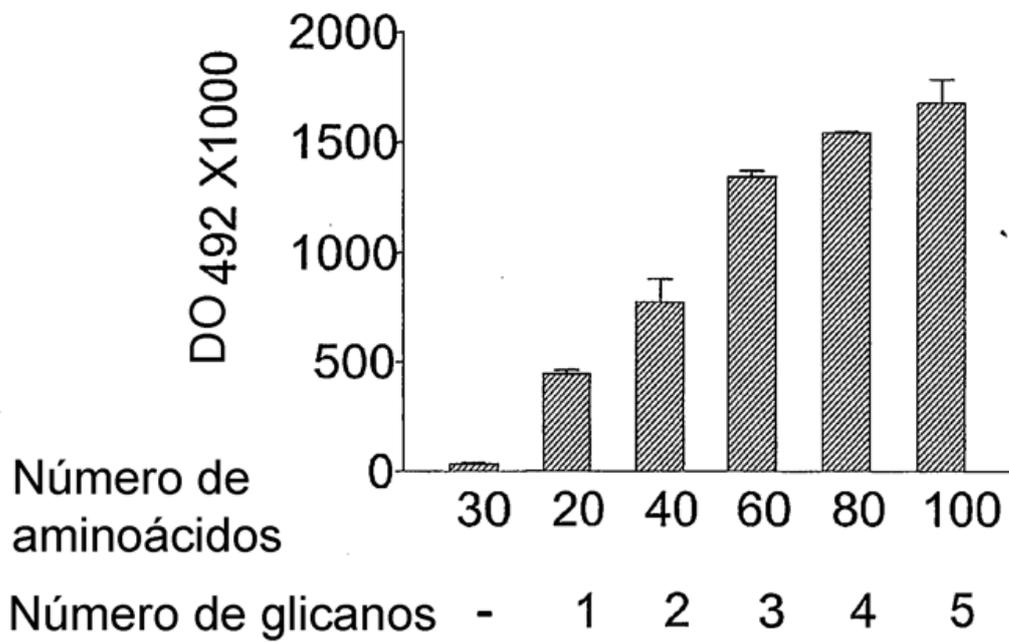


Figura 3B

Unión del Acm Mc5 a péptidos de MUC1 glicosilados de diferente longitud (1-5 repeticiones en tándem) (glicosilados con Tn en el motivo PDTR)

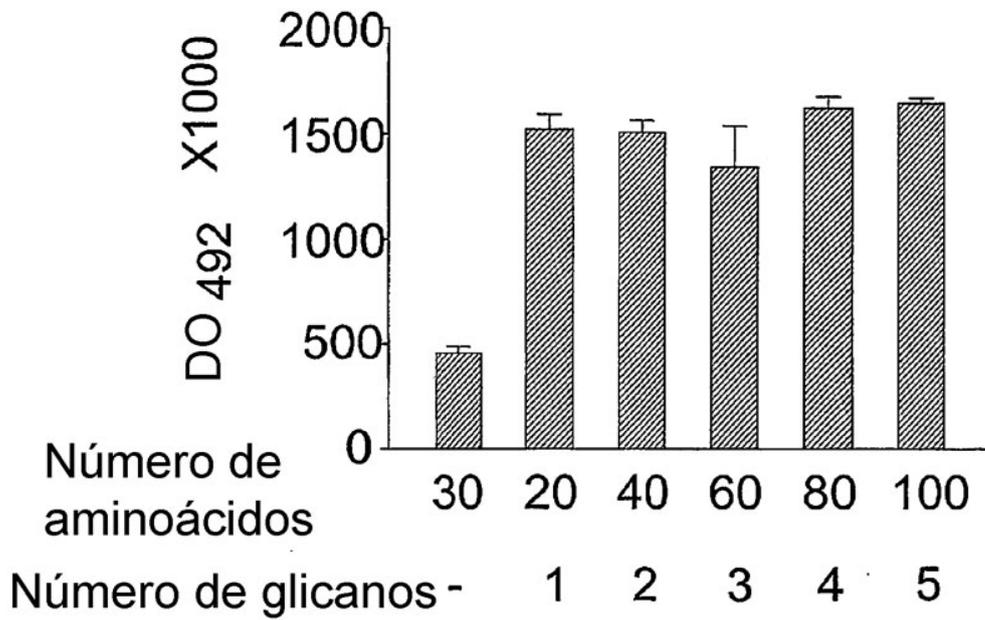


Figura 4

Unión del Acm VU-4H5 a péptidos de MUC1 glicosilados de diferente longitud (1-5 repeticiones en tándem) (glicosilados con Tn en el motivo PDTR)

