

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 537**

51 Int. Cl.:
C07K 14/195 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/21 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06788523 .6**
96 Fecha de presentación: **25.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1910407**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **EXOTOXINAS DE PSEUDOMONAS MUTADAS CON ANTIGENICIDAD REDUCIDA.**

30 Prioridad:
29.07.2005 US 703798 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.01.2012

73 Titular/es:
**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, 6011 EXECUTIVE BOULEVARD, SUITE 325
ROCKVILLE, MD 20852-3804, US**

72 Inventor/es:
**PASTAN, Ira, H.;
ONDA, Masanori;
NAGATA, Satoshi;
FITZGERALD, David;
KREITMAN, Robert y
LEE, Byungkook**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

ES 2 372 537 T3

DESCRIPCIÓN

Exotoxinas de *Pseudomonas* mutadas con antigenicidad reducida

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 5
- [0001] Los inmunoconjugados se han desarrollado en los últimos años como un enfoque terapéutico alternativo para el tratamiento del cáncer. Originalmente, los inmunoconjugados estaban compuestos de un anticuerpo conjugado químicamente con una toxina vegetal o bacteriana, una forma conocida como inmunotoxina. El anticuerpo se une al antígeno expresado en la célula diana y la toxina se interioriza y causa la muerte celular al detener la síntesis de proteínas e inducir la apoptosis (Brinkmann, U., Mol. Med. Today 2: 439-446 (1996)). Más recientemente, se han fusionado los genes que codifican el anticuerpo y la toxina y la inmunotoxina se expresa como una proteína de fusión.
- 10
- [0002] Se han realizado numerosos estudios sobre inmunotoxinas que usan como fracción tóxica una toxina bacteriana conocida como la exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE"). Típicamente, la PE se ha truncado o mutado para reducir su toxicidad inespecífica sin destruir su toxicidad para las células a las que reconoce como diana por medio de la porción de reconocimiento de la inmunotoxina. Actualmente hay estudios clínicos en curso que evalúan el uso de las inmunotoxinas a base de PE como tratamientos para diversos tipos de cáncer.
- 15
- [0003] Las inmunotoxinas a base de PE actuales son muy inmunógenas. Esto no ha resultado ser un problema en el tratamiento de cánceres hematológicos, en los que la capacidad del sistema inmunitario de desencadenar una respuesta está frecuentemente alterada. Típicamente, las inmunotoxinas pueden administrarse varias veces a los pacientes con cánceres hematológicos. Sin embargo, los pacientes con tumores sólidos desarrollan normalmente anticuerpos neutralizantes contra las inmunotoxinas a base de PE en el espacio de semanas después de la primera administración. Dado que muchos protocolos proponen un periodo de tres semanas entre la administración de las inmunotoxinas, el desarrollo de los anticuerpos durante este periodo significa efectivamente que, para tumores sólidos, normalmente solo puede realizarse una administración de una inmunotoxina a base de PE antes de que los anticuerpos del paciente la hagan inefectiva. Incluso una única administración de una inmunotoxina a base de PE puede ser de gran utilidad para reducir la carga tumoral del paciente, eliminar pequeñas metástasis y aliviar los síntomas. No obstante, sería deseable disponer de formas menos antigénicas de las inmunotoxinas a base de PE que reducirían las respuestas inmunógenas de los pacientes.
- 20
- [0004] El documento US2002119492 se refiere al uso de diversos procedimientos computacionales para modular la inmunogenicidad de proteínas mediante la identificación y subsiguiente alteración de secuencias aminoacídicas potenciales que provocan una respuesta inmunitaria en un organismo hospedador.
- 25
- [0005] El documento WO02069886 se refiere a procedimientos para reducir la antigenicidad de un compuesto proteínico mientras se mantiene la actividad biológica del compuesto, así como a composiciones proteínicas con actividad biológica, pero con antigenicidad reducida.
- 30
- [0006] La publicación de Roscoe y col., European Journal of Immunology, vol. 27, n° 6, junio de 1997 (1997-06), páginas 1459-1468, se refiere a la identificación de epítomos en una forma mutante de la exotoxina de *Pseudomonas* mediante el uso de suero de humanos tratados con inmunotoxinas que contenían la exotoxina de *Pseudomonas*.
- 35
- [0007] La publicación de Roscoe y col., Infection and Immunity, vol. 62, n° 11, noviembre de 1994 (1994-11), páginas 5055-5065, se refiere a una respuesta de anticuerpos de primate a una inmunotoxina: un análisis serológico y por ordenador de epítomos en una forma truncada de la exotoxina de *Pseudomonas*.
- 40
- [0008] La publicación de Frankel y col., Clinical Cancer Research, vol. 10, n° 11, 1 de enero de 2004 (2004-01-01), páginas 13-15, se refiere a la reducción de la respuesta inmunitaria a una inmunotoxina.
- 45
- [0009] La publicación de Cunningham y col., Science, vol. 244, n° 4908, 2 de junio de 1989 (1989-06-02), páginas 1081-1085, se refiere al mapeo epitópico de alta resolución de las interacciones del receptor de hGH por mutagénesis de barrido con alanina.
- 50
- [0010] La publicación de Masanori y col., Journal of Immunology, vol. 177, n° 12, diciembre de 2006 (2006-12), páginas 8822-8834, se refiere a la caracterización de los epítomos de las células B asociados con una forma truncada de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE38) usada para preparar inmunotoxinas para el tratamiento de pacientes de cáncer.
- 55
- 60

RESUMEN DE LA INVENCION

- 5 [0011] La presente invención proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") aislada, en que dicha PE tiene una sustitución con alanina, glicina, serina o glutamina en lugar del resto aminoacídico R432, en que el resto aminoacídico R432 se define en referencia a la secuencia de aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO:1).
- 10 [0012] En una realización, dicha PE tiene además una sustitución con alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina o glutamina en lugar de la arginina en el resto 490, en que dicha numeración de aminoácidos se define en referencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. El sustituto de dicho resto aminoacídico 490 de SEQ ID NO:1 puede ser alanina.
- [0013] La PE puede seleccionarse del grupo que consta de PE35, PE38, PE38KDEL, PE40, PE4E y PE38QQR.
- 15 [0014] La PE puede comprender además una o más de las sustituciones R313A, Q332S, R467A, R490A, R513A, E548S y K590S, como las sustituciones R313A, Q332S, R432G, R467A, R490A, R513A, E548S y K590S.
- 20 [0015] En otra realización, la invención proporciona una molécula quimérica que comprende (a) una fracción de reconocimiento conjugada o fusionada con (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE"), en que dicha PE tiene una sustitución con alanina, glicina, serina o glutamina en lugar del resto aminoacídico R432, en que dicho resto aminoacídico R432 se define en referencia a la secuencia de aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO:1).
- [0016] La molécula quimérica puede comprender una PE tal como se define anteriormente.
- 25 [0017] La fracción de reconocimiento de la molécula quimérica puede ser un anticuerpo, por ejemplo, seleccionado del grupo que consta de un scFv, un dsFv, un Fab y un F(ab')₂.
- [0018] En una alternativa, la fracción de reconocimiento de la molécula quimérica puede ser una citocina.
- 30 [0019] La invención proporciona además una composición que comprende (a) una molécula quimérica tal como se describe anteriormente y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- [0020] En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") modificada tal como se define anteriormente y que opcionalmente codifica además una fracción de reconocimiento, como una fracción de reconocimiento tal como se define anteriormente.
- 35 [0021] Opcionalmente, el ácido nucleico aislado de la invención puede estar ligado operativamente a un promotor.
- 40 [0022] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula que porta una molécula diana, en que dicho procedimiento comprende la puesta en contacto de dicha célula con una molécula quimérica de la invención, en que la puesta en contacto de dicha célula con dicha molécula quimérica inhibe el crecimiento de dicha célula.
- 45 [0023] La invención proporciona además una molécula quimérica de acuerdo con la invención para el uso en un procedimiento de tratamiento, en que dicho tratamiento es destruir las células reconocidas como diana por dicha molécula. En algunas realizaciones, la molécula diana es un receptor de citocina y dicha fracción de reconocimiento es una citocina que se une a dicho receptor. En algunas realizaciones, la molécula diana es un receptor de IL-13 y dicha molécula de reconocimiento es una IL-13, una IL-13 mutada o una IL-13 permutada circularmente. En algunas realizaciones, la molécula diana es un antígeno y dicha molécula de reconocimiento es un anticuerpo que se une específicamente a dicho antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno de cáncer.
- 50 [0024] La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende la PE de la invención tal como se describe anteriormente o la molécula quimérica de la invención tal como se describe anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el uso en un procedimiento de tratamiento.
- 55 [0025] En este documento también se describen a continuación PE aisladas que tienen una sustitución con alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de un resto aminoacídico que corresponde a un resto aminoacídico de SEQ ID NO:1 seleccionado del grupo que consta de E282, E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331, Q332, D4Q3, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590 y L597, siempre que cuando el resto que se sustituye es Q332, el resto sustituto no es glutamina. En algunas realizaciones, la PE tiene una sustitución con alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de un resto aminoacídico
- 60

que corresponde a un resto aminoacídico de SEQ ID NO:1 seleccionado del grupo que consta de P290, R313, N314, D324, E327, E331, Q332, D403, E431, R432, R458, R467, R505, R513, R538, E548, R576, K590 y L597. En algunas realizaciones, la PE tiene una sustitución con alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de un resto aminoacídico que corresponde a un resto aminoacídico de SEQ ID NO:1 seleccionado del grupo que consta de R313, N314, D324, E327, E331, Q332, R432, R467, R538 y K590. En algunas realizaciones, se sustituyen dos o más de dichos restos aminoacídicos que corresponden a restos aminoacídicos de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la PE tiene además una sustitución con alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina o glutamina en la posición correspondiente al resto aminoacídico 490 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, alanina es el sustituto de dicho resto aminoacídico 490 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la PE se selecciona del grupo que consta de PE35, PE38, PE38KDEL, PE40, PE4E y PE38QQR. También se describen aquellas PE que comprenden mutaciones de alanina, valina, glicina, leucina o isoleucina en los restos correspondientes a los restos aminoacídicos Q332, R490, R467 y K590 de SEQ ID NO:1. Una PE tal puede comprender además una mutación de alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina o glutamina en un resto aminoacídico que corresponde al resto aminoacídico R313 de SEQ ID NO:1. La PE puede comprender además una sustitución de un resto aminoacídico que corresponde al resto aminoacídico R432 de SEQ ID NO:1. La PE puede comprender además una sustitución de un resto aminoacídico que corresponde al resto aminoacídico R513 de SEQ ID NO:1.

[0026] En este documento se desvelan también moléculas quiméricas que comprenden (a) una fracción de reconocimiento conjugada o fusionada con (b) tales PE también descritas. A continuación también se exponen composiciones que comprenden las moléculas quiméricas desveladas anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como ácidos nucleicos que codifican tales PE, así como el uso de tales PE en procedimientos para la inhibición del crecimiento de una célula que porta una molécula diana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027] La figura 1 muestra datos representativos de respuestas de anticuerpos en pacientes tratados con tres inmunotoxinas diferentes, BL22, SS1P y LMB9. Cada una de las inmunotoxinas contiene una porción de anticuerpo que es diferente para cada inmunotoxina; todas usan PE38 como fracción tóxica. Se recogieron muestras de suero de los pacientes y se evaluó su actividad neutralizante en un ensayo de muerte celular (gráficos de barras) y su reactividad con inmunotoxinas en diferentes ensayos ELISA (gráficos de líneas). La inmunotoxina con la que se trató al paciente y, en la mayoría de los casos, el cáncer padecido por el paciente se indican en la parte superior de cada panel. El número de ciclos de tratamiento recibidos por el paciente antes de la recogida de suero y los días después del último tratamiento se muestran en los paneles de gráficos de líneas. Los gráficos de líneas muestran los anticuerpos en las muestras de suero determinados mediante dos ensayos ELISA diferentes. El ensayo ICC-ELISA puede medir los anticuerpos que reaccionan con la PE nativa.

[0028] Figura 2. La figura 2 muestra los resultados del mapeo de epítomos topográficos basado en la competencia mutua de todos los pares posibles de los anticuerpos producidos en el transcurso de los estudios descritos en este documento. Cuanto más oscura es la sombra, más fuerte es la competencia. Por lo tanto, una sombra muy oscura indica una competencia muy fuerte, mientras que sombreados muy ligeros indican que no hay competencia.

[0029] Figura 3. La figura 3 es un sensograma Biacore que muestra la unión aditiva de anticuerpos monoclonales ("MAb") asignados a distintos grupos epitópicos.

[0030] Figura 4. La figura 4 es una tabla que muestra el efecto de 45 mutaciones puntuales diferentes en la PE. El eje Y lista los epítomos y subepítomos de la PE, con excepción del subepítomo 2a. La columna siguiente en el eje Y proporciona el número de un anticuerpo para el que, en los estudios de competencia, se encontró que se unía al epítomo o subepítomo indicado. La fila en la parte superior del eje X muestra cada mutación. "WT" representa el tipo natural ("wild type") y se refiere a la PE38 sin mutaciones. En el extremo derecho, bajo la palabra Dominios se observan los dominios II y III. PE38 no contiene el dominio I de la PE.

[0031] Figura 5. La figura 5 muestra que la CI_{50} para una inmunotoxina en la que la fracción tóxica es una PE mutante en la que se han llevado a cabo siete mutaciones (denominada mutante "7X") para destruir epítomos concretos y la CI_{50} para la misma inmunotoxina en la que la fracción tóxica es el mutante 7X con una mutación adicional (denominada mutante "8X") están próximas a la CI_{50} de la inmunotoxina de partida HA22.

[0032] Figura 6. La figura 6 muestra los resultados de un estudio *in vivo* de xenoinjerto de tumores humanos en ratones scid. "CA46" es un linfoma que crece subcutáneamente como tumor sólido en ratones. Las células tumorales se introdujeron en los ratones en el día 0 y a los ratones se les administró la inmunotoxina en los días 8, 10 y 12, como indican las flechas en el eje X. El tamaño de los tumores se muestra en el eje Y. Leyenda: los cuadrados representan el control (vehículo). Los rombos representan la inmunotoxina HA22, una inmunotoxina dirigida contra CD22 que usa PE38 como fracción tóxica. Triángulos: HA22-8M. HA22-8M es la inmunotoxina HA22

en la que se han llevado a cabo ocho mutaciones en la molécula de PE38 para reducir la inmunogenicidad. Las ocho mutaciones son R313A, Q332S, R432G, R467A, R490A, R513A, E548S y K590S, en que los números designan el resto en esa posición en SEQ ID NO:1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

5

INTRODUCCIÓN

10 [0033] Durante más de quince años se ha investigado la exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") para su uso como la porción tóxica de moléculas quiméricas como las inmunotoxinas. Este trabajo se plasma en el desarrollo de una serie de formas mutadas de la PE en las que se ha mantenido la actividad citotóxica, mientras que se ha reducido o eliminado la toxicidad inespecífica de la molécula. La mayoría de estos mutantes se ha truncado para mejorar su penetración en los tumores. Algunos también han sufrido modificaciones adicionales al truncamiento, como la modificación de los restos del extremo carboxilo o la eliminación del requerimiento de escisión entre los restos 279 y 280 por la proteasa furina para aumentar su citotoxicidad. Las inmunotoxinas que usan formas mutadas de la PE han demostrado ser considerablemente prometedoras en estudios clínicos en humanos.

20 [0034] Sin embargo, el uso de inmunotoxinas a base de PE para el tratamiento de tumores sólidos en particular se ha visto limitado por el desarrollo de anticuerpos neutralizantes de la inmunotoxina después de la primera administración. Estos anticuerpos se desarrollan antes de que muchos protocolos recomienden una segunda administración de la inmunotoxina y, por lo tanto, hacen que el uso posterior de las inmunotoxinas sea ineficaz contra tumores sólidos en los pacientes previamente expuestos.

25 [0035] Los estudios en que se basa la presente invención desvelan que la respuesta inmunitaria predominante de los pacientes a las inmunotoxinas a base de PE corresponde a la porción de PE de la inmunotoxina. Este conocimiento indica que la reducción de la antigenicidad de las moléculas de PE usadas para las inmunotoxinas reduciría la antigenicidad global de la inmunotoxina y aumentaría su utilidad. Los estudios en que se basa la presente invención desvelan además que la PE tiene siete epítomos principales que pueden dividirse adicionalmente en un total de trece subepítomos.

30 [0036] Sorprendentemente, se ha descubierto que para diez de los trece subepítomos de la PE, la antigenicidad del epítomo o subepítomo puede reducirse o eliminarse mediante la mutación de un solo resto aminoacídico de la PE. Por supuesto, dado que la PE contiene múltiples epítomos antigénicos, ninguna mutación única elimina la antigenicidad de toda la molécula de PE. Sin embargo, cada mutación individual de la presente invención reduce la antigenicidad de un epítomo o subepítomo individual. Por lo tanto, las mutaciones individuales reducen la antigenicidad de la molécula PE global y de cualquier inmunotoxina preparada con la PE mutada.