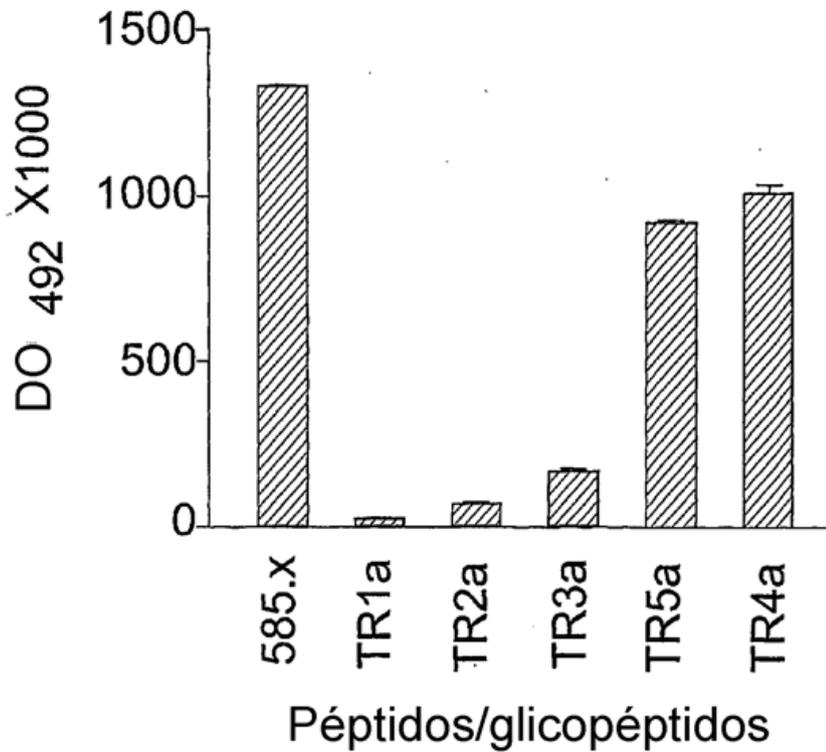


Figura 5A

- 1) Células ZR-75-1 antes del enriquecimiento mediante A76-A/C7 y clonación

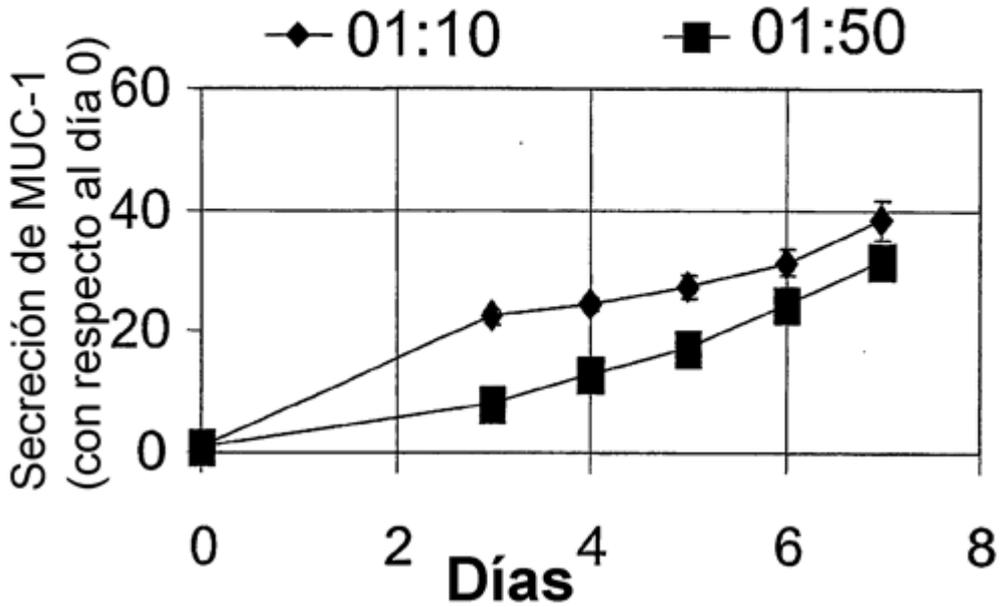


- 2) Células ZR-75-1 después del enriquecimiento mediante A76-A/C7 y clonación (ZR-75-1-sub)



Figura 5B

ZR-75-1 sub



MCF-7

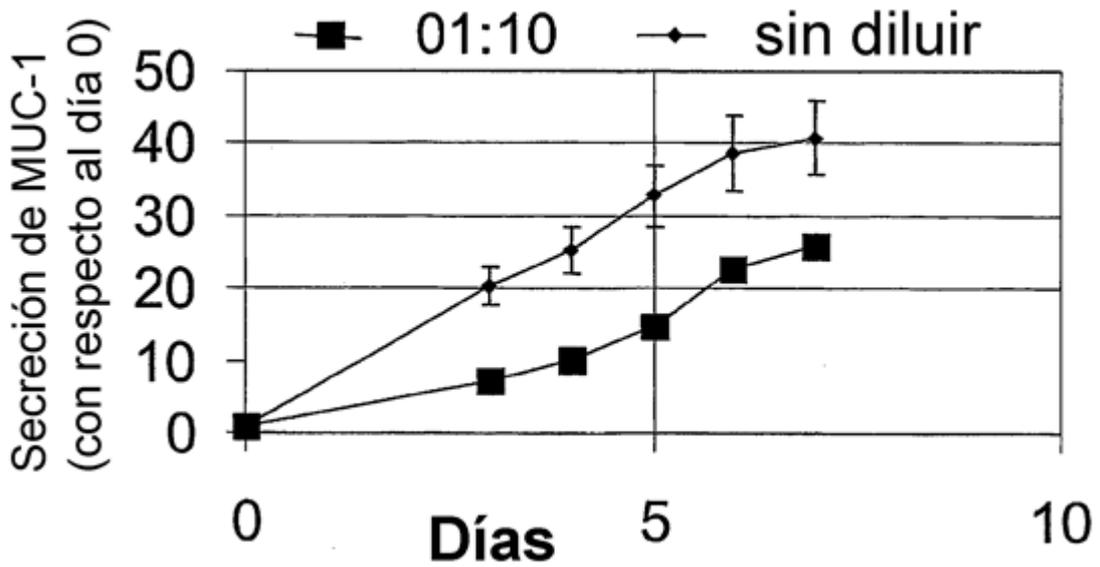
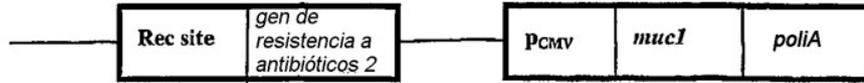


Figura 5C (1)

A. Vector de expresión



B. Secuencia de ADNc de muc1 humanas, que se clonaron en el vector de expresión. Están marcados en verde los cebadores que se usaron para la amplificación del ADNc a partir de ADNc de ZR-75-1

```

1   GAATTCCCTG GCTGCTTGAA TCTGTTCTGC CCCCTCCCCA CCCAATTGAG
   -----
   CTTAAGGGAC CGACGAACTT AGACAAGACG GGGGAGGGGT GGGTAAAGTG
           +10      +20      +30      +40
51  CACCAGCATG ACAGGGGGCA CCCAGTCTCC TTTCTTCCTG CTGCTGCTCC
   -----***
   GTGGTGGTAC TGTGGCCCGT GGGTCAGAGG AAAGAAGGAC GACGACGAGG
           +10      +20      +30      +40
101 TCACAGTIGT TACAGTTGTT ACAGGTTCTG GTCATGCAAG CTCTACCCCA
   *****
   AGTGTACCGA ATGTCAACAA TGTCCAAGAC CAGTACGTTT GAGATGGGGT
           +10      +20      +30      +40
151 GGTGGAGAAA AGGAGACTTC GGCTACCCAG AGAAGTTCAG TGCCAGCTC
   *****
   CCACCTCTTT TCTCTGAAG CCGATGGGTC TCTTCAAGTC ACGGGTCGAG
           +10      +20      +30      +40
201 TACTGAGAAG AATGCTGTGA GTATGACCAG CAGCGTACTC TCCAGCCACA
   *****
   ATGACTCTTC TTACGACACT CATACTGGTC GTCGCATGAG AGGTCGGTGT
           +10      +20      +30      +40
251 GCCCCGGTTC AGGCTCCTCC ACCACTCAGG GACAGGATGT CACTCTGGCC
   *****
   CGGGGCCAAG TCCGAGGAGG TGGTGAGTCC CTGTCTACA GTGAGACCGG
           +10      +20      +30      +40
301 CCGGCCACGG AACAGCTTC AGGTTGAGCT GCCACCTGGG GACAGGATGT
   *****
   GGCCGGTGCC TTGGTCGAAG TCCAAGTCGA CGGTGGACCC CTGTCTACA
           +10      +20      +30      +40
351 CACCTCGGTC CAGTCAACCA GGCCAGCCCT GGGCTCCACC ACCCCGCCAG
   *****
   GTGGAGCCAG GGTCAGTGGT CCGGTCGGGA CCCGAGGTGG TGGGGCGGTC
           +10      +20      +30      +40
401 CCCACGATGT CACCTCAGCC CCGACAACA AGCCAGCCCC GGGCTCCACC
   *****
   GGGTGCTACA GTGGAGTCGG GGCCTGTTGT TCGGTGGGG CCCGAGGTGG
           +10      +20      +30      +40
451 GCCCCCCCAG CCCACGGTGT CACCTCGGCC CCGGACACCA GGCCGCCCC
   *****
   CGGGGGGGTC GGGTGCCACA GTGGAGCCGG GGCTGTGGT CCGGCGGGGG
           +10      +20      +30      +40
501 GGGCTCCACC GCCCCCCCAG CCCACGGTGT CACCTCGGCC CCGGACACCA
   *****
   CCCGAGGTGG CGGGGGGGTC GGGTGCCACA GTGGAGCCGG GGCCTGTGGT
           +10      +20      +30      +40
551 GGCCGCCCC GGGCTCCACC GCGCCCGCAG CCCACGGTGT CACCTCGGCC
   *****
   CCGGCGGGGG CCCGAGGTGG CGCGGGCGTC GGGTGCCACA GTGGAGCCGG