40 [0037] Los estudios en que se basa la invención han demostrado además que es posible combinar varias de las mutaciones para reducir la antigenicidad global de la molécula mientras se retiene la citotoxicidad de la molécula de PE. Se prepararon moléculas de PE en las que se mutaron tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho restos de distintos epítomos o subepítomos. Las PE con las mutaciones se transformaron en inmunotoxinas y se ensayó su citotoxicidad. Para facilitar la comparación, las PE se convirtieron en inmunotoxinas cada una de las cuales usaba la misma fracción de reconocimiento (un anticuerpo de gran afinidad dirigido contra CD22). Además, para facilitar la comparación, se usó la forma PE38 de la PE como la PE en la que se realizaron las sustituciones. Considerando nuestra experiencia con numerosas inmunotoxinas a base de PE en los últimos quince años, el hecho de que todas las formas citotóxicas de la PE presentan el mismo mecanismo de citotoxicidad para las células diana (ADP-ribosilación del factor de elongación 2) y el hecho de que las otras variantes de la PE en uso son simplemente la misma secuencia de aminoácidos con truncamientos concretos (o, en el caso de PE4E, cuatro mutaciones en el dominio la, más que un truncamiento), se espera que los resultados obtenidos con PE38 sean directamente aplicables a otras formas de la PE (como las formas de ejemplo conocidas respectivamente como PE40, PE38, PE37, PE35, PE4E, PE38QQR y PE38KDEL, descritas con más detalle a continuación).

50 [0038] Se espera que, como inmunotoxinas, las PE ya preparadas y otras modificadas de acuerdo con lo expuesto en la presente invención, al convertirlas en inmunotoxinas provoquen una menor respuesta inmunitaria *in vivo* y que esta respuesta inmunitaria disminuida se refleje en menores títulos de anticuerpos neutralizantes. El desarrollo de anticuerpos neutralizantes se analiza rutinariamente en la evaluación preclínica de las inmunotoxinas y en los protocolos de estudios clínicos de las inmunotoxinas y los títulos de los anticuerpos inducidos por las inmunotoxinas preparadas con las PE de la invención pueden medirse mediante estos ensayos estándar.

60 [0039] Los expertos apreciarán que las PE de la invención serán tan útiles como las PE mutadas conocidas con anterioridad que se han convertido en inmunotoxinas y evaluado en estudios clínicos. Sin embargo, tal como se señala, se espera que las inmunotoxinas preparadas con las PE de la invención manifiesten menos antigenicidad que las inmunotoxinas preparadas con las moléculas de PE disponibles actualmente y, por lo tanto, provoquen una

respuesta inmunitaria menor en los pacientes que las inmunotoxinas a base de las PE disponibles actualmente.

- 5 **[0040]** Las mutaciones de la presente invención pueden incorporarse fácilmente en PE ya modificadas (como las formas de ejemplo conocidas respectivamente como PE40, PE38, PE37, PE35, PE4E, PE38QQR y PE38KDEL, descritas con más detalle a continuación) para reducir su antigenicidad y, por lo tanto, reducir las respuestas inmunógenas de los pacientes a las inmunotoxinas que las contienen. Por consiguiente, la invención proporciona una nueva e importante manera de aumentar la utilidad terapéutica de los inmunocombinados a base de PE, como las diversas inmunotoxinas a base de PE actualmente en estudios clínicos.
- 10 **[0041]** Tal como se señala, las PE mejoradas de la invención comprenden mutaciones de la molécula en posiciones específicas de la molécula de PE. Por convención, las posiciones en la PE y sus variantes se designan en la técnica en referencia a la posición correspondiente en la secuencia de 613 aminoácidos de la molécula de PE nativa (SEQ ID NO:1). En este documento se sigue esta convención para permitir una fácil comparación entre las variantes de la PE y para la comprensión de qué restos están mutados en las PE de la invención. Por ejemplo, tal como se discute con más detalle a continuación, en la mayoría de las formas de utilidad clínica de la PE se ha eliminado el dominio la de la molécula (aminoácidos 1-252) para reducir la unión inespecífica. Una PE sin el dominio la tiene solo 361 restos. Sin embargo, una referencia en este documento a Q332 se refiere a la glutamina que se encuentra en la posición 332 de la secuencia de la PE nativa, independientemente del número de este resto si se cuenta desde el extremo amino de la PE concreta en la que se encuentra, mientras que R590 se refiere a la lisina que se encuentra en la posición 590 de la PE nativa y así sucesivamente. La secuencia de aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO:1) es bien conocida en la técnica y se expone, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n° 5.602.095.
- 15 **[0042]** Tal como se indica a continuación en las realizaciones preferidas, en las composiciones y procedimientos de la invención, el resto aminoácido presente en la secuencia nativa de la PE en las posiciones identificadas en este documento se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo formado por alanina, glicina, serina o glutamina. Alanina, glicina y serina se prefieren especialmente como restos sustitutos, mientras que alanina y serina se prefieren especialmente.
- 20 **[0043]** Para ser de utilidad, la PE debe retener actividad citotóxica después de la sustitución de los restos. Con el fin de evaluar la retención de citotoxicidad por las PE alteradas para reducir su antigenicidad, se han preparado una serie de inmunotoxinas de ejemplo. En una primera serie de estudios, se prepararon 19 inmunotoxinas. Para permitir la comparación, todas estas inmunotoxinas usaban la misma fracción de reconocimiento y todas partían de la misma forma truncada de la PE conocida como PE38. En cada una de las 19 inmunotoxinas se sustituyó un resto diferente de PE38 por una mutación identificada como reductora de la antigenicidad de un epítipo o subepítipo concreto de la PE. Después se comparó la actividad citotóxica de cada una de estas 19 PE38 mutadas con la de una inmunotoxina preparada con la misma fracción de reconocimiento y con una PE38 inalterada (que, por conveniencia, se llamará la inmunotoxina "natural").
- 25 **[0044]** Tal como se muestra en la tabla 3 a continuación, los ensayos de citotoxicidad de las inmunotoxinas demostraron que doce de las inmunotoxinas experimentales de ejemplo mostraban en realidad una mayor citotoxicidad que la inmunotoxina preparada con la secuencia de PE38 natural, mientras que dos tenían aproximadamente la toxicidad de la inmunotoxina natural. Notablemente, varias de las inmunotoxinas preparadas con las PE experimentales de ejemplo mostraron en realidad una citotoxicidad superior en el 50% o más que la de la inmunotoxina preparada con la secuencia de PE38 natural. Por lo tanto, esta serie de estudios no solo demuestra que fue posible realizar una serie de mutaciones de la invención sin ninguna pérdida de citotoxicidad para la inmunotoxina resultante, sino que varias de ellas produjeron en realidad un aumento.
- 30 **[0045]** Cinco de las inmunotoxinas en los estudios iniciales mostraron menos citotoxicidad que la inmunotoxina preparada con la secuencia de PE38 usada normalmente en la técnica, pero todavía retuvieron una actividad citotóxica considerable. Mientras que normalmente se prefiere más citotoxicidad a menos, en la práctica, se espera que la reducida citotoxicidad de estas formas mutadas de la PE quede compensada, al menos en cierta medida, por la reducida antigenicidad de las inmunotoxinas preparadas con ellas. Por lo tanto, incluso estas PE con citotoxicidad reducida pueden ser útiles para algunas aplicaciones. Además, acoplada con una mutación de la PE que muestre un aumento de citotoxicidad al convertirla en inmunotoxina, la citotoxicidad de la PE puede aproximarse a la de la PE natural. Y, dado que la PE es una citotoxina muy potente, incluso formas mutadas de la PE con toxicidad considerablemente reducida respecto a la de la toxina nativa retienen un poder considerable como fracciones tóxicas.
- 35 **[0046]** Los estudios en que se basa la invención desvelaron aminoácidos cuya sustitución disminuyó al menos cinco veces, con mayor preferencia al menos diez veces y, con la mayor preferencia, al menos 20 veces, la unión de más de dos anticuerpos monoclonales (MAb) asignados al mismo epítipo. Se espera que la reducción de la unión de los MAb al epítipo se correlacione con una pérdida de antigenicidad del epítipo y, por lo tanto, de las moléculas

de PE que contengan la mutación.

[0047] Las posiciones de la PE en las que se encontró que las mutaciones reducían al menos cinco veces la unión de varios MAb al mismo epítipo fueron E282, E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331, Q332, D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R490, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590 y L597. Las posiciones de la PE en las que se encontró que las mutaciones reducían al menos diez veces la unión de varios MAb al mismo epítipo fueron E282, E285, P290, R313, N314, D324, E327, E331, Q332, D403, R412, E431, R427, R432, R458, D461, R467, R490, R505, R513, E522, R538, E548, R576 y R590. Las posiciones de la PE en las que se encontró que las mutaciones reducían al menos 20 veces la unión de varios MAb al mismo epítipo fueron N314, D324, E327, E331, Q332, D403, R432, R467, R490, R505, R513, R538, Ras51, K590 y L597.

[0048] Todas estas mutaciones reducen la unión de los MAb a un epítipo o subepítipo concreto de la PE, tal como puede determinarse en referencia a la figura 4. Se espera que la combinación de la sustitución de una cualquiera de estas mutaciones (que puede denominarse convenientemente como mutación "A") con una mutación de uno o más restos que reduzca la unión a uno de los epítipos o subepítipos de la PE distinto del epítipo o subepítipo para el que la mutación A reduce la unión, reduzca adicionalmente la antigenicidad de la molécula y el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra la porción de la PE de una inmunotoxina preparada con la PE resultante. A la inversa, típicamente no es necesaria la mutación de más de un resto de los que la figura 4 muestra que eliminan la antigenicidad de un epítipo completo. Donde la figura 4 muestra que no existe una mutación única que elimine la unión de todos los anticuerpos a un epítipo, puede ser deseable combinar mutaciones para eliminar la unión a ese epítipo. Por ejemplo, para eliminar toda unión al epítipo 6a, puede ser deseable combinar en una sola PE de la invención E548A y R513A y, para reducir la unión al epítipo 6b, combinar además con estas mutaciones la mutación R576A.

[0049] En estudios previos del laboratorio de los presentes inventores, descritos en la solicitud PCT PCT/US2004/039617 (publicación internacional WO 2005/052006), se descubrió que la mutación del resto R490 de la PE a alanina duplicaba la citotoxicidad de la molécula de PE resultante al usarla como la fracción de toxina de una inmunotoxina. Sorprendentemente, los estudios en los que se basa la presente invención demuestran que la mutación de la arginina en la posición 490 de la PE elimina también la unión de anticuerpos al epítipo 5 de la PE. Por lo tanto, se espera que la sustitución de la arginina en la posición 490 de la PE con uno de los restos discutidos anteriormente disminuya la antigenicidad de la molécula de PE. Se espera además que la combinación de la sustitución de la arginina en la posición 490 de la PE con una sustitución de uno o más restos que reduzca la unión a uno de los epítipos o subepítipos de la PE distintos del epítipo 5, reduzca adicionalmente la antigenicidad de la molécula y el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra la porción de la PE de una inmunotoxina preparada con la PE resultante. Se señala que no se encontraron mutaciones que redujeran la unión al subepítipo 2a; por consiguiente, este subepítipo no se muestra en la figura 4.

[0050] El documento WO 2005/052006 indica además que la arginina en la posición 490 de la PE puede mutarse a glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina. El aumento de la actividad citotóxica y la disminución de la inmunogenicidad son fenómenos independientes. Por lo tanto, no de todas las mutaciones de las que se espera que resulten en un aumento de la actividad citotóxica se espera que resulten también en la disminución de inmunogenicidad. Las mutaciones que consiguen ambos efectos, como las mutaciones de R490 a glicina o, con mayor preferencia, a alanina, son especialmente deseables.

[0051] Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que es posible mutar algunos otros restos que también resultan en moléculas de PE que pueden convertirse en inmunotoxinas con una citotoxicidad al menos igual y en algunos casos significativamente superior a la de PE38. Tal como se muestra en la tabla 3, expuesta después de los ejemplos, a continuación, la mutación de R313, E327, E331, Q332, E431, R432, R505, R516, R538 y K590 también resultó en inmunotoxinas con una citotoxicidad superior a la de la inmunotoxina similar preparada con PE38. Dado que es probable que las inmunotoxinas con una citotoxicidad aumentada muestren un aumento de la capacidad de destruir células diana o permitan dosificar al paciente una cantidad menor de la inmunotoxina para conseguir el mismo efecto terapéutico, estas mutaciones serían ventajosas incluso en el caso de que ninguna de ellas también redujera la antigenicidad de la molécula de PE. Sin embargo, dado que cada una de estas mutaciones y la de R490 también reducen la antigenicidad de la PE, es deseable combinar una o más de estas mutaciones en una sola PE. Como con otras combinaciones de mutaciones de la invención, es especialmente deseable combinar mutaciones que reduzcan o eliminen la antigenicidad de diferentes epítipos o subepítipos. Por ejemplo, una combinación de mutaciones deseable es la mutación de Q332 (que reduce la antigenicidad de los subepítipos 1a y b) y R467 (que reduce la antigenicidad del subepítipo 2c), además de R490 (que, tal como se ha señalado, elimina la antigenicidad del epítipo 5).

[0052] En otro grupo de experimentos se llevaron a cabo estudios para confirmar la posibilidad de realizar combinaciones de mutaciones de las que se esperaba que redujeran la inmunogenicidad de toda la molécula de PE, manteniendo a la vez una fuerte citotoxicidad. Dado que PE38 es la forma de la PE que se ha sometido a más

ensayos clínicos, es la que se usó en los estudios descritos en este documento. Dado que todas las variantes de la PE son versiones truncadas o mutadas de la misma proteína y todas presentan la misma actividad enzimática, se espera que los resultados obtenidos con PE38 sean válidos para las otras variantes de la PE, como PE35, PE37, PE38QQR, PE40, PE4E y variaciones de estas con mutaciones concretas en el extremo carboxilo, tal como se describe con más detalle a continuación.

[0053] La tabla 4, a continuación, expone los resultados de estudios sobre una serie de mutaciones únicas y múltiples de la PE. Por ejemplo, se realizó una serie de combinaciones de mutaciones para reducir la inmunogenicidad de varios epítomos de la PE. A medida que se evaluó la citotoxicidad de cada combinación de mutaciones, se añadió una mutación adicional para reducir la inmunogenicidad de un epítomo o subepítomo adicional de la PE.

[0054] Por ejemplo, la tabla 4 expone los resultados de estudios sobre la citotoxicidad de un mutante de la PE con cuatro mutaciones en el que se hicieron las siguientes mutaciones: Q332S R490A R467A K590S, para reducir la inmunogenicidad de los epítomos 1, 2c, 5 y 7. Se preparó un mutante con cinco mutaciones añadiendo una mutación en la posición R313 para reducir la inmunogenicidad del epítomo 3, como sigue: R313A Q332S R467A R490A K590S; este mutante se evaluó en dos ensayos de citotoxicidad. Después se preparó un mutante con seis mutaciones añadiendo a este mutante una mutación R432G para reducir la inmunogenicidad del epítomo 4a, mientras que se realizó una séptima mutación por adición de R513A para reducir la inmunogenicidad de un epítomo adicional. Finalmente se preparó un mutante con ocho mutaciones con las mutaciones siguientes: R313A Q332S R432G R467A R490A R513A E548S K590S, para reducir la inmunogenicidad de un subepítomo del epítomo 6; se evaluó la citotoxicidad del mutante con ocho mutaciones y se encontró que estaba próxima a la de la inmunotoxina de partida (la inmunotoxina de partida se conoce como HA22). Los resultados de citotoxicidad de estas mutaciones se muestran en la tabla 4. Considerando los resultados con estas combinaciones de mutaciones de ejemplo, se espera que puedan realizarse otras combinaciones de las mutaciones mostradas en la figura 4 para reducir la inmunogenicidad de los diversos epítomos y subepítomos de la PE, que retengan la citotoxicidad adecuada para ser de utilidad como la porción tóxica de inmunotoxinas.

[0055] En el curso de estos estudios, se encontró que algunas mutaciones a alanina que resultaron en inmunotoxinas altamente citotóxicas por sí mismas parecieron resultar en cierta pérdida de actividad al combinarlas con mutaciones múltiples en las que los otros restos también se mutaron a alanina. Se especuló que esto era debido a la presencia de demasiadas mutaciones a alanina, haciendo la molécula en su totalidad demasiado hidrófoba. Para hacer frente a esto, algunos de los restos se mutaron a serina en lugar de alanina; y la citotoxicidad se recuperó. En tales circunstancias también puede usarse glicina y otros restos pueden mutarse a serina aparte de los dos seleccionados en estos estudios. Se espera que la selección de otros restos para su mutación a serina en lugar de alanina sea también eficaz, ya que lo importante es evitar crear demasiada hidrofobicidad; este objetivo puede conseguirse, por ejemplo, mediante la mutación de R313 a serina, mientras se mantiene la mutación de Q332 a A, y así sucesivamente. El profesional puede evaluar fácilmente cualquier combinación deseada en particular de las mutaciones deseables expuestas en este documento para confirmar si la combinación retiene o no la capacidad citotóxica.

[0056] La tabla 4 muestra también que algunas mutaciones específicas resultaron en alguna pérdida de citotoxicidad. Por ejemplo, la mutación N314A resultó en la pérdida de más del 50% de la citotoxicidad. Dado que la PE es una citotoxina tan activa, esta mutación todavía sería útil. Sin embargo, la tabla 4 muestra también que mientras que el mutante R490A retiene al menos la actividad de la molécula PE38 de partida, el mutante R490S tiene poca actividad y no se prefiere. La mutación de R538 a alanina resulta en alguna, aunque aceptable, pérdida de actividad, mientras que la mutación del mismo resto a serina resulta en una acusada pérdida de actividad y no se prefiere. Una vez más, el profesional puede evaluar fácilmente cualquier combinación deseada en particular de las mutaciones deseables expuestas en este documento para confirmar si la combinación retiene o no la capacidad citotóxica.

[0057] Los expertos son conscientes de que varios tipos de moléculas pueden servir como base para hacer que las PE que contienen las mutaciones de la invención reconozcan como diana a las células que el profesional desea destruir o inhibir. Como resulta evidente de la discusión anterior, los anticuerpos son un tipo de agente de reconocimiento preferido especialmente.

[0058] En otra realización preferida, la porción o fracción de reconocimiento de la molécula quimérica es una citocina, que puede usarse para hacer que las toxinas reconozcan como diana a células que expresan en exceso un receptor para la citocina. Por ejemplo, se sabe que los receptores de IL-13 se expresan con gran exceso en el exterior de las células de ciertos cánceres, como gliomas, y actúan como un factor de crecimiento autocrino en cánceres tales como el carcinoma renal, el sarcoma de Kaposi y la enfermedad de Hodgkin. Véanse, p. ej., los documentos WO 01/34645, WO 03/039600 y la patente de los EE. UU. n° 6.518.061. IL-13 o diversos mutantes y formas permutadas circularmente de IL-13 pueden usarse para hacer que citotoxinas, como las moléculas de PE

que contienen una o más mutaciones de la invención, reconozcan como diana a las células que expresan el receptor IL-13. Además, las diversas formas de IL-13, incluidas las formas permutadas circularmente, pueden usarse para hacer que moléculas de PE con las mutaciones reconozcan como diana a las células de los pulmones que expresan el receptor de IL-13 para reducir o eliminar los síntomas en afecciones como el asma y la rinitis alérgica y a células en cualquier otra parte del cuerpo para reducir o eliminar los síntomas de la dermatitis atópica y la fibrosis hepática en la esquistosomiasis, tal como se discute en la publicación internacional WO 01/34645.

[0059] Además de las citocinas se conocen numerosos otros ligandos en la técnica que pueden usarse para hacer que las moléculas de PE de la invención reconozcan a las células diana. Por ejemplo, la transferrina se ha usado para hacer que las toxinas reconozcan como diana a células que expresan receptores de transferrina. De manera similar, las células implicadas en una enfermedad o afección pueden ser reconocidas como diana si hay un antígeno en la superficie celular que se exprese específicamente o preferentemente en las células relacionadas con la enfermedad o afección, como gp120 en las células infectadas por el VIH, CD25 en las células T que están implicadas en la enfermedad del injerto contra el huésped o diversas moléculas de superficie que se expresan en las células cancerosas, como CEA, CD30 o CD33.

DEFINICIONES

[0060] Las unidades, prefijos y símbolos se indican en la forma aceptada en el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en la orientación de extremo amino a extremo carboxilo. Los encabezamientos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que pueda haber en referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más detalladamente en referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

[0061] La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") es una proteína monomérica (peso molecular de 66 kDa) extremadamente activa segregada por *Pseudomonas aeruginosa* que inhibe la síntesis de proteínas en las células eucariotas. La secuencia de la PE nativa (SEQ ID NO:1) se expone en la patente de los EE. UU. n° 5.602.095, incorporada por referencia en este documento. El modo de acción y la estructura de la PE, así como las modificaciones que resultan en una serie de variantes de la PE se discuten con cierto detalle en una sección dedicada a este propósito en el documento.

[0062] En este documento, las mutaciones de la PE se describen en referencia al resto aminoacídico presente en una posición concreta de la secuencia de 613 aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO:1), seguido del aminoácido con el que se ha sustituido dicho resto en la mutación concreta que se discute. Así por ejemplo, el término "R490A" indica que el resto "R" (arginina, en el código estándar de una sola letra) en la posición 490 de la molécula de referencia se sustituye por un resto "A" (alanina, en el código estándar de una letra), mientras que K590Q" indica que la lisina presente normalmente en la posición 590 ha sido sustituida con una glutamina. El código estándar de una sola letra para los aminoácidos comunes se expone a continuación.

[0063] "BL22" (o "RFB-4(dsFv)-PE38") es una inmunotoxina que emplea como fracción de reconocimiento una región Fv estabilizada por disulfuro del anticuerpo dirigido contra C22 conocido en la técnica como "RFB-4". La secuencia del anticuerpo RFB-4 es bien conocida en la técnica. BL22 se describe en Kreitman y col., New Eng. J. Med. 345(4): 241-7 (2001). La inmunotoxina BL22 usa PE38 como la porción tóxica de la inmunotoxina.

[0064] "HA22" es una inmunotoxina que emplea como fracción de reconocimiento una forma mutada de RFB-4 en la que los restos SSY de CDR3 en la cadena pesada variable han sido mutados a THW. Esta mutación de RFB-4 y su efecto en las inmunotoxinas que la emplean como la fracción de reconocimiento se describen en la publicación internacional WO 03/027135 y en Salvatore y col., Clin. Cancer Res. 8(4): 995-1002 (2002). La inmunotoxina HA22 usa PE38 como la porción tóxica de la inmunotoxina.

[0065] Para facilitar la referencia, el término "anticuerpo" tal como se usa en este documento incluye anticuerpos completos (a veces denominados "intactos" en este documento), fragmentos de anticuerpos que retienen el reconocimiento antigénico y la capacidad de unión, ya sean producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de nuevo mediante metodologías de ADN recombinante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales e imitadores de anticuerpos, a menos el contexto lo requiera de otra manera. El anticuerpo puede ser una IgM, IgG (p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄), IgD, IgA o IgE.

[0066] El término "fragmentos de anticuerpo" significa moléculas que comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; anticuerpos estabilizados

por hélices (véase, p. ej., Arndt y col., J. Mol. Biol. 312: 221-228 (2001); diacuerpos (véase a continuación); moléculas de anticuerpos de cadena sencilla ("scFv", véase, p. ej. la patente de los EE. UU. n° 5.888.773); anticuerpos estabilizados por disulfuro ("dsFv", véase, p. ej., las patentes de los EE. UU. n°s 5.747.654 y 6.558.672) y anticuerpos de dominio único ("dAb", véase p. ej., Holt y col., Trends Biotech. 21(11): 484-490 (2003), Ghahroudi y col., FEBS Lett. 414: 521-526 (1997), Lauwereys y col., EMBO J. 17: 3512-3520 (1998), Reiter y col., J. Mol. Biol. 290: 685-698 (1999), Davies y Riechmann, Biotechnology 13: 475-479 (2001)).

[0067] El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, en que los fragmentos comprenden un dominio pesado variable ("V_H" o "VH") conectado a un dominio ligero variable ("V_L", "VL") en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Mediante el uso de un enlazante demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos y su producción se describen más detalladamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097 y WO 93/11161 y en Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

[0068] El término "anticuerpo parental" significa cualquier anticuerpo de interés que se muta o modifica para obtener anticuerpos o fragmentos de estos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo parental, pero con mayor afinidad.

[0069] Una "fracción de reconocimiento" es la porción de un inmunoconjugado destinada a hacer que los inmunoconjugados reconozcan una célula de interés como diana. Típicamente, la fracción de reconocimiento es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo que retiene la capacidad de reconocimiento del antígeno, como un scFv, un dsFv, un Fab o un F(ab')₂.

[0070] Una "fracción tóxica" es la porción de una inmunotoxina que hace que la inmunotoxina sea citotóxica para las células de interés. Con respecto a las inmunotoxinas que son el objeto de la presente invención, la fracción tóxica es una exotoxina A de *Pseudomonas* que se ha mutado para reducir su citotoxicidad inespecífica, tal como se describe con cierto detalle a continuación.

[0071] Típicamente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y una cadena ligera. Cada una de las cadenas pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones se conocen también como "dominios"). Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada contienen una región "estructural" interrumpida por tres regiones hipervariables, denominadas también "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". La extensión de la región estructural y de las CDR han sido definidas. Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región estructural de un anticuerpo que es la combinación de las regiones estructurales de las cadenas ligera y pesada constituyentes sirve para colocar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

[0072] Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Típicamente, las CDR de cada cadena se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N y típicamente, también se identifican por la cadena en la que la CDR concreta está localizada. Por lo tanto, una V_H CDR3 de está localizada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una V_L CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en que se encuentra.

[0073] Las referencias a "V_H" o a "VH" se refieren a la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina, incluyendo un Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a "V_L" o a "VL" se refieren a la región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina, incluyendo un Fv, scFv, dsFv o Fab.

[0074] La expresión "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a un anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas se han empalmado para formar una cadena. Típicamente, entre las dos cadenas se inserta un péptido enlazante para permitir un plegamiento adecuado y la creación de un sitio de unión activo.

[0075] La expresión "puente disulfuro" o "puente disulfuro cisteína-cisteína" se refiere a una interacción covalente entre dos cisteínas en la que los átomos de azufre de las cisteínas se oxidan para formar un enlace disulfuro. La energía de enlace media de un puente disulfuro es de aproximadamente 60 kcal/mol, en comparación con 1-2 kcal/mol de un enlace de hidrógeno.

[0076] La expresión "Fv estabilizado por disulfuro" o "dsFv" se refiere a la región variable de una inmunoglobulina en la que hay un puente disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada. En el contexto de esta invención, las cisteínas que forman el puente disulfuro se encuentran dentro de las regiones estructurales de las cadenas del anticuerpo y sirven para estabilizar la conformación del anticuerpo. Típicamente, el anticuerpo se modifica para introducir cisteínas en la región estructural en posiciones en las que su sustitución no interfiera con la

unión al antígeno.

[0077] El término “péptido enlazante” se refiere a un péptido dentro de un fragmento de unión de un anticuerpo (p. ej., un fragmento Fv) que sirve para enlazar indirectamente el dominio variable de la cadena pesada con el dominio variable de la cadena ligera.

[0078] Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno concreto puede generarse por procedimientos recombinantes como la selección de colecciones de anticuerpos recombinantes en fagos o en vectores similares (véase, p. ej., Huse y col., *Science* 246: 1275-1281 (1989); Ward y col., *Nature* 341: 544-546 (1989); Vaughan y col., *Nature Biotech.*, 14: 309-314 (1996)) o mediante la inmunización de un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno.

[0079] El término “fracción efectora” significa la porción de un inmunocombinado destinada a tener un efecto sobre una célula reconocida como diana por la fracción de reconocimiento o a identificar la presencia del inmunocombinado. En el contexto de la presente invención, la fracción efectora es una exotoxina A de *Pseudomonas* mutada.

[0080] El término “inmunocombinado” se refiere a un enlazamiento covalente de una molécula efectora con un anticuerpo.

[0081] Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad eficaz para” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refieren a una dosis de un agente terapéutico suficiente para producir un resultado deseado, como la inhibición de la síntesis de proteínas celular en al menos el 50% o la destrucción celular.

[0082] El término “toxina” incluye típicamente la referencia a abrina, ricina, la exotoxina de *Pseudomonas* (PE), la toxina de la difteria (DT), la toxina botulínica o toxinas modificadas a partir de estas. Por ejemplo, PE y DT son compuestos muy tóxicos que típicamente ocasionan la muerte por toxicidad hepática. Sin embargo, las toxinas PE y DT pueden modificarse a una forma para uso como inmunotoxina mediante la eliminación del componente nativo de reconocimiento de la toxina (p. ej., el dominio la de la PE o la cadena B de la DT) y su sustitución por una fracción de reconocimiento diferente, como un anticuerpo. En el contexto de la presente invención, la toxina es una exotoxina A de *Pseudomonas* mutada.

[0083] El término “puesta en contacto” se refiere a la colocación en asociación física directa.

[0084] Un “plásmido de expresión” comprende una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de interés, ligada operativamente a un promotor.

[0085] Tal como se usa en este documento, “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable y se refieren a un polímero de restos aminoacídicos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoacídicos es un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los términos se aplican también a polímeros que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos, de modo que la proteína permanezca funcional.

[0086] Los términos “resto” o “resto aminoacídico” o “aminoácido” se refieren a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido (colectivamente “péptido”). El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural y, a menos que se limite de otra manera, puede abarcar análogos conocidos de los aminoácidos naturales que pueden funcionar de manera similar a los aminoácidos de origen natural.

[0087] Los aminoácidos y análogos a los que se hace referencia en este documento se describen mediante las designaciones abreviadas indicadas a continuación en la tabla A:

[0088]

Tabla A: nomenclatura de aminoácidos

Nombre	tres letras	una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G

Histidina	His	H
Homoserina	Hse	-
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Sulfóxido de metionina	Met (O)	-
Metilsulfonio de metionina	Met (S-Me)	-
Norleucina	Nle	-
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

[0089] Una “sustitución conservadora” al describir una proteína se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera sustancialmente la actividad de la proteína. Por lo tanto, “variaciones modificadas de manera conservadora” de una secuencia de aminoácidos concreta se refieren a sustituciones de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad de la proteína o a la sustitución de aminoácidos con otros aminoácidos de propiedades similares (p. ej., ácidos, básicos, cargados positiva o negativamente, polares o no polares, etc.), de modo que incluso las sustituciones de aminoácidos críticos no alteran sustancialmente la actividad. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar son bien conocidas en la técnica. Cada uno de los siguientes seis grupos en la tabla B contiene aminoácidos que son sustituciones mutuamente conservadoras:

[0090]

Tabla B

- 1) alanina (A), serina (S), treonina (T);
- 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) asparragina (N), glutamina (Q);
- 4) arginina (R), lisina (K);
- 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);
- 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

Véase también Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W. H. Freeman and Company, Nueva York, EE. UU. (2ª edición, 1992).

[0091] El término “sustancialmente similar” en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos el 90%, preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de referencia en una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos.. El porcentaje de identidad de secuencia se determina por comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que se encuentra una base de ácido nucleico o un resto aminoacídico idénticos en las dos secuencias para obtener el número de posiciones que muestran correspondencia, la división del número de posiciones que muestran correspondencia entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y la multiplicación del resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

[0092] Los términos “conjugación”, “empalme” o “enlace” se refieren a la obtención de una molécula polipeptídica contigua a partir de dos polipéptidos. En el contexto de la presente invención, los términos se refieren al empalme de una fracción de anticuerpo a una molécula efectora (EM). El enlazamiento puede realizarse por procedimientos químicos o recombinantes. Procedimientos químicos se refieren a una reacción entre la fracción de anticuerpo y la molécula efectora de modo que se forme un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula.

[0093] Tal como se usa en este documento, “recombinante” se refiere a una proteína producida mediante células que, en su estado nativo, no contienen una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante porque se han alterado genéticamente por la introducción de la secuencia aislada de ácido nucleico apropiada. El término se refiere también a una célula o ácido nucleico o vector

que han sido modificados por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o a la alteración de un ácido nucleico nativo a una forma no nativa para dicha célula o a que la célula deriva de una célula modificada de esta manera. Así por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, expresan genes mutantes que se encuentran dentro de la forma nativa o expresan genes nativos que de otra manera se expresan anormalmente, presentan una expresión reducida o no se expresan en absoluto.

[0094] Tal como se usa en este documento, “ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos que, bien en forma mono o bicatenaria y, a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de los nucleótidos naturales que hibridan con los ácidos nucleicos de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta incluye la secuencia complementaria de esta, así como variantes conservadoras, es decir, ácidos nucleicos presentes en las posiciones de titubeo de los codones y variantes que al traducirse en proteína, resultan en una sustitución conservadora de un aminoácido.

[0095] Tal como se usa en este documento, “codificante”, con respecto a un ácido nucleico especificado, se refiere a ácidos nucleicos que comprenden la información para la traducción de la proteína especificada. La información se especifica por el uso de codones. Típicamente, el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos mediante el código genético “universal”. Sin embargo, es posible usar variantes del código universal, como las presentes en las mitocondrias de algunas plantas, animales y hongos, la bacteria *Mycoplasma capricolum* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2306-2309 (1985) o el ciliado *Macronucleus*, cuando el ácido nucleico se expresa por medio de la maquinaria traduccional de estos organismos.

[0096] La expresión “fusión en la misma fase de lectura” se refiere al empalme de dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos, de modo que la secuencia de ácido nucleico empalmada traduce una sola cadena de proteína que comprende las cadenas polipeptídicas originales.

[0097] Tal como se usa en este documento, “expresado” se refiere a la traducción de un ácido nucleico para dar una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, pasar a ser un componente de la membrana de la superficie celular o segregarse a la matriz extracelular o al medio.