```

Figura 5C (2)

```

+10      +20      +30      +40
601 CCGGACACCA GGCCGGCCCC GGGCTCCACC GCCCCCCCAG CCCATGGTGT
*****
GGCCTGTGGT CCGGCCGGGG CCCGAGGTGG CGGGGGGGTC GGGTACCACA
+10      +20      +30      +40
651 CACCTCGGCC CCGGACAACA GGCCCGCCTT GGCGTCCACC GCCCCTCCAG
*****
GTGGAGCCGG GGCCTGTTGT CCGGGCGGAA CCGCAGGTGG CGGGGAGGTC
+10      +20      +30      +40
701 TCCACAATGT CACCTCGGCC TCAGGCTCTG CATCAGGCTC AGCTTCTACT
*****
AGGTGTTACA GTGGAGCCGG AGTCCGAGAC GTAGTCCGAG TCGAAGATGA
+10      +20      +30      +40
751 CTGGTGACACA ACGGCACCTC TGCCAGGGCT ACCACAACCC CAGCCAGCAA
*****
GACCACGTGT TGCCGTGGAG ACGGTCCCGA TGGTGTGGG GTCGGTCTGT
+10      +20      +30      +40
801 GAGCACTCCA TTCTCAATTC CCAGCCACCA CTCTGATACT CCTACCACCC
*****
CTCGTGAGGT AAGAGTTAAG GGTGGTGGT GAGACTATGA GGTGGTGGG
+10      +20      +30      +40
851 TTGCCAGCCA TAGCACCAG ACTGATGCCA GTAGCACTCA CCAATAGCACG
*****
AACGGTCGGT ATCGTGGTTC TGACTIONGGT CATCGTGAGT GGTATCGTGC
+10      +20      +30      +40
901 GTACCTCCTC TCACCTCCTC CAATCACAGC ACTTCTCCCC AGTTGTCTAC
*****
CATGGAGGAG AGTGGAGGAG GTTAGTGTCTG TGAAGAGGGG TCAACAGATG
+10      +20      +30      +40
951 TGGGGTCTCT TTCTTTTTC TGCTTTTCA CATTTCAAAC CTCCAGTTTA
*****
ACCCCGAGAGA AAGAAAAAGG ACAGAAAAGT GTAAAGTTTG GAGGTCAAAT
+10      +20      +30      +40
1001 ATTCTCTCTT GGAAGATCCC AGCACCGACT ACTACCAAGA GCTGCAGAGA
*****
TAAGGAGAGA CCTTCTAGGG TCGTGGCTGA TGATGGTTCT CGACGTCTCT
+10      +20      +30      +40
1051 GACATTCTG AAATGTTTT GCAGATTAT AAACAAGGGG GPTTCTGGG
*****
CTGTAAAGAC TTTACAAAA CGTCTAATA TTTGTTCCCC CAAAAGACCC
+10      +20      +30      +40
1101 CCTCTCCAAT ATTAAGTTCA GGCCAGGATC TGTGGTGGTA CAATTGACTC
*****
GGAGAGGTTA TAATCAAGT CCGGTCTTAG ACACCACCAT GTTAACTGAG
+10      +20      +30      +40
1151 TGGCCTCCG AGAAGGTACC ATCAATGTCC ACGACGTGGA GACACAGTTC
*****
ACCGGAAGGC TCTCCATGG TAGTTACAGG TGCTGCACCT CTGTGTCAAG
+10      +20      +30      +40
1201 AATCAGTATA AAACGGAAGC AGCCTCTCGA TATAACCTGA CGATCTCAGA
*****
TTAGTCATAT TTTGCCTTCG TCGGAGAGCT ATATTGACT GCTAGAGTCT
+10      +20      +30      +40
1251 CGTCAGCGTG AGTGATGTGC CATTCCTTT CTCTGCCAG TCTGGGGCTG
*****
GCAGTCGCAC TCACTACACG GTAAAGGAAA GAGACGGGTC AGACCCCGAC