[0098] Con “célula hospedadora” se indica una célula que puede permitir la replicación o expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procariontas como *E. coli* o células eucariotas como células de levaduras, insectos, anfibios o mamíferos.

[0099] Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos aminoacídicos o nucleótidos que son iguales al compararlas y alinearlas para obtener la máxima correspondencia, tal como se determina mediante uno de los algoritmos de comparación siguientes o por inspección visual.

[0100] La expresión “sustancialmente idéntico”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tiene al menos el 60%, con mayor preferencia el 65%, incluso con mayor preferencia el 70%, todavía con mayor preferencia el 75%, incluso con mayor preferencia el 80% y con la máxima preferencia el 90-95% de identidad de restos nucleotídicos o aminoacídicos, al compararlas y alinearlas para obtener la máxima correspondencia, tal como se determina mediante uno de los algoritmos de comparación siguientes o por inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial tiene lugar en una región de las secuencias con una longitud de al menos 50 restos, con mayor preferencia en una región de al menos 100 restos y, con la máxima preferencia, las secuencias son sustancialmente idénticas al menos a lo largo de 150 restos. En una realización máximamente preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de toda la longitud de las regiones codificantes.

[0101] Para la comparación de las secuencias, típicamente una de las secuencias hace de secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de evaluación. Al usar un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de evaluación y la secuencia de referencia se introducen en un ordenador, en caso necesario, se designan las coordenadas de subsecuencias y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de evaluación en relación a la secuencia de referencia, basado en los parámetros del programa designados.

[0102] El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), el método de búsqueda de

similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), aplicaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, EE. UU.) o mediante inspección visual (véase en general Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel y col., eds. Current Protocols, una edición conjunta de Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplemento de 1995) (Ausubel)).

[0103] Algunos ejemplos de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-405 y Altschul y col. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente. El software para llevar a cabo análisis mediante BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que muestran correspondencia o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo al alinearse con una palabra de la misma longitud en una secuencia del banco de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabras próximas (Altschul y col., cita anterior). Estas palabras próximas identificadas inicialmente actúan como semillas para iniciar la búsqueda para encontrar HSP de mayor longitud que las contengan. Las palabras identificadas se extienden entonces en las dos direcciones a lo largo de cada secuencia mientras pueda incrementarse la puntuación de alineamiento acumulada. Para las secuencias de nucleótidos, las puntuaciones acumuladas mediante los parámetros M (puntuación de recompensa por un par de restos que muestra correspondencia; siempre > 0) y N (puntuación de penalización por restos que no muestran correspondencia; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las palabras identificadas en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada difiere en la cantidad X del máximo valor alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa, o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la rapidez del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valores estándar una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de las dos hebras. El programa BLASTP, para las secuencias de aminoácidos, usa como valores estándar una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

[0104] Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase p. ej., Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma mínima (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma mínima en una comparación del ácido nucleico de evaluación con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,1, con mayor preferencia inferior a aproximadamente 0,01 y con la máxima preferencia inferior a aproximadamente 0,001.

[0105] Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico presenta una reacción inmunológica cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, tal como se describe a continuación. Por lo tanto, típicamente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente en sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones restrictivas, tal como se describe a continuación.

[0106] El término "*in vivo*" se refiere al interior del cuerpo del organismo del que se ha obtenido la célula. "*Ex vivo*" e "*in vitro*" significan fuera del cuerpo del organismo del que se ha obtenido la célula.

[0107] La expresión "célula maligna" o "cáncer" se refiere a tumores o células tumorales que son invasivas y/o capaces de experimentar metástasis, es decir, una célula cancerosa.

[0108] Tal como se usa en este documento, las "células de mamíferos" se refieren a células derivadas de mamíferos, como humanos, ratas, ratones, cobayas, chimpancés o macacos. Las células pueden cultivarse *in vivo* o *in vitro*.

[0109] El término "selectivamente reactivo", respecto a un antígeno, se refiere a la asociación preferente de un anticuerpo, en su totalidad o en parte, con una célula o un tejido que porta el antígeno y no con células que carecen del antígeno. Por supuesto, se admite que es posible un cierto grado de interacción inespecífica entre una molécula y una célula o tejido que no sea su diana. Sin embargo, la reactividad selectiva puede distinguirse como ocasionada a través del reconocimiento específico del antígeno. Aunque los anticuerpos selectivamente reactivos se unan al

antígeno, pueden hacerlo con baja afinidad. Por otro lado, la unión específica resulta en una asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo y las células que portan el antígeno que entre el anticuerpo unido y las células que carecen del antígeno. Típicamente, la unión específica resulta en un aumento de más de dos veces, preferentemente de más de 5 veces, con mayor preferencia de más de 10 veces y con la máxima preferencia de más de 100 veces, de la cantidad de anticuerpo unido (por unidad de tiempo) a una célula o tejido que porta CD22, en comparación con una célula o tejido que carece de CD22. La unión específica a una proteína en estas condiciones requiere un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína concreta. Diversos formatos de inmunoanálisis son apropiados para seleccionar los anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína concreta. Por ejemplo, los inmunoanálisis ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de los formatos de inmunoanálisis que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica.

[0110] La expresión “condiciones inmunológicamente reactivas” se refiere a las condiciones que permiten a un anticuerpo generado contra un epítipo concreto unirse a tal epítipo en un grado detectablemente superior que, y/o con la exclusión sustancial de la unión a sustancialmente todos los demás epítopos. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión del anticuerpo y, típicamente, son aquellas utilizadas en protocolos de inmunoanálisis o aquellas condiciones que se encuentran *in vivo*. Véase Harlow y Lane, cita anterior, para una descripción de los formatos y condiciones de los inmunoanálisis. Preferentemente, las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los procedimientos de la presente invención son “condiciones fisiológicas”, lo que se refiere a las condiciones (p. ej., temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas dentro de un mamífero vivo o una célula de mamífero. Mientras que se admite que algunos órganos están sometidos a condiciones extremas, el entorno en el interior de los organismos y las células presenta normalmente un pH de aproximadamente 7 (es decir, de pH 6,0 a pH 8,0, más típicamente un pH de 6,5 a 7,5), contiene agua como disolvente principal y se encuentra a una temperatura por encima de 0°C y por debajo de 50°C. La osmolaridad está dentro del intervalo que permite la viabilidad y la proliferación celular.

EXOTOXINA DE *PSEUDOMONAS*

[0111] La exotoxina A de *Pseudomonas* (“PE”) nativa es una proteína monomérica (peso molecular de 66 kDa) extremadamente activa segregada por *Pseudomonas aeruginosa* que inhibe la síntesis de proteínas en las células eucariotas. La secuencia de la PE nativa se expone en la SEQ ID NO:1 de la patente de los EE. UU. n° 5.602.095, incorporada por referencia en este documento. El modo de acción es la inactivación de la ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2). La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan concertadamente para causar toxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) ocasiona la unión a la célula. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación al citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) ocasiona la ADP-ribosilación del factor de elongación 2. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) permanece sin definir, aunque una gran parte de este, los aminoácidos 365-380, pueden eliminarse sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall y col., J. Biol. Chem. 264: 14256-61 (1989).

[0112] Los términos “exotoxina de *Pseudomonas*” y “PE” se usan típicamente en este documento para referirse a una PE que ha sido modificada a partir de la proteína nativa para reducir o eliminar la toxicidad inespecífica. En la técnica se conocen numerosas de estas modificaciones, que incluyen, pero no se limitan a la eliminación del dominio Ia, diversas deleciones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de un solo aminoácido y la adición de una o más secuencias al extremo carboxilo, como KDEL (SEQ ID NO:2) y REDL (SEQ ID NO:3). Véase Siegall y col., J. Biol. Chem. 264: 14256-14261 (1989). Los fragmentos citotóxicos de la PE incluyen aquellos que son citotóxicos con o sin un posterior procesamiento proteolítico o de otro tipo en la célula diana (p. ej., como proteína o preproteína). Los fragmentos citotóxicos de la PE incluyen PE40, PE38 y sus variantes PE38QQR y PE38KDEL (en la que PE38 tiene la secuencia KDEL, SEQ ID NO:2, añadida al extremo C) y PE35, tal como se discute a continuación. En una realización preferida, el fragmento citotóxico de la PE retiene al menos el 20%, preferentemente al menos el 40%, con mayor preferencia al menos el 50%, incluso con mayor preferencia el 75%, con mayor preferencia al menos el 90% y aún con mayor preferencia el 95% de la citotoxicidad de la PE nativa. En las realizaciones preferidas especialmente, el fragmento citotóxico tiene al menos la citotoxicidad de la PE nativa y preferentemente más.

[0113] En las realizaciones preferidas, la PE se ha modificado para reducir o eliminar la unión celular inespecífica, frecuentemente por deleción del dominio Ia, como se expone en la patente de los EE. UU. 4.892.827, aunque esto también puede lograrse, por ejemplo, mediante la mutación de ciertos restos del dominio Ia. La patente de los EE. UU. 5.512.658, por ejemplo, desvela que una PE mutada en la que el dominio Ia está presente, pero en la que los restos básicos del dominio Ia en las posiciones 57, 246, 247 y 249 se han sustituido por restos ácidos (ácido glutámico o “E”) muestran una citotoxicidad inespecífica muy disminuida. Esta forma mutante de la PE se denomina a veces “PE4E”.

5 [0114] PE40 es un derivado truncado de la PE descrito previamente en la técnica. Véase Pai y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3358-62 (1991); Kondo y col., J. Biol. Chem. 263: 9470-9475 (1988). PE35 es un fragmento de 35 kDa del extremo carboxilo de la PE en el que se han eliminado los restos aminoacídicos 1-279 y la molécula comienza con una metionina en la posición 280 seguida de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de la PE nativa. PE35 y PE40 se desvelan, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. 5.602.095 y 4.892.827.

10 [0115] En algunas realizaciones preferidas se emplea el fragmento citotóxico PE38. PE38 contiene los dominios de translocación y ADP-ribosilación de la PE, pero no la porción de unión a la célula (Hwang, J. y col., Cell 48: 129-136 (1987)). PE38 es una preproteína truncada de la PE, compuesta de los aminoácidos 253-364 y 381-613 que se activa a su forma citotóxica por procesamiento dentro de una célula (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n° 5.608.039 y Pastan y col., Biochim. Biophys. Acta 1333: C1-C6 (1997)). Por lo tanto, la secuencia de PE38 se conoce en la técnica, pero también podría determinarse fácilmente por el profesional substrayendo los restos indicados de la secuencia conocida de la PE. Los expertos serán conscientes de que, debido a la degeneración del código genético, la secuencia de aminoácidos de PE38, de sus variantes, como PE38KDEL y de los otros derivados de la PE discutidos en este documento pueden ser codificadas por una gran diversidad de secuencias de ácido nucleico, cualquiera de las cuales puede expresarse para dar lugar al polipéptido deseado.

15 [0116] Tal como se señala anteriormente, parte o todo el dominio Ib puede eliminarse y las porciones restantes unirse mediante un enlazante o directamente por un enlace peptídico. Parte de la porción amino del dominio II puede eliminarse. Y el extremo C-terminal puede contener la secuencia nativa de los restos 609-613 (REDLK (SEQ ID NO:4)) o puede contener una variación para la que se ha encontrado que mantiene la capacidad de translocación de la construcción al citosol, como KDEL (SEQ ID NO:2) o REDL (SEQ ID NO:3) y repeticiones de estas secuencias. Véase, p. ej., las patentes de los EE. UU. 5.854.044, 5.821.238 y 5.602.095 y el documento WO 99/51643. Mientras que en las realizaciones preferidas, la PE es PE4E, PE40 o PE38, cualquier forma de la PE de la que se haya eliminado la citotoxicidad inespecífica o reducido a niveles en las que no se produce una toxicidad significativa para las células que no son reconocidas como diana puede usarse en las inmunotoxinas de la presente invención, siempre y cuando siga siendo capaz de translocación y de ribosilación de EF-2 en una célula reconocida como diana.

20 [0117] En las realizaciones preferidas, las moléculas de PE se modifican adicionalmente para tener una sustitución con alanina, glicina, serina o glutamina en lugar del resto aminoacídico presente normalmente en una o más de las posiciones de la molécula de PE expuestas en la Introducción anteriormente. Alanina es la sustitución más preferida.

35 A. Variantes modificadas de manera conservadora de la PE

40 [0118] Queda entendido que la secuencia de la PE nativa y las variantes discutidas anteriormente pueden tener sustituciones conservadoras y retener la capacidad citotóxica y, deseablemente, una reducida antigenicidad en comparación con la secuencia nativa de la PE. En las realizaciones preferidas, las variantes modificadas de la PE o fragmentos citotóxicos de estas tienen al menos el 80% de similitud de secuencia, preferentemente al menos el 85% de similitud de secuencia, con mayor preferencia al menos el 90% de similitud de secuencia y con la máxima preferencia al menos el 95% de similitud de secuencia en cuanto a aminoácidos, con la PE de interés, como PE38.

45 [0119] El término "variantes modificadas de manera conservadora" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico concretas, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o si el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias de ácido nucleico esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cualquier posición en la que un codón especifique una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones del ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son un tipo de variaciones modificadas de manera conservadora. Cualquier secuencia de ácido nucleico en este documento que codifique un polipéptido describe también cualquier posible variación silenciosa del ácido nucleico. El experto reconocerá que todo codón de un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, toda variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

50 [0120] En cuanto a las secuencias de aminoácidos, el experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteren, añadan o eliminen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada serán "variantes modificadas de manera conservadora" cuando la alteración resulte en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

B. Análisis de la citotoxicidad o la antigenicidad de la PE

5 [0121] Las exotoxinas de *Pseudomonas* empleadas en la invención pueden analizarse en cuanto al nivel deseado de citotoxicidad mediante ensayos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, la citotoxicidad de los fragmentos citotóxicos de la PE y las variantes modificadas de manera conservadora de tales fragmentos puede analizarse fácilmente. La citotoxicidad de un gran número de moléculas de PE candidatas puede analizarse simultáneamente por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la citotoxicidad de las moléculas candidatas puede analizarse en subgrupos. Los subgrupos de las moléculas candidatas que reaccionen positivamente pueden subdividirse continuamente y volver a analizarse hasta identificar el(los) fragmento(s) citotóxicos deseados. Estos procedimientos permiten el cribado rápido de numerosos fragmentos citotóxicos o variantes conservadoras de la PE. La antigenicidad puede analizarse, por ejemplo, por los procedimientos expuestos en los ejemplos de este documento.

Conjugación con el anticuerpo

15 [0122] En una realización no recombinante de la invención, una molécula de reconocimiento, como un anticuerpo, se enlaza a una molécula de PE de la presente invención mediante cualquier serie de procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Con las moléculas de PE de la presente invención pueden usarse procedimientos de unión tanto covalentes como no covalentes.

20 [0123] El procedimiento para unir una molécula de PE a un anticuerpo u otra molécula de reconocimiento ("MR") variará en función de la estructura química de la MR. Típicamente, los polipéptidos contienen diversos grupos funcionales; p. ej. ácido carboxílico (COOH), grupos amino (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH) libres, que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado de un anticuerpo, por ejemplo, para dar lugar a la unión de la molécula de PE.

25 [0124] Alternativamente, el anticuerpo u otra MR se modifican para exponer o unirse a grupos funcionales reactivos adicionales. La modificación puede suponer la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazantes como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, EE. UU.

30 [0125] Un "enlazante", tal como se usa en este documento, es una molécula que se usa para empalmar la MR a la molécula de PE. El enlazante es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con la molécula efectora. Los enlazantes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a enlazantes carbonados de cadena lineal o ramificada, enlazantes carbonados heterocíclicos o enlazantes peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los enlazantes pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (p. ej., a través de un enlace disulfuro con cisteína). Sin embargo, en una realización preferida, los enlazantes se unirán a los grupos amino y carboxilo del carbono α de los aminoácidos terminales.

40 [0126] En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula de PE de la MR cuando el inmunoconjugado ha alcanzado el sitio diana. Por lo tanto, en estas circunstancias, los inmunoconjugados comprenderán enlaces escindibles en la proximidad del sitio diana. La escisión del enlazante para liberar la molécula de PE de la MR puede provocarse por actividad enzimática o por condiciones a las que se somete al inmunoconjugado bien dentro de la célula diana o en la proximidad del sitio diana. Cuando el sitio diana es un tumor, puede usarse un enlazante que sea escindible en las condiciones presentes en el sitio del tumor (p. ej., al quedar expuesto a enzimas asociadas al tumor o a pH ácido).

PRODUCCIÓN DE INMUNOCONJUGADOS

50 [0127] Los inmunoconjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a moléculas en las que hay un enlazamiento covalente de una molécula de PE con un anticuerpo u otro agente de reconocimiento. La elección de un agente de reconocimiento concreto depende de la célula concreta que ha de reconocerse como diana. Con las moléculas de PE proporcionadas en este documento, un experto puede construir fácilmente diversos clones que contengan ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, como ácidos nucleicos que difieren en su secuencia pero que codifican la misma secuencia de PE y anticuerpo. Por lo tanto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican conjugados de anticuerpos y PE y proteínas de fusión de estos.