```

Figura 5C (3)

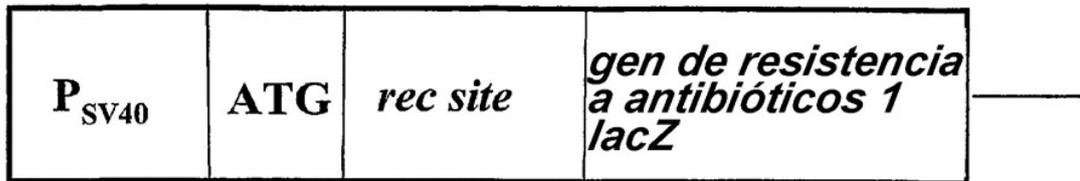
```

          +10      +20      +30      +40
GGGTGCCAGG CTGGGGCATC GCGCTGCTGG TGCTGGTCTG TGTTCCTGGTT
1301*****
CCCACGGTCC GACCCCGTAG CGCGACGACC ACGACCAGAC ACAAGACCAA
          +10      +20      +30      +40
GCGCTGGCCA TTGTCTATCT CATTGCCTTG GCTGTCTGTC AGTGCCGCCG
1351*****
CGCGACCGGT AACAGATAGA GTAACGGAAC CGACAGACAG TCACGGCGGC
          +10      +20      +30      +40
AAAGAACTAC GGGCAGCTGG ACATCTTTCC AGCCCGGGAT ACCTACCATC
1401*****
TTTCTTGATG CCGTCGACC TGTAGAAAGG TCGGGCCCTA TGGATGGTAG
          +10      +20      +30      +40
CTATGAGCGA GTACCCACCC TACCACACCC ATGGGCGCTA TGTGCCCCCT
1451*****
GATACTCGCT CATGGGGTGG ATGGTGTGGG TACCCGCGAT ACACGGGGGA
          +10      +20      +30      +40
AGCAGTACCG ATCGTAGCCC CTATGAGAAG GTTCTGCAG GTAATGGTGG
1501*****
TCGTCATGGC TAGCATCGGG GATACTCTTC CAAAGACGTC CATTACCACC
          +10      +20      +30      +40
CAGCAGCCTC TCTTACACAA ACCCAGCAGT GGCAGCCACT TCTGCCAACT
1551*****
GTCGTCGGAG AGAATGTGTT TGGGTCGTCA CCGTCGGTGA AGACGGTTGA
          +10      +20      +30      +40
TGTAGGGGCA CGTCGCCCTC TGAGCTGAGT GGCCAGCCAG TGCCATTCCA
1601*****-----
ACATCCCCGT GGAGGGGAG ACTCGACTCA CCGGTCGGTC ACGGTAAGGT
          +10      +20      +30      +40
CTCCACTCAG GGCTCTCTGG GCCAGTCCTC CTGGGAGCCC CCACCACAAC
1651-----
GAGGTGAGTC CCGAGAGACC CGGTCAGGAG GACCCTCGGG GGTGGTGTG
          +10      +20      +30      +40
ACTTCCCAGG CATGGAATTC C
1701-----
TGAAGGGTCC GTACCTTAAG G