A. Procedimientos recombinantes

60 [0128] Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden prepararse por cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, la clonación de las secuencias apropiadas por síntesis química directa por procedimientos como el método del fosfotriéster de Narang y col., Meth. Enzimol. 68: 90-99 (1979); el método del fosfodiéster de Brown y col., Meth. Enzimol. 68:109-151 (1979); el método de la dietilfosforamidita de Beaucage y

col., Tetra. Lett. 22: 1859-1862 (1981); el método del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetra. Lett. 22(20): 1859-1862 (1981), p. ej. mediante un sintetizador automático tal como se describe, por ejemplo en Needham-VanDevanter y col., Nucl. Acids. Res. 12: 6159-6168 (1984), y el procedimiento del soporte sólido de la patente de los EE. UU. n° 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este puede convertirse en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria o por polimerización con una polimerasa de ADN con la hebra sencilla como molde. El experto reconocerá que mientras que la síntesis química de ADN está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, es posible obtener secuencias de mayor longitud mediante la ligación de secuencias más cortas.

5
10
15
20
[0129] En una realización preferida, las secuencias de ácido nucleico de esta invención se preparan por técnicas de clonación. Algunos ejemplos de técnicas apropiadas de clonación y secuenciación, así como instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de numerosos ejercicios de clonación, se encuentran en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª edición), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Berger y Kimmel (eds.), GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, Academic Press, Inc., San Diego, CA, EE. UU. (1987) o Ausubel y col., (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY, EE. UU. (1987). La información de los productos de los fabricantes de reactivos biológicos y equipo experimental proporciona también información útil. Tales fabricantes incluyen SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO, EE. UU.), R&D Systems (Minneapolis, MN, EE. UU.), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ, EE. UU.), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA, EE. UU.), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EE. UU.), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, EE. UU.), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen, San Diego, CA, EE. UU. y Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.), así como numerosas otras fuentes conocidas por el experto.

25
30
[0130] Los ácidos nucleicos que codifican la PE nativa pueden modificarse también para formar los inmunoconjugados de la presente invención. La modificación por mutación dirigida es bien conocida en la técnica. Los ácidos nucleicos que codifican la PE pueden amplificarse por procedimientos "*in vitro*". Los procedimientos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), el sistema autosostenido de replicación de secuencias (3SR). Los expertos conocen también una amplia variedad de procedimientos de clonación, células hospedadoras y metodologías para la amplificación *in vitro*.

35
40
[0131] En una realización preferida, los inmunoconjugados se preparan por inserción del ADNc que codifica un anticuerpo u otra MR elegidos en un vector que comprende el ADNc que codifica una PE deseada de la invención. La inserción se realiza de modo que el agente de reconocimiento (para facilitar la discusión, la discusión en este documento asumirá que el agente de reconocimiento es un Fv, aunque podría sustituirse por otros agentes de reconocimiento con el mismo efecto) y la PE se leen en fase, es decir, dando lugar a un polipéptido continuo que contiene una región Fv funcional y una región PE funcional. En una realización preferida especialmente, el ADNc que codifica una PE de la invención se liga a un scFv, de tal modo que la toxina se localiza en el extremo carboxilo del scFv. En otras realizaciones preferidas, el ADNc que codifica una PE de la invención se liga a un scFv de tal modo que la toxina se localiza en el extremo amino del scFv.

45
50
55
60
[0132] Una vez que los ácidos nucleicos que codifican una PE, un anticuerpo o un inmunoconjugado de la presente invención se han aislado y clonado, es posible expresar la proteína deseada en una célula modificada de manera recombinante, como células de bacterias, plantas, levaduras, insectos y mamíferos. Se espera que los expertos en la técnica tengan conocimiento de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas, como *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levaduras y diversas células de eucariotas superiores como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y de mieloma. No se intentarán describir en detalle los diversos procedimientos conocidos para la expresión de proteínas en procariotas ni eucariotas. Brevemente, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican las proteínas aisladas de la invención se conseguirá típicamente mediante la ligación operativa del ADN o el ADNc a un promotor (constitutivo o inducible), seguida de su incorporación en una casete de expresión. Las casetes pueden adecuadas para la replicación e integración en procariotas o en eucariotas. Las casetes de expresión típicas contienen terminadores de transcripción y de traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Para obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión a ribosomas para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli*, esto incluye un promotor como los promotores T7, *trp*, *lac* o λ , un sitio de unión a ribosomas y preferentemente una señal de terminación de la transcripción. Para células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y preferentemente un potenciador derivado de genes de inmunoglobulinas, SV40, citomegalovirus y una señal de poliadenilación y pueden incluir secuencias donadoras yceptoras de corte y empalme. Las casetes de la invención pueden transferirse a la célula hospedadora elegida por procedimientos bien conocidos como la transformación por cloruro de calcio o la electroporación para *E. coli* y el tratamiento con fosfato de calcio, la electroporación o la lipofección para células de

mamíferos. Las células transformadas con las casetes pueden seleccionarse por la resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en las casetes, como los genes *amp*, *gpt*, *neo* e *hyg*.

5 [0133] El experto reconocerá que es posible hacer modificaciones en un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención (es decir, PE o un inmunoconjugado formado a partir de una PE de la invención) sin disminuir su actividad biológica. Algunas modificaciones pueden hacerse para facilitar la clonación, la expresión, o la incorporación de la molécula de reconocimiento en una proteína de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina añadida al extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, aminoácidos adicionales colocados en cualquiera de los extremos para crear sitios de restricción localizados convenientemente o aminoácidos adicionales (como poli-His) para facilitar las etapas de purificación.

10 [0134] Además de mediante procedimientos recombinantes, los inmunoconjugados y las PE de la presente invención pueden construirse también en parte o en su totalidad mediante síntesis peptídica estándar. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de la presente invención de menos de 50 aminoácidos de longitud puede realizarse mediante la unión del aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble, seguida de la adición secuencial de los aminoácidos restantes de la secuencia. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen en Barany y Merrifield, THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY. Vol. 2: SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS, parte A, págs. 3-284; Merrifield y col., J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2156 (1963) y Stewart y col., SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2ª edición, Pierce Chem. Co., Rockford, IL, EE. UU. (1984). Es posible sintetizar proteínas de mayor longitud por condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Los procedimientos para formar enlaces peptídicos por activación de un extremo carboxilo terminal (p. ej., mediante el agente de acoplamiento *N*, *N*'-diciclohexilcarbodiimida) son conocidos para los expertos.

25 B. Purificación

30 [0135] Una vez expresados, los inmunoconjugados y PE recombinantes de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, como precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna y similares (véase generalmente R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, NY, EE. UU. (1982). Se prefieren composiciones sustancialmente puras con una homogeneidad de al menos aproximadamente el 90-95% y una homogeneidad del 98 al 99% es la más preferida para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad, según se desee, si han de usarse terapéuticamente, los polipéptidos no deberán contener sustancialmente ninguna endotoxina.

35 [0136] Los procedimientos para la expresión de anticuerpos de una sola cadena y/o su plegamiento para obtener una forma activa apropiada, incluidos los anticuerpos de una sola cadena de bacterias como *E. coli*, han sido descritos y son bien conocidos y aplicables a los anticuerpos de esta invención. Véase Buchner y col., Anal. Biochem. 205: 263-270 (1992); Pluckthun, Biotechnology 9: 545 (1991); Huse y col., Science 246: 1275 (1989) y Ward y col., Nature 341: 544 (1989), todos ellos incorporados por referencia en este documento.

40 [0137] Frecuentemente, las proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* o de otras bacterias se aíslan de cuerpos de inclusión y requieren la solubilización mediante desnaturizantes fuertes y un subsiguiente plegamiento. Durante la etapa de solubilización, tal como es bien conocido en la técnica, debe haber presente un agente reductor para separar los puentes disulfuro. Un tampón de ejemplo con un agente reductor es: Tris 0,1 M pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE (ditioeritrol) 0,3 M. La reoxidación de los puentes disulfuro puede tener lugar en presencia de reactivos tiólicos de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, tal como se describe en la publicación de Saxena y col., Biochemistry 9: 5015-5021 (1970), incorporada por referencia en este documento, y especialmente tal como describen Buchner y col., cita anterior.

45 [0138] Típicamente la renaturalización se consigue por dilución (p. ej., 100 veces) de la proteína desnaturizada y reducida en el tampón de plegamiento. Un tampón de ejemplo es Tris 0,1 M pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8 mM y EDTA 2 mM.

50 [0139] Como modificación del protocolo de purificación de anticuerpos de dos cadenas, las regiones de las cadenas pesada y ligera se solubilizan y se reducen por separado y después se combinan en la disolución de plegamiento. Se obtiene un rendimiento preferido cuando estas dos proteínas se mezclan en una razón molar tal que no se sobrepasa un exceso molar de cinco veces una proteína respecto a la otra. Es deseable la adición de un exceso de glutatión oxidado o de otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular a la disolución de plegamiento después de haber finalizado la reorganización redox.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ADMINISTRACIÓN

5 [0140] Las composiciones de inmunoconjugados de esta invención (es decir, la PE enlazada a un anticuerpo) son especialmente útiles para la administración por vía parenteral, como la administración por vía intravenosa o la administración en una cavidad corporal.

10 [0141] Normalmente, las composiciones para administración comprenderán una disolución del anticuerpo y/o inmunoconjugado disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Pueden usarse diversos vehículos acuosos, p. ej., disolución salina tamponada y similares. Estas disoluciones son estériles y generalmente no contienen materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de la proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de líquido, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo de administración concreto seleccionado y las necesidades del paciente.

20 [0142] Por lo tanto, una dosis típica de una composición de inmunotoxina de la presente invención para la administración por vía intravenosa será de aproximadamente 0,1 a 10 mg por paciente y día. También pueden usarse dosis de 0,1 hasta aproximadamente 100 mg por paciente y día. Los procedimientos exactos para la preparación de composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen más detalladamente en publicaciones como REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 19ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania. EE. UU. (1995).

25 [0143] Las composiciones de la presente invención pueden administrarse para tratamiento terapéutico. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que sufre una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o, al menos, detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para satisfacer esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado de salud general del paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es la que proporciona el alivio subjetivo de un síntoma(s) o una mejora identificable objetivamente, señalada por el médico o cualquier otro observador cualificado.

30 [0144] Se realizan administraciones individuales o múltiples de las composiciones en función de la dosis y la frecuencia, tal como requiera y tolere el paciente. En cualquier caso, la composición deberá proporcionar una cantidad suficiente de las proteínas de esta invención para tratar eficazmente al paciente. Preferentemente, la dosis se administra una vez, pero puede aplicarse periódicamente hasta obtener un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifiquen la interrupción del tratamiento. Generalmente, la dosis es suficiente para tratar o mejorar los síntomas o signos de la enfermedad sin producir una toxicidad inaceptable para el paciente.

35 [0145] Las formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones de inmunoconjugados de la presente invención pueden prepararse como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas particulados. Para una amplia visión de conjunto de los sistemas de administración de proteínas véase la publicación de Banga, A. J., THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, EE. UU. (1995), incorporada por referencia en este documento. Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se halla dispersado en toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas de tamaño inferior a 1 µm se denominan generalmente nanopartículas, nanosferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, de modo que solamente las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Típicamente, las micropartículas tienen un diámetro aproximado de 100 µm y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véanse, p. ej., las publicaciones de Kreuter, J., COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE. UU., págs. 219-342 (1994) y Tice y Tabibi, TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE. UU., págs. 315-339 (1992), ambas incorporadas por referencia en este documento.

40 [0146] Es posible usar polímeros para la liberación controlada por iones de las composiciones de inmunoconjugados de la presente invención. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para uso en la administración controlada de fármacos (Langer, R., Accounts Chem. Res. 26: 537-542 (1993)). Por ejemplo, el copolímero de bloques poloxámero 407 es un líquido móvil pero viscoso a bajas temperaturas, que forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz

para la formulación y administración sostenida de interleucina 2 y ureasa recombinantes (Johnston y col., Pharm. Res. 9: 425-434 (1992); Pec. y col., J. Parent. Sci. Tech. 44(2): 58-65 (1990)). Alternativamente, se ha usado hidroxapatito como microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema y col., Int. J. Pharm. 112: 215-224 (1994)). En otro aspecto adicional se usan liposomas para la liberación controlada así como para la localización específica del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri y col., LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, EE. UU. (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas. Véanse, p.ej., las patentes de los EE. UU. n^{os} 5.055.303, 5.188.837, 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, 4.957.735 y 5.019.369, 5.055.303, 5.514.670, 5.413.797, 5.268.164, 5.004.697, 4.902.505, 5.506.206, 5.271.961, 5.254.342 y 5.534.496, cada una de las cuales está incorporada por referencia en este documento.

[0147] Entre los diversos usos de las inmunotoxinas de la presente invención se cuentan una diversidad de estados de enfermedad causados por células humanas específicas que pueden eliminarse por la acción tóxica de la proteína de fusión.

USOS *IN VITRO*

[0148] En otra realización, esta invención proporciona kits para la eliminación de células diana *in vitro* o *ex vivo* mediante las PE de la invención. Por ejemplo, pueden usarse inmunotoxinas que comprenden una PE de la invención para eliminar células reconocidas como diana de una población de células en un cultivo. Así por ejemplo, las células cultivadas de un paciente con un cáncer que expresa CD22 pueden depurarse de las células cancerosas poniendo en contacto el cultivo con inmunotoxinas que usan anticuerpos dirigidos contra CD22 como fracción de reconocimiento.

[0149] En algunos casos, las células diana pueden estar contenidas dentro de una muestra biológica. Una "muestra biológica", tal como se usa en este documento, es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene células diana y células que no son diana. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a tejidos de biopsia, sangre y células sanguíneas (p. ej., leucocitos). Típicamente, una muestra biológica se obtiene de un eucariota pluricelular, preferentemente un mamífero como una rata, un ratón, una vaca, un perro, una cobaya o un conejo y con mayor preferencia, un primate como un macaco, un chimpancé o un humano. Con la máxima preferencia, la muestra es de un humano.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0150] Este ejemplo expone los procedimientos experimentales usados en los estudios reflejados en la figura 1 y los resultados de estos.

Procedimiento experimental

[0151] **ELISA con captura de inmunocomplejos ("ICC"-ELISA).** El ensayo ICC-ELISA detecta reacciones Ag-Ab en disolución. Se recubrieron placas de microtitulación con 2 µg/ml de CD25-Fc de conejo (el dominio extracelular α de la CD25 humana fusionado con el Fc de la IgG1 de conejo) o con CD22-hFc (el dominio extracelular de la CD22 humana fusionado con el Fc de la IgG1 humana) en tampón de fosfato salino (PBS) durante la noche a 4°C. En un tubo aparte se prepararon diluciones seriadas de muestras del Ab en tampón de bloqueo y se mezclaron con 2 µg/ml de inmunotoxina dirigida contra CD22 o contra CD25. Las placas se lavaron y después las mezclas inmunotoxina-Ab se transfirieron a pocillos individuales. Las placas se incubaron más de 1 h a temperatura ambiente ("TA"). Los inmunocomplejos capturados en pocillos se detectaron mediante con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano ("HRP"). Después de una incubación de 1 h a TA, las placas se lavaron y se añadió el sustrato tetrametilbenzidina ("TMB"). Después de 10 min se añadió ácido sulfúrico 1M. La absorbancia se midió a 450 nm con 600 nm como referencia.

[0152] **ELISA con recubrimiento directo ("DC"-ELISA).** El ensayo DC-ELISA no detecta anticuerpos dirigidos contra epítomos conformacionales que se destruyen por la adsorción a la placa, pero puede detectar anticuerpos no conformacionales. Se recubrieron placas de microtitulación con 2 µg/ml de inmunotoxina en PBS durante la noche a 4°C. Después del lavado, se añadieron diluciones seriadas del Ab en tampón de bloqueo y se incubó durante la noche a 4°C. La etapa de detección usó los mismos anticuerpos secundarios que el ICC-ELISA.

[0153] **Muestras de suero.** Los pacientes con cánceres de células B (BL1, BL2 y BL3) recibieron BL22 por vía intravenosa en los días 1, 3 y 5, como parte de un estudio clínico de fase I realizado en el Instituto Nacional del Cáncer. Después de tres ciclos de tratamiento se obtuvieron muestras de suero. Los títulos de anticuerpos dirigidos contra PE38 se determinaron mediante ICC y DC-ELISA. Estos tres sueros de pacientes presentaron más del 75%

de actividad de neutralización, basada en los criterios de neutralización para el estudio clínico de fase I. Los pacientes con mesotelioma ("Meso 1" y "Meso 2") recibieron la inmunotoxina SS1P. El suero se obtuvo después de un ciclo de tratamiento. Se realizaron ensayos ICC y DC ELISA y ensayos de neutralización. El paciente con cáncer epitelial recibió LMB-9. El suero se obtuvo después de un ciclo de tratamiento. Se realizaron ensayos ICC y DC ELISA y ensayos de neutralización.

[0154] Los datos representativos de las respuestas de anticuerpos en pacientes tratados con tres inmunotoxinas diferentes, BL22, SS1P y LMB9, se muestran en la figura 1. BL22, SS1P, LMB9 y LMB2 son los nombres de inmunotoxinas específicas conocidas en la técnica, cada una de las cuales usa PE38 como la porción tóxica y que usan como porción de reconocimiento una región Fv de un anticuerpo, como sigue: (i) para BL22, una Fv de un anticuerpo contra CD22, (ii) para SS1P, una Fv de un anticuerpo contra mesotelina, (iii) para LMB9, una Fv de un anticuerpo contra el antígeno Y de Lewis y (iv) para LMB2, una Fv de un anticuerpo contra CD25. Cada una de estas inmunotoxinas es o ha sido objeto de un estudio clínico. Se recogieron muestras de suero de cada paciente y se evaluó su actividad de neutralización (basada en los criterios de los estudios clínicos) en un ensayo de muerte celular (figura 1, gráficos de barras) y su reactividad con inmunotoxinas en diferentes ensayos ELISA (figura 1, gráficos de líneas). La inmunotoxina usada para el tratamiento y el tipo de paciente se indican en la parte superior de los paneles de la figura 1. El número de ciclos de tratamiento administrados al paciente antes de la recogida del suero y los días después del último ciclo de tratamiento se muestran en los paneles de los gráficos de líneas de la figura 1. Las muestras de pacientes que generaron anticuerpos neutralizantes, de modo que no pudieron continuar el tratamiento (> 75% de neutralización de inmunotoxinas). La neutralización se evaluó no solamente con la inmunotoxina usada para el tratamiento sino también con diferentes inmunotoxinas con distintas regiones Fv. La inmunotoxina usada para el ensayo de neutralización se indica en cada barra.

[0155] Las actividades de neutralización observadas al usar dos inmunotoxinas diferentes fueron muy similares (en los casos de BL1 y BL2), lo que indica que la actividad de neutralización se debe fundamentalmente al anticuerpo que reconoce PE38.

[0156] Los gráficos de líneas de la figura 1 muestran los anticuerpos en las muestras de suero determinados por dos ensayos ELISA diferentes. Los rombos muestran las señales del ensayo ICC-ELISA. El ensayo ICC-ELISA puede medir los anticuerpos que reaccionan con la forma nativa de PE38. Los círculos muestran los resultados de los ensayos DC-ELISA. En todos los casos, el ICC-ELISA dio señales más intensas que el DC-ELISA, lo que indica que los anticuerpos dirigidos contra PE38 fueron el tipo dominante generado en los pacientes. Los pacientes tratados con diferentes inmunotoxinas y con diferentes cánceres mostraron respuestas de anticuerpos similares en estos ensayos.

Ejemplo 2

Procedimiento experimental

[0157] Se produjeron MAb contra PE38 por un protocolo de fusión estándar. Se inmunizaron las cepas de ratones Balb/c, A/J y C3H, cuatro a cinco veces por inyección de 4-10 µg de diversas inmunotoxinas ("IT") a intervalos de dos semanas. Cuatro semanas después de la inyección final, los ratones recibieron una inyección de refuerzo de 4 µg de IT y cuatro días después se llevó a cabo la fusión. Se aislaron células del bazo y se fusionaron con células de mieloma SP2/0. Después de la selección en un medio con hipoxantina, aminopterina y timidina, se analizó la producción de anticuerpos específicos en los sobrenadantes mediante ICC-ELISA y/o un ensayo de neutralización y/o ELISA con placas de microtitulación recubiertas con una disolución de 1 mg/ml de IT en PBS. Las inmunoglobulinas unidas se detectaron con anticuerpo de ratón dirigido contra IgG κ o con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano (Jackson). Los clones positivos se usaron para la producción de anticuerpos en los sobrenadantes de los cultivos.

Estrategia de inmunización

[0158] Para obtener anticuerpos monoclonales que reaccionaran con epítomos conformacionales en la estructura nativa de la inmunotoxina, inmunizamos ratones con diversas inmunotoxinas que contenían PE38 y guardamos aquellos hibridomas que solamente reaccionaron con PE38 en el ensayo ELISA indirecto. Para obtener un juego difuso de anticuerpos, inmunizamos tres cepas de ratones (Balb/c, A/J y CeH Hej) con varias inmunotoxinas diferentes. Comenzamos las inmunizaciones con anti-Tac(dsFv)-PE38 y encontramos que la producción de hibridomas fue baja, aunque los títulos de suero eran altos. Asumimos que la inmunotoxina estaba dañando de algún modo las células del bazo y produciendo un bajo rendimiento de hibridomas. Para evitar la posible destrucción de las células B específicas por medio de las IgG de superficie, también inmunizamos ratones con formas mutantes de la inmunotoxina que tenían una actividad citotóxica muy baja debido a mutaciones puntuales en las posiciones 553 (E a D) o 276 (R a G). Estas mutaciones se localizan en distintos sitios en la superficie de PE38. Por lo tanto, todos los posibles epítomos de PE38 deberían estar presentes en al menos uno de los mutantes.

5 [0159] Se realizaron un total de 16 fusiones, con 22 ratones inmunizados. Mantuvimos 60 hibridomas que mostraron títulos altos en el ICC-ELISA. La tabla 2, a continuación, muestra una comparación de los títulos de estos MAb en ensayos DC-ELISA e ICC-ELISA. Todos los MAb mostraron un título mayor en el ICC-ELISA que en el DC-ELISA, lo que indica que el panel de MAb representa predominantemente la respuesta de anticuerpos de los pacientes detectada en el ICC-ELISA.

10 [0160] Todos los anticuerpos fueron del isotipo IgG1, excepto un IgG2a (IP16) y tres IgG2b (IP36, IP37 e IP49). La afinidad de cada MAb se determinó mediante el sistema Biacore, en que el MAb se capturó en un chip por un anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de ratón y la inmunotoxina BL22 se dejó fluir sobre el chip (Canziani y col., "Kinetic screening of antibodies from crude hybridoma samples using Biacore", Anal. Biochem. 325: 301-307 (2004)). Se muestran las Kd, que fueron de 0,0004 a 81 nM.

15 Ejemplo 3

[0161] Este ejemplo expone los procedimientos experimentales usados en los estudios reflejados en la figura 2 y los resultados obtenidos en estos.

20 Procedimiento experimental

25 [0162] Se examinó la competencia mutua de todos los pares posibles de MAb dirigidos contra PE38 tal como se ha descrito previamente (Nagata y col., "Rapid grouping of monoclonal antibodies based on their topographical epitopes by a label-free competitive immunoassay", J. Immunol. Methods 292: 141-155 (2004)). Se recubrieron placas de microtitulación (MaxiSoap, Nalge Nunc, Rochester, NY, EE. UU.) con 200 ng/50 µg por pocillo de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón (Jackson Immuno Research, Grove, PA, EE. UU.) en PBS durante la noche a 4°C. Después del lavado se añadieron 2 µg/ml del MAb indicador, n° 1, (sobrenadante del cultivo de hibridoma) a cada pocillo y se incubó durante la noche a 4°C. En un tubo separado se diluyó el MAb competidor, n° 2, (6 µg/ml) en tampón de bloqueo y se mezcló con 10 ng/ml de la IT dirigida contra CD30, T6 y se incubó durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron dos veces y después la mezcla de IT y MAb n° 2 se transfirió a cada pocillo (50 µg/ml). Como estándares, se pusieron diluciones de los antígenos en tampón de bloqueo (1-10 ng/ml por IT) en la misma placa. Las placas se incubaron durante 1 h a TA y se lavaron dos veces. Los inmunocomplejos capturados en las placas se hicieron reaccionar con 50 µl por pocillo de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con HRP (Jackson). Después de una incubación durante 2 h a TA, las placas se lavaron y se añadió el sustrato tetrametilbenzidina (kit del sustrato TMB, Pierce, 100 µl por pocillo). La reacción enzimática se detuvo después de 10-20 min mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 2 N por pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm, con 600 nm como referencia.

40 Ejemplo 4

Mapeo de epítomos topográficos

45 [0163] Mediante el procedimiento anterior llevamos a cabo el mapeo de epítomos topográficos basado en la competencia mutua de todos los pares de epítomos posibles. Este procedimiento no solo identifica los anticuerpos que se unen al mismo epítomo, sino que también proporciona datos cuantitativos sobre la fuerza de las interacciones. Estos datos se muestran en la figura 2, con un código de colores en el que rojo representa una competencia muy fuerte y azul claro ausencia de competencia.

50 [0164] Los datos demuestran que hay siete grupos epitópicos principales que pueden dividirse además en trece subgrupos mediante un índice de estabilidad del agrupamiento. Los grupos epitópicos son claramente discretos, con relativamente poco solapamiento, lo que indica que hay un número limitado de epítomos en la molécula de PE38 que son muy inmunógenos.

55 [0165] Este ejemplo expone los procedimientos usados en los estudios cuyos resultados se indican en la figura 3 y los resultados de estos.

60 [0166] Para confirmar que hay un número limitado de epítomos en PE38, usamos el sistema Biacore. La inmunotoxina M1 se diluyó a 50 µg/ml en un tampón de acoplamiento de aminas y se inmovilizó sobre un chip sensor Biacore CM5 (Laricchia y col., "Epitope mapping analysis of apolipoprotein B-100 using a surface plasmon resonance-based biosensor", Biosens. Bioelectron. 16: 963-969 (2001)). Cada uno de los MAb se purificó con Sepharose™ con proteína G, se diluyó a 50 µg/ml en PBS y se inyectó sobre la superficie del chip a 10 µl/min. Los MAb que reaccionaron con diferentes epítomos se unieron aditivamente a la PE38 en el chip, pero los MAb asignados al mismo grupo epitópico no aumentaron la señal porque el epítomo ya estaba ocupado por el MAb unido previamente. En experimentos diferentes se demostró que los MAb a 50 µg/ml (~= 500 nM) eran suficientes para

saturar los sitios de unión. Además, el nivel de unión de una mezcla de IP36, IP4, IP21 e IP69 es prácticamente el mismo que el nivel de unión acumulado que se consigue con las inyecciones secuenciales.

5 [0167] Estos datos confirman que los epítomos identificados en la figura 2 son epítomos no solapantes. Al menos cuatro anticuerpos diferentes pueden unirse simultáneamente a la molécula de PE38.

Ejemplo 5

10 [0168] Este ejemplo expone el procedimiento usado en los estudios de identificación de la localización de los epítomos de PE38. Los resultados de los estudios se exponen en la figura 4.

Procedimiento experimental

ELISA competitivo para determinar la unión de MAb a una serie de mutantes de PE38

15 [0169] El efecto competitivo de cada inmunotoxina mutante sobre la unión de cada MAb a la inmunotoxina que contiene PE38 natural se determinó en un ensayo ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación con 3 µg/ml de mesotelina-rFc (el fragmento Fc de la IgG1 de conejo fusionado con el dominio extracelular de la mesotelina humana) en PBS durante la noche a 4°C. Después del lavado, se añadieron 2 µg/ml de SS1P en tampón de bloqueo a cada pocillo y se incubó durante la noche a 4°C. Una serie de diluciones con un factor de dilución de 4 de cada mutante (0,04-10.000 ng/ml) se mezcló con cada MAb en tubos separados a 4°C durante la noche para alcanzar el equilibrio. La concentración de cada MAb en las mezclas se había determinado previamente en ensayos ELISA independientes sin los competidores como los valores que daban las señales semimáximas en el ELISA. El MAb no complejoado en las mezclas fue capturado entonces por la inmunotoxina SS1P (un fragmento dsFv de un anticuerpo dirigido contra mesotelina fusionado con la PE38 natural) con la que se había recubierto la placa a través de la proteína de fusión mesotelina-Fc. Una inmunotoxina mutante tiene un Fv diferente y no puede ser atrapada por la proteína de fusión mesotelina-Fc en las placas. El nivel de MAb libres atrapados por la SS1P dependió de la reactividad cruzada del MAb con el mutante y de la concentración del mutante. Finalmente, la cantidad de MAb asociado con la SS1P se determinó mediante la incubación con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón (H+L) marcado con HRP y a continuación con el sustrato TMB.

Localización de epítomos

35 [0170] Previamente habíamos realizado una serie de mutaciones en PE38 para obtener información sobre la función de estos restos y demostrado que era posible modificar numerosos restos sin una pérdida de función. Usamos estos mutantes y otros nuevos en los que intencionadamente mutamos restos superficiales con largas cadenas laterales hidrófilas a alanina, glicina o glutamina y los usamos para localizar la posición de los epítomos mediante un ensayo de unión competitiva. El resultado se evaluó como reactividad cruzada con la inmunotoxina natural, la cual se definió como el cociente de concentraciones de cada mutante y del tipo natural requeridas para unirse a la misma cantidad de cada MAb (Miller, JJ, Valdes, R., "Methods for calculating cross-reactivity in immunoassays", J. Clin. Immunoassay 15: 97-107 (1992)). Este ensayo no solo mide la unión, sino también cuánto disminuye la unión por la mutación. Los datos en la figura 4 muestran los resultados con 45 mutaciones puntuales diferentes. Aproximadamente la mitad de las mutaciones resultaron en una disminución de la unión de algunos de los anticuerpos. Hay varias características interesantes. Una es que, con frecuencia, las mutaciones puntuales individuales disminuyen la unión de todos los anticuerpos en ese grupo epitópico. Otra es que más de una mutación puede disminuir la unión de los anticuerpos en un grupo epitópico concreto.

Ejemplo 6

50 [0171] Este ejemplo discute los resultados de los estudios discutidos anteriormente.

[0172] Definimos un aminoácido relacionado con un epítomo como aquel cuya sustitución con alanina o glicina disminuía al menos 20 veces la unión a más de dos MAb asignados al mismo epítomo. Basándonos en este criterio, identificamos N314, E327, E331 y Q332 como aminoácidos relacionados con Ep1. De la misma manera se identificaron P290, R467 y R538, D313, N314 y D324, R432, E431 y R505, R490 y R576, R513 y E548 y K590, respectivamente, como aminoácidos relacionados con Ep2b, 2c, 3, 4a, 5, 6a y 7. Encontramos que pudieron establecerse mutaciones que afectaban a la unión de MAb para diez de los trece subgrupos epitópicos. Tres subgrupos no pudieron identificarse. Esto se debió a no tener suficientes MAb para estudiar o a que ningún mutante mostró una pérdida de unión.

60 [0173] Estos datos indican que podemos cambiar la antigenicidad de PE38 mediante la introducción de mutaciones que destruyen el epítomo. Se espera que las inmunotoxinas con estas mutaciones sean menos inmunógenas.

Ejemplo 7

5 [0174] Este ejemplo expone los procedimientos usados para la construcción, producción y purificación de las inmunotoxinas usadas en los estudios descritos en este documento.

10 [0175] Las inmunotoxinas mutadas indicadas en la tabla 3 se prepararon por protocolos estándar, tal como se ha descrito previamente (Pastan y col., "Recombinant immunotoxins in the treatment of cancer", *Methods Mol. Biol.*, 248: 503-518 (2004)). La mayoría de las mutaciones se realizaron en la inmunotoxina HA22 (Salvatore y col., "Improved cytotoxic activity towards cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display", *Clin. Cancer Res.* 8: 995-1002 (2002)), pero algunas se hicieron en la inmunotoxina M1(dsFv)-PE38. Las mutaciones se realizaron por el método de Kunkel con modificaciones de menor importancia. Los componentes de las IT se expresaron en *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) y se acumularon en cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron y plegaron por dilución en un tampón de plegamiento. La proteína monomérica activa se purificó prácticamente hasta homogeneidad a partir de la disolución de plegamiento por cromatografía de intercambio iónico y de exclusión por tamaños, tal como se ha descrito previamente. La concentración de las proteínas se determinó por el ensayo de Bradford (Coomassie Plus, Pierce, Rockford, IL, EE. UU.).

20 Ensayo de citotoxicidad

[0176] La actividad de las IT se evaluó con células de Daudi mediante un ensayo de inhibición de la síntesis de proteínas (inhibición de la incorporación de leucina marcada con tritio en la proteína celular) en placas de 96 pocillos, tal como se ha descrito previamente (Kreitman y col., "Complete regression of human B-cell lymphoma xenografts in mice treated with recombinant anti-CD22 immunotoxin RFB4(dsFv)PE38 at doses tolerated by cynomolgus monkeys", *Int. J. Cancer* 81: 148 (1999)). La actividad de la molécula se define como la CI_{50} , la concentración de la toxina que reduce la incorporación de radioactividad en el 50% en comparación con las células no tratadas con la toxina. La actividad relativa se calculó con inmunotoxinas PE38 naturales como estándar. La mayoría de los mutantes retuvo una buena actividad destructora de células. (Salvatore G. y col., "Improved cytotoxic activity towards cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display", *Clin. Cancer Res.* 8: 995-1002 (2002)).