```

Figura 5D (1)

A. Vector Rec site



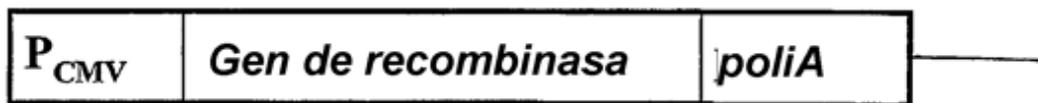
Características de las células huésped transfectadas de manera estable:

- Integración del sitio de recombinación junto con el gen de fusión de resistencia a antibióticos 1 lacZ
- Resistencia frente al antibiótico 1, expresión del gen lacZ (actividad β -galactosidasa)
- en función del lugar de integración del sitio de recombinación y del gen de fusión en el cromosoma, se diferencian los transfectantes con respecto a la intensidad de la expresión del gen de fusión (efecto de posición cromosómica). Detección mediante actividades β -galactosidasa de intensidades diferentes.

Figura D (2)

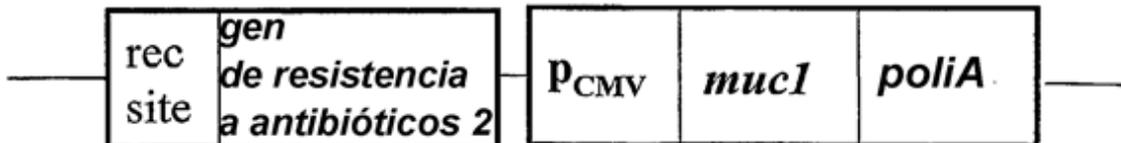
A. Integración del ADNc de muc1 a través del Recsite en el genoma de ZR-75-1

Vector de expresión de recombinasa



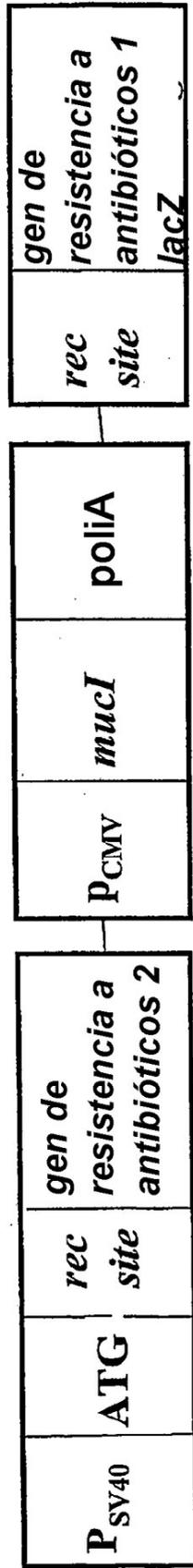
+

Vector de expresión de muc1 con sitio de recombinación (Rec site)



Producto de la recombinación específica de lado

Figura D (3)



Características de las células huésped transfectadas de manera estable:

- Resistencia frente al antibiótico 2
- Sensibilidad frente al antibiótico 1, inactivo frente a β -galactosidasa
- Expresión elevada del gen de *muc1* recombinante debido al fuerte promotor y al efecto de posición cromosómica