Ejemplo 8

35 [0177] Este ejemplo discute las localizaciones de las mutaciones relacionadas con epítomos en la estructura de PE38.

40 [0178] Se construyó un modelo de PE38 mediante la extracción de los restos correspondientes a PE38 de una estructura cristalina de la exotoxina A de *Pseudomonas*. (Wedekind, JE y col., "Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity", *J. Mol. Biol.* 314: 823-837 (2001)). Se localizaron todos los aminoácidos mutados. Cuando más de dos MAb asignados al mismo epítomo mostraron una disminución de la unión a un mutante, el resto mutado se identificó como un aminoácido relacionado con un epítomo (los experimentos de unión mostrados en la figura 4).

45 Ejemplo 9

[0179] Se realizó una serie de ensayos de citotoxicidad con las inmunotoxinas preparadas con PE38, en la que se hicieron mutaciones únicas o múltiples de diversos restos en la secuencia de la PE. Para facilitar la comparación, todas las inmunotoxinas usaron la misma fracción de reconocimiento. Los resultados de los estudios se exponen en la tabla 4. La primera columna comienza con "HA22" que es una inmunotoxina construida a partir de un anticuerpo dirigido contra CD22 fusionado con PE38 (véase, p. ej., Salvatore y col., *Clin. Cancer Res.* 8(4): 995-1002 (2002)). Cada designación en la columna 1 por debajo de "HA22" identifica una inmunotoxina que es idéntica a HA22 excepto por la sustitución de uno o más restos de la fracción de PE38. Los restos o los restos que se han mutado se identifican indicando el resto presente normalmente en la posición identificada por el número en el código de una sola letra, el número de la posición y a la derecha del número, el resto introducido en la posición indicada (así por ejemplo, "Q332A" indica que la glutamina que normalmente se encuentra en la posición 332 de la secuencia de 613 aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO:1) se ha mutado a alanina, mientras que R467A indica que la arginina que normalmente se encuentra en la posición correspondiente a la posición 467 de SEQ ID NO:1 se ha mutado a alanina, y así sucesivamente). La segunda columna identifica el epítomo o los epítomos de la PE cuya mutación o combinación de mutaciones tiene el efecto de reducir la inmunogenicidad. La tercera columna, titulada "n° de MAb en este grupo epitópico" identifica cuántos anticuerpos monoclonales ("MAb") se han identificado que se unen a ese epítomo. La siguientes catorce columnas muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo con las diversas inmunotoxinas. Dado que los ensayos se realizaron en momentos diferentes, con

varios tipos de células diferentes, las comparaciones entre la citotoxicidad de las diversas inmunotoxinas solamente pueden hacerse entre las cifras de la misma columna. Los números mostrados en estas columnas son los valores de la CI_{50} de las inmunotoxinas, indicados en ng/ml.

5 **[0180]** La tabla 4 muestra además una serie de combinaciones de mutaciones sucesivas en las que se mutaron primeramente cuatro, después cinco, luego seis, siete y finalmente ocho restos. Los restos concretos se seleccionaron para su mutación porque cada uno de ellos destruye un epítipo diferente de la PE. La figura 5 muestra que la CI_{50} del mutante en el que se combinaron siete mutaciones (el mutante "7X") y la CI_{50} del mutante en el que se combinaron ocho mutaciones (el mutante "8X") estuvieron próximas a la de la inmunotoxina de partida, HA22. El mutante 7X tiene las siguientes sustituciones de los restos aminoacídicos correspondientes a los restos designados de SEQ ID NO:1: R313A, Q332S, R432G, R467A, R490A, R513A y K590S, mientras que el mutante 8X tiene todas estas mutaciones más una mutación E548S. Dado que previamente se observó que las mutaciones seleccionadas destruían la capacidad de los anticuerpos correspondientes a epítipos concretos de reconocer dichos epítipos, se espera que la combinación de mutantes exhiba una inmunogenicidad notablemente reducida en comparación con PE38 y otras variantes de la PE usadas actualmente.

Ejemplo 10

20 **[0181]** La figura 6 muestra los resultados de la evaluación *in vivo* de los efectos del mutante 8X en un tumor humano en un modelo de xenoinjerto en ratón. "CA46" es un linfoma que crece de manera subcutánea como un tumor sólido en ratones. Las células tumorales se introdujeron en los ratones en el día 0. Los ratones se dividieron en grupos que recibieron el vehículo (control) o una de las dos inmunotoxinas en los días 8, 10 y 12. Las inmunotoxinas fueron HA22, una inmunotoxina dirigida contra CD22 que usa PE38 como fracción tóxica, y el mutante 8X, que es el mismo anticuerpo dirigido contra CD22 fusionado con una PE38 que tiene las siguientes sustituciones de los restos aminoacídicos correspondientes a los restos designados de SEQ ID NO:1: R313A, Q332S, R432G, R467A, R490A, R513A, E548S y K590S. La figura 6 muestra que el mutante 8X presentó una citotoxicidad para el tumor CA46 similar a la de la inmunotoxina de partida. Por lo tanto, las PE de la invención pueden emplearse como fracción citotóxica de inmunotoxinas. Considerando el mapeo de epítipos mostrado en la figura 4, se espera además que estas inmunotoxinas tengan notablemente menos inmunogenicidad que las inmunotoxinas preparadas con las PE disponibles actualmente.

Tabla 1. Resumen de la producción de MAb dirigidos contra PE38

Fusión	Inmunización	Refuerzo final	Ratón	Título		Procedimiento de cribado	Número de clones finales (c)
				ELISA recubierto con M1	ICC-ELISA con CD30		
1	M1-iv x 2 + M1-ip x 3	M1-ip	Balb/c, mezcla de dos ratones	10^5		recubierto con M1 recubierto con M1	2
2	M1-iv x 2 + M1-ip x 3	M1-iv	Balb/c, mezcla de dos ratones	10^5		recubierto con M1	0
3	M1-iv x 2 + M1-ip x 3	M1-ip	Balb/c, mezcla de dos ratones	10^5		recubierto con M1 + M1-biotina	0
4	M1-iv x 2 + M1-ip x 3	M1-ip	Balb/c, mezcla de dos ratones	10^5		recubierto con M1 + M1-biotina + ICC con CD30	5
5	M1-iv x 2 + M1-ip x 3	M1-ip	Balb/c, mezcla de dos ratones	10^5		recubierto con M1 + M1-biotina	0
6	M1-ip x 3	M1-ip	Balb/c, mezcla de dos ratones	5×10^4		recubierto con M1 + M1-biotina + ICC con CD30	0

7	M1-ip x 6	D553E-ip	Balb/c	10 ⁵		recubierto con M1 + ICC con CD30	3
8	M1-ip x 4	D553E-ip	Balb/c	5 x 10 ⁴		recubierto con M1 + ICC con CD30	21
9	D553E-ip x 4	D553E-ip	A/J	3 x 10 ³	10 ⁵	recubierto con M1 + ICC con CD30 + neutralización	31
10	R276G-ip x 4	R276G-ip	A/J	10 ⁴	10 ⁵	recubierto con M1 + ICC con CD30 + neutralización	7
11	R276G-ip x 5	R276G-ip	A/J		10 ⁴	recubierto con M1 + ICC con CD30 + neutralización	1
12	R276G-ip x 6	R276G-ip	Balb/c		10 ⁴	recubierto con M1 + ICC con CD30 + neutralización	16
13	D553E-ip x 7	D553E-ip	Balb/c		10 ⁵	ICC con CD30	7
(continuación)							
Fusión	Inmunización	Refuerzo final	Ratón		Título	Procedimiento de cribado	Número de clones finales (c)
14	M1-ip x 4	D553E-ip	C3H Hej		3 x 10 ⁴	ICC con CD30	0
15	M1-ip x 3 + D553E x 2	III-ip	A/J		3 x 10 ⁵	ICC con 30	3
16	M1-ip x 3 + D553E x 2	D553E-ip	A/J		3 x 10 ⁵	ICC con CD30	13

(c) Los clones se seleccionan por su alta afinidad relativa en ICC-ELISA con M40-3 como estándar.

M1: M1(dsFv)-PE38, D553E: mutante de LMB-2 con D553E, R276G: mutante de M1(scFv)PE38 con R276G, III: dominio III

Tabla 2. Lista de MAb estudiados

Nombre	Epítipo	Isotipo	Título (log µl/µg)	Afinidad (nM)
IP43	1a	γ/I	2,6	0,10
IP62	1a	γ/I	2,5	0,2
IP57	1a	γ/I	1,9	0,00039
IP11	1b	γ/I	2,6	6*
IP39	1b	γ/I	2,8	0,93*
IP47	1b	γ/I	2,8	0,47*
IP70	1b	γ/I	2,5	58*
IP48	1b	γ/I	2,7	3,3*
IP1	1b	γ/I	2,6	5,80
IP35	1b	γ/I	2,8	3,70
IP36	1b	γ/I	2,6	3,60
IP42	1b	γ/I	2,5	43
IP34	2a	γ/I	2,7	0,11*
IP29	2b	γ/I	2,8	20
IP63	2b	γ/I	2,7	5
IP2	2b	γ/I	2,7	0,30
IP15	2c	γ/I	2,6	5,3
IP22	2c	γ/I	2,6	3,4*
IP51	2c	γ/I	2,2	3,10
IP76	2c	γ/I	3,0	0,19
IP83	2c	γ/I	2,5	0,43

IP9	3a	γ/I	2,4	4,80
IP18	3a	γ/I	2,5	0,09*
IP16	3a	γ/I	2,5	0,24*
IP32	3a	γ/I	2,7	33
IP44	3b	γ/I	2,5	0,14
IP45	3b	γ/I	2,9	0,47
IP58	3b	γ/I	2,4	0,24
IP7	4a	γ/I	2,7	0,04
IP10	4a	γ/I	2,1	0,04
IP31	4a	γ/I	2,9	0,27*
IP37	4a	γ/I	2,7	1,40
IP49	4a	γ/I	1,7	2,60
IP3	4a	γ/I	2,6	0,00038
IP27	4a	γ/I	2,7	16*
IP72	4a	γ/I	2,8	4,4*
IP14	4b	γ/I	2,6	81
IP82	4b	γ/I	2,7	11*
IP86	4b	γ/I	2,9	0,41*
IP13	5	γ/I	2,6	1,2
IP20	5	γ/I	2,3	0,1

(continuación)

Nombre	Epítipo	Isotipo	Título (log μl/μg)	Afinidad (nM)
IP21	5	γ/I	2,8	1,50
IP28	5	γ/I	2,2	1,70
IP8	5	γ/I	2,4	0,93
IP25	5	γ/I	2,7	1,90
IP55	5	γ/I	2,8	1,10
IP4	6a	γ/I	2,5	0,13*
IP19	6a	γ/I	2,6	3,70
IP24	6a	γ/I	2,3	5,4*
IP40	6a	γ/I	2,7	2,9
IP87	6a	γ/I	2,8	2,3*
IP6	6b	γ/I	2,4	0,13*
IP30	6b	γ/I	2,8	0,044*
IP12	6b	γ/I	2,4	0,82
IP54	7	γ/I	2,9	2,0*
IP73	7	γ/I	2,9	4,8
IP46	7	γ/I	2,7	2,2*
IP52	7	γ/I	2,8	6,8*
IP69	7	γ/I	2,5	0,12*
IP74	7	γ/I	2,8	6,5*

* análisis de unión de complejos

Tabla 3. Actividades de mutantes de PE38 con cambios de aminoácidos únicos (Nota: todos son muy activos)

IT HA22	Actividad relativa (%)
Natural	100
P290A	58
R313A	133
N314A	42
D324A	133
E327A	117
E331A	144
Q332A	176
D403A	19
E431A	140
R432A	194
R458A	63
R467A	93
R490A	150
R505A	144
R513A	106
L516A	140
R538A	188
E548A	23
R576A	100
K590Q	120

Tabla 4. Cl_{50} de las inmunotoxinas preparadas por mutación de la PE en restos que afectan a la unión a diferentes epítomos

IT con los restos designados en la secuencia de la PF	Epítomo	N° de Mab en este grupo epítomico	N° de Mab bloqueados al mutar este resto	Ensayo n° 1 ng/ml	Ensayo n° 2	Ensayo n° 3	Ensayo n° 4	Ensayo n° 5	Ensayo n° 6	Ensayo n° 7	Ensayo n° 8	Ensayo n° 9	Ensayo n° 10	Ensayo n° 11	Ensayo n° 12	Ensayo n° 13	Ensayo n° 14
HA22 (control)		37		1,2	1,0	1,0	3,4	3,3	4	0,2	2,0	0,7	0,9	1,0	1,8	0,44	0,7
N314A*	1	8	8	3,0	2,0												
N314S	1		8		1,1												
Q332A	1		8	0,72													
R467A	2c	3	3	0,72													
R490A	5	3	3	1,5				3,7	6								
R538A*	2c		3	2,1							1,9(?)						
Q332A R490A K590A/K606A/ 613del*	1/5/7				3,0												
K590A	7	3	3			1,0		4,2	5				0,7				
R490A	5/7	3/3	3/3				4,5	6,5			4,4						
K590A*									10								
Q332A	5/1																
R490A*										0,45							
K606A*																	
R490A R538A K590A*	5/2/7										5,0/6,2						
Q332S	1	8	8									0,55	0,7				
R490S*	5	3	3									30					
R538S*	2	3	3									>100					
K590S	7	3	3									0,4					

(continuación)

IT con los restos designados en la secuencia de la PE	Epítipo	N° de Mab en este grupo epítipo	N° de Mab bloqueados al mutar este resto	Ensayo n° 1	Ensayo n° 2	Ensayo n° 3	Ensayo n° 4	Ensayo n° 5	Ensayo n° 6	Ensayo n° 7	Ensayo n° 8	Ensayo n° 9	Ensayo n° 10	Ensayo n° 11	Ensayo n° 12	Ensayo n° 13	Ensayo n° 14
Q332S R467A R490A K590S	1/2c/5/7		17										0,8	0,75			
R313A Q332S R467A R490A K590S	3/1/2c/ 5/7	(5)	22											0,6	1,0		
R313A Q332S R432G R467A R490A K590S	3/1/4a/2c/ 5/7	6	5												0,8		
R313A Q332S R432G R467A R490A R513A K590S	3/1/4a/2c/ 5/6/7															0,7	0,9
R313A Q332S R432G R467A R490A R513A E548S K590S	3/1/4a/2c/ 5/6/6/7																0,8

* / La mutación redujo la citotoxicidad en más del 50%

[0182] Aunque se han proporcionado ejemplos específicos, la descripción anterior es ilustrativa y no restrictiva. Numerosas variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica al revisar esta memoria descriptiva. Por lo tanto, el alcance de la invención no se determinará con referencia a la descripción anterior, sino que deberá determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance completo de equivalentes.

SECUENCIA SEQ ID NO:1

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
 1 5 10 15
 Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
 20 25 30
 Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
 35 40 45
 Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
 50 55 60
 Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
 65 70 75 80
 Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Glu Ala Arg Gly Ser
 85 90 95
 Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
 100 105 110
 Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Glu Leu Ser His
 115 120 125
 Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
 130 135 140
 Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
 145 150 155 160
 Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
 165 170 175
 Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Gln Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
 180 185 190
 Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
 195 200 205
 Leu Ala Gln Glu Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
 210 215 220
 Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
 225 230 235 240
 Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
 245 250 255
 Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
 260 265 270
 Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Gln Glu Cys Gly
 275 280 285
 Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
 290 295 300
 Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
 325 330 335
 Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Gln Ser Glu Arg Phe Val Arg
 340 345 350
 Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
 370 375 380
 Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
 385 390 395 400

Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asp
 405 410 415
 Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
 420 425 430
 Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
 435 440 445
 Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
 450 455 460
 Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 465 470 475 480
 Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asp Gly
 485 490 495
 Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 500 505 510
 Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
 515 520 525
 Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
 530 535 540
 Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
 545 550 555 560
 Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
 565 570 575
 Asp Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
 580 585 590
 Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 595 600 605
 Arg Glu Asp Leu Lys
 610

REIVINDICACIONES

1. Una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") aislada, en que dicha PE tiene una sustitución con alanina, glicina, serina o glutamina en lugar del resto aminoacídico R432, en que el resto aminoacídico R432 se define en referencia a la secuencia de aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO:1).
5
2. Una PE de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicha PE tiene además una sustitución con alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina o glutamina en lugar de la arginina en el resto 490, en que dicho resto aminoacídico se define en referencia a la secuencia de aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO:1).
10
3. Una PE de la reivindicación 2, en que además dicho sustituto de dicho resto aminoacídico 490 de SEQ ID NO:1 es alanina.
4. Una PE de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicha PE se selecciona del grupo que consta de PE35, PE38, PE38KDEL, PE40, PE4E y PE38QQR.
15
5. Una PE de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicha PE comprende además una o más de las sustituciones R313A, Q332S, R467A, R490A, R513A, E548S y K590S.
- 20 6. Una PE según la reivindicación 5, en que dicha PE comprende las sustituciones R313A, Q332S, R432G, R467A, R490A, R513A, E548S y K590S.
7. Una molécula quimérica que comprende (a) una fracción de reconocimiento conjugada o fusionada con (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE"), en que dicha PE tiene una sustitución con alanina, glicina, serina o glutamina en lugar del resto aminoacídico R432, en que dicho resto aminoacídico R432 se define en referencia a la secuencia de aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO:1).
25
8. Una molécula quimérica de la reivindicación 7, en que dicha PE es tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
30
9. Una molécula quimérica de las reivindicaciones 7 u 8, en que dicha fracción de reconocimiento es un anticuerpo.
10. Una molécula quimérica de la reivindicación 9, en que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consta de un scFv, un dsFv, un Fab y un F(ab')₂.
35
11. Una molécula quimérica de las reivindicaciones 7 u 8, en que dicha fracción de reconocimiento es una citocina.
- 40 12. Una composición que comprende (a) una molécula quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un ácido nucleico aislado que codifica una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y que opcionalmente codifica además una fracción de reconocimiento.
45
14. Un ácido nucleico aislado de la reivindicación 13, en que dicha fracción de reconocimiento es tal como se define en las reivindicaciones 9, 10 u 11.
15. Un ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 13 o 14, en que dicho ácido nucleico está ligado operativamente a un promotor.
50
16. Un procedimiento *in vitro* para la inhibición del crecimiento de una célula que porta una molécula diana, en que dicho procedimiento comprende la puesta en contacto de dicha célula con una molécula quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en que la puesta en contacto de dicha célula con dicha molécula quimérica inhibe el crecimiento de dicha célula.
55
17. Una molécula quimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 para el uso en un procedimiento de tratamiento, en que dicho tratamiento es destruir las células reconocidas como diana por dicha molécula.
60
18. Una composición farmacéutica que comprende la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la molécula quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para el uso en un procedimiento de tratamiento.