Figura 5E

BSM - mucina submaxilar bovina 1

MUC1 - mucina 1 de sobrenadantes de cultivos celulares

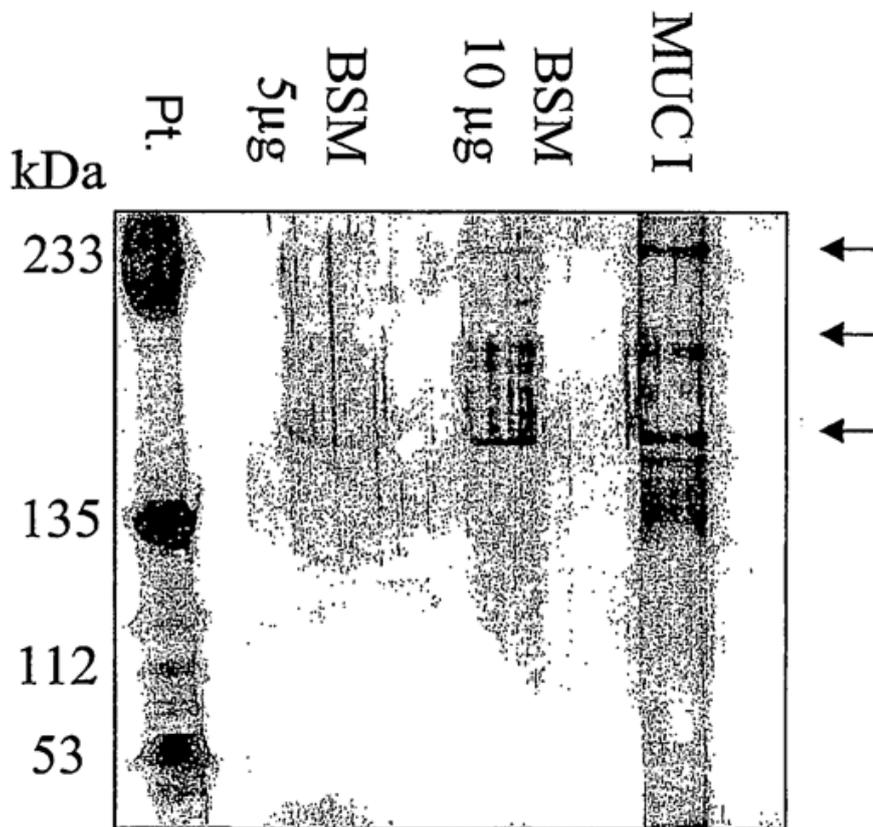


Figura 5F

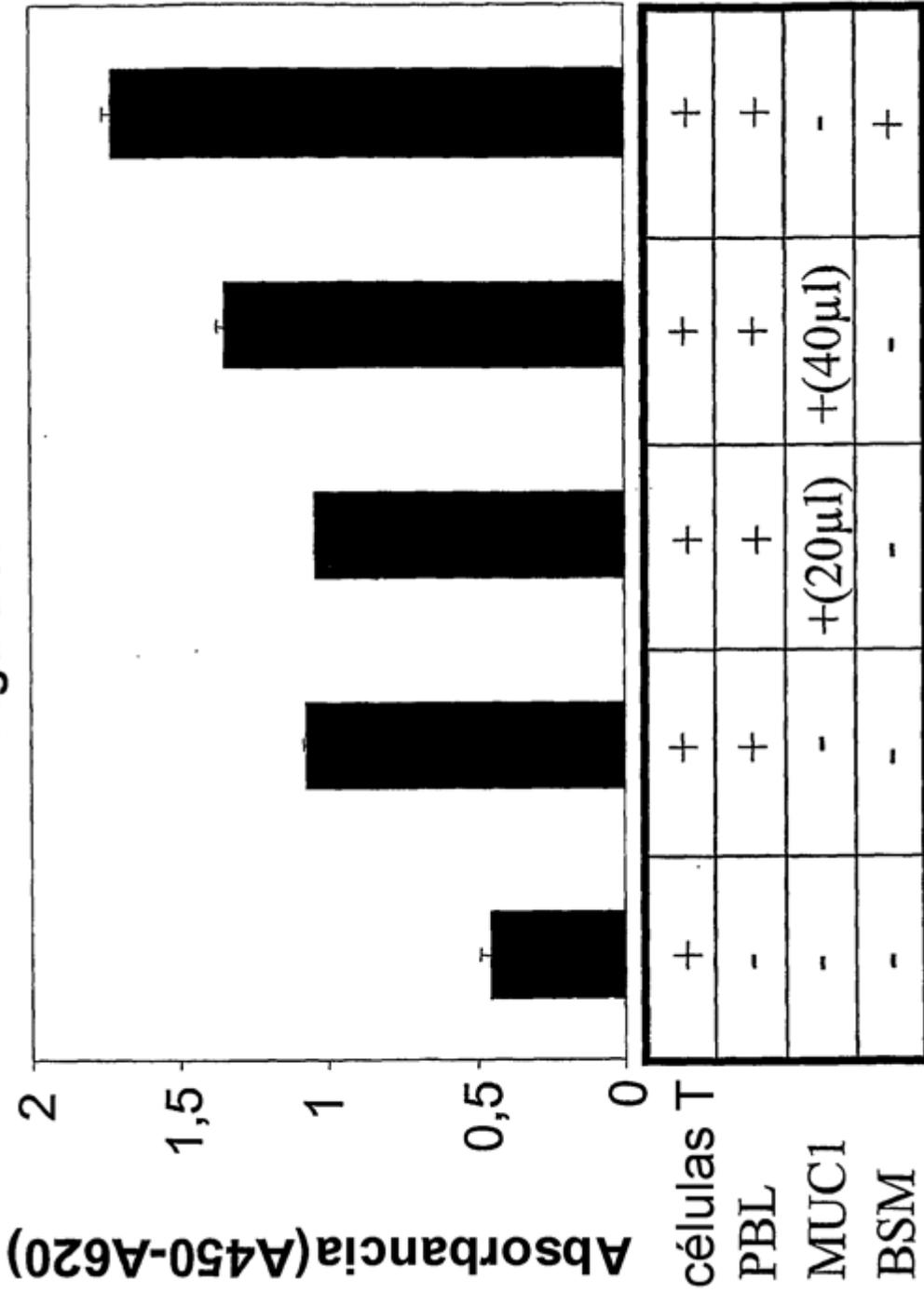
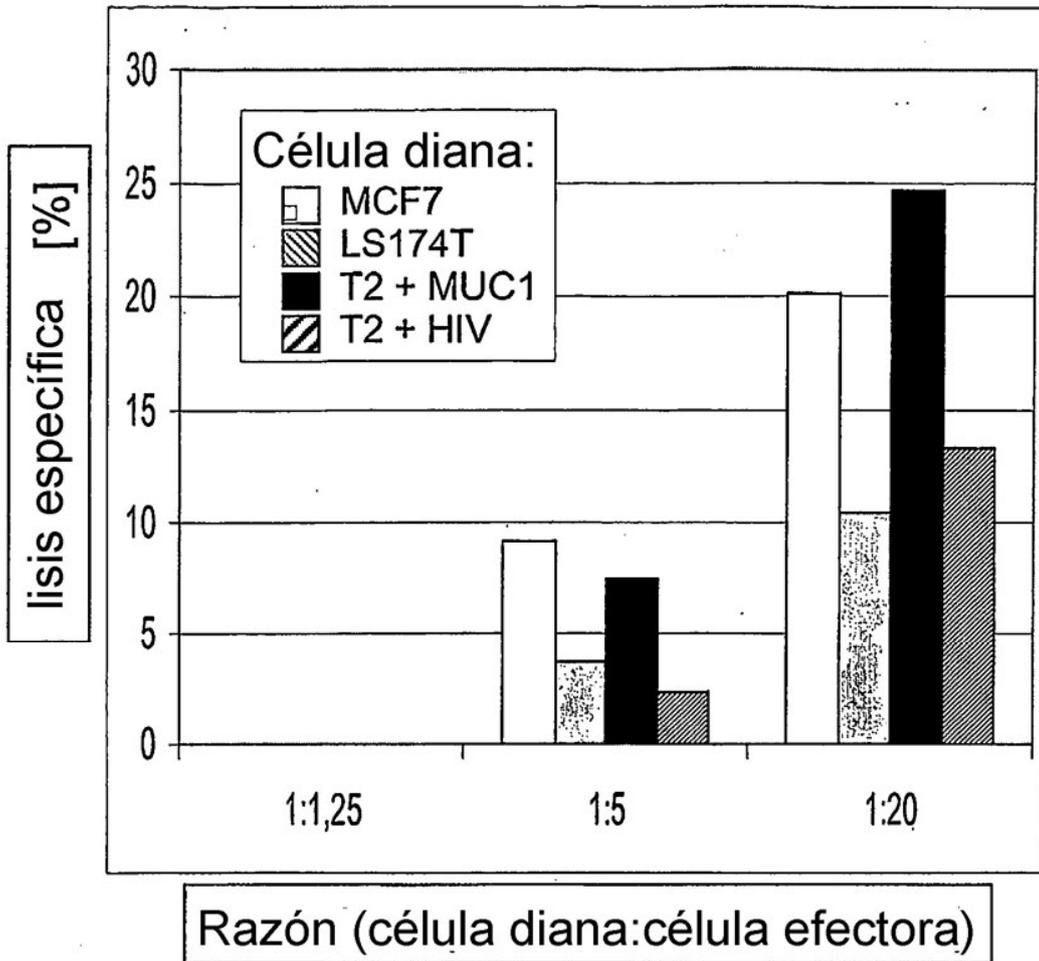


Figura 6



	% de SR
MCF7	8,86
LS147T	7,58
T2 + MUC1	3,18
T2 +HIV	4,37