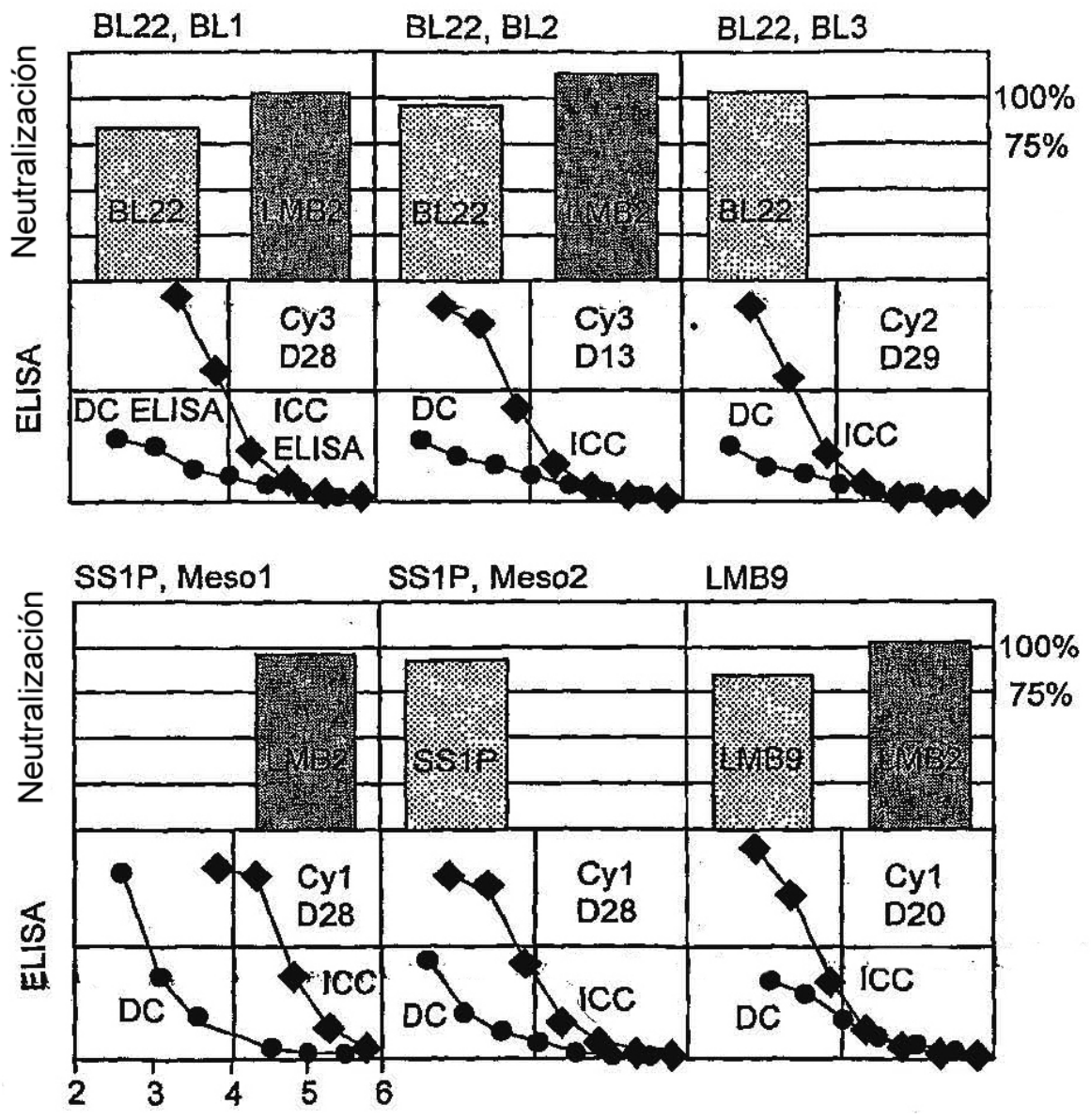


FIG. 1

Mapeo de epítopos topográficos de MAb dirigidos contra PE38

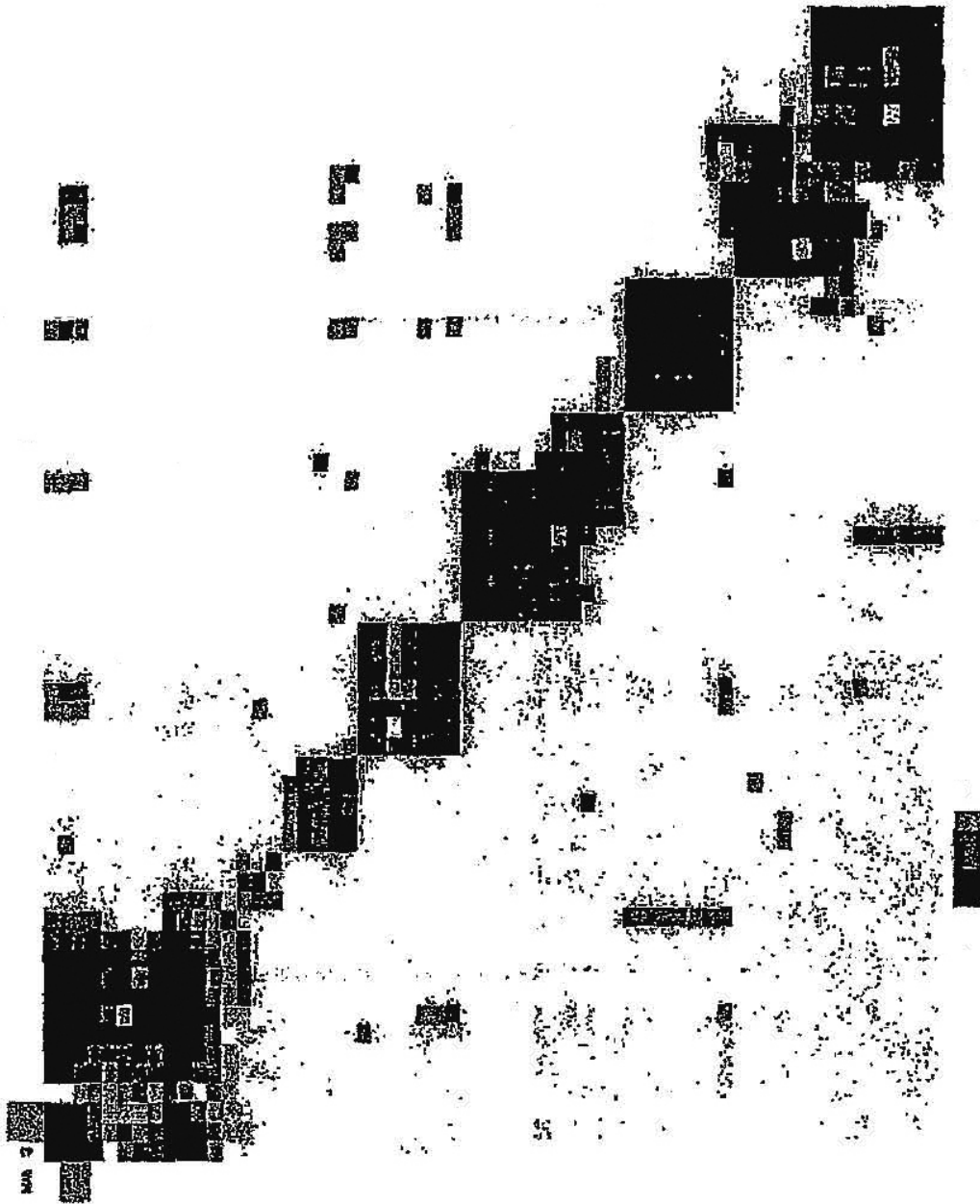


FIG. 2

Sensograma Biacore que muestra la unión aditiva de MAb asignados a diferentes grupos epitópicos

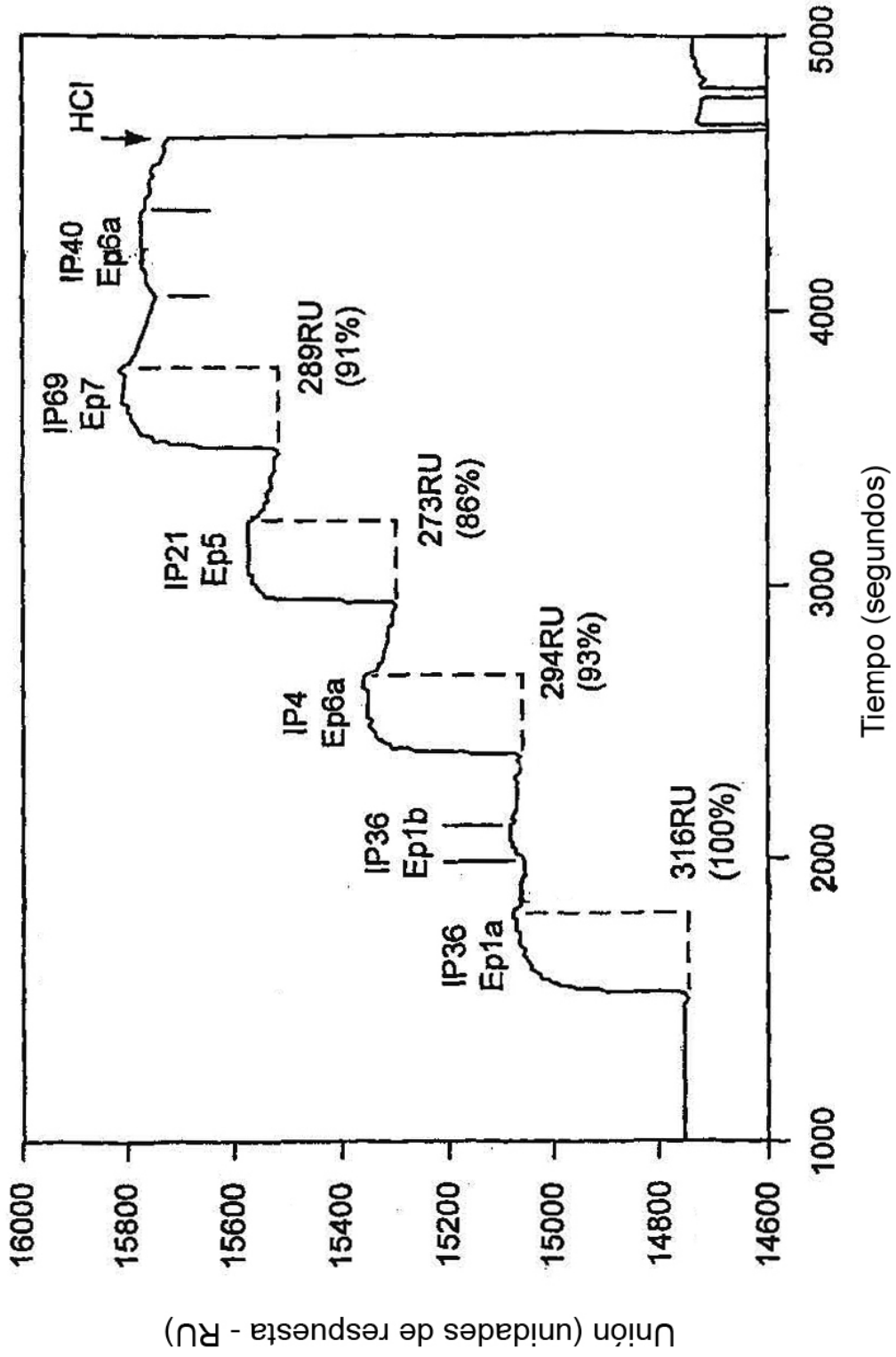


FIG. 3

Localización de epítomos identificados por mutantes de PE38

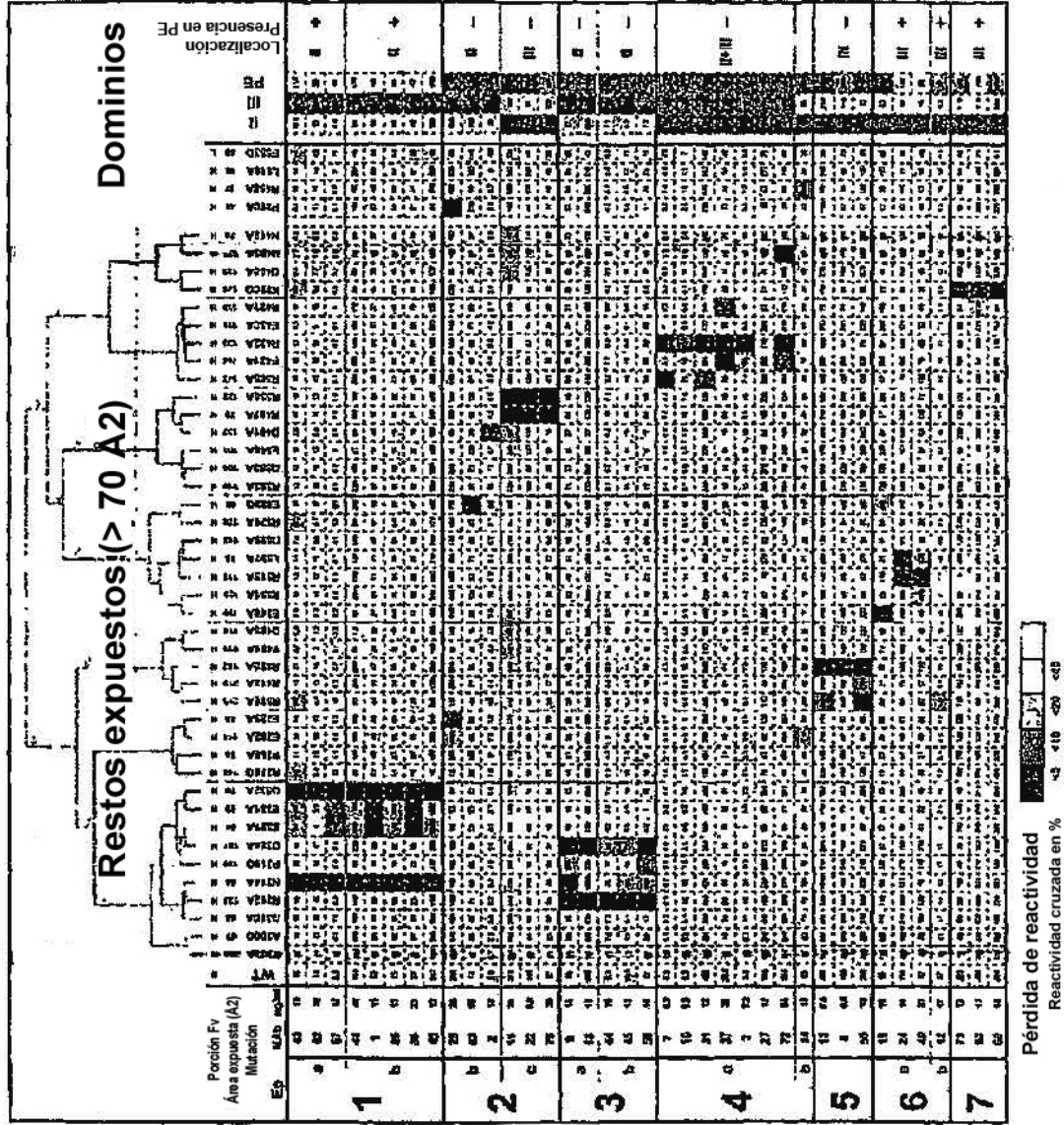


FIG. 4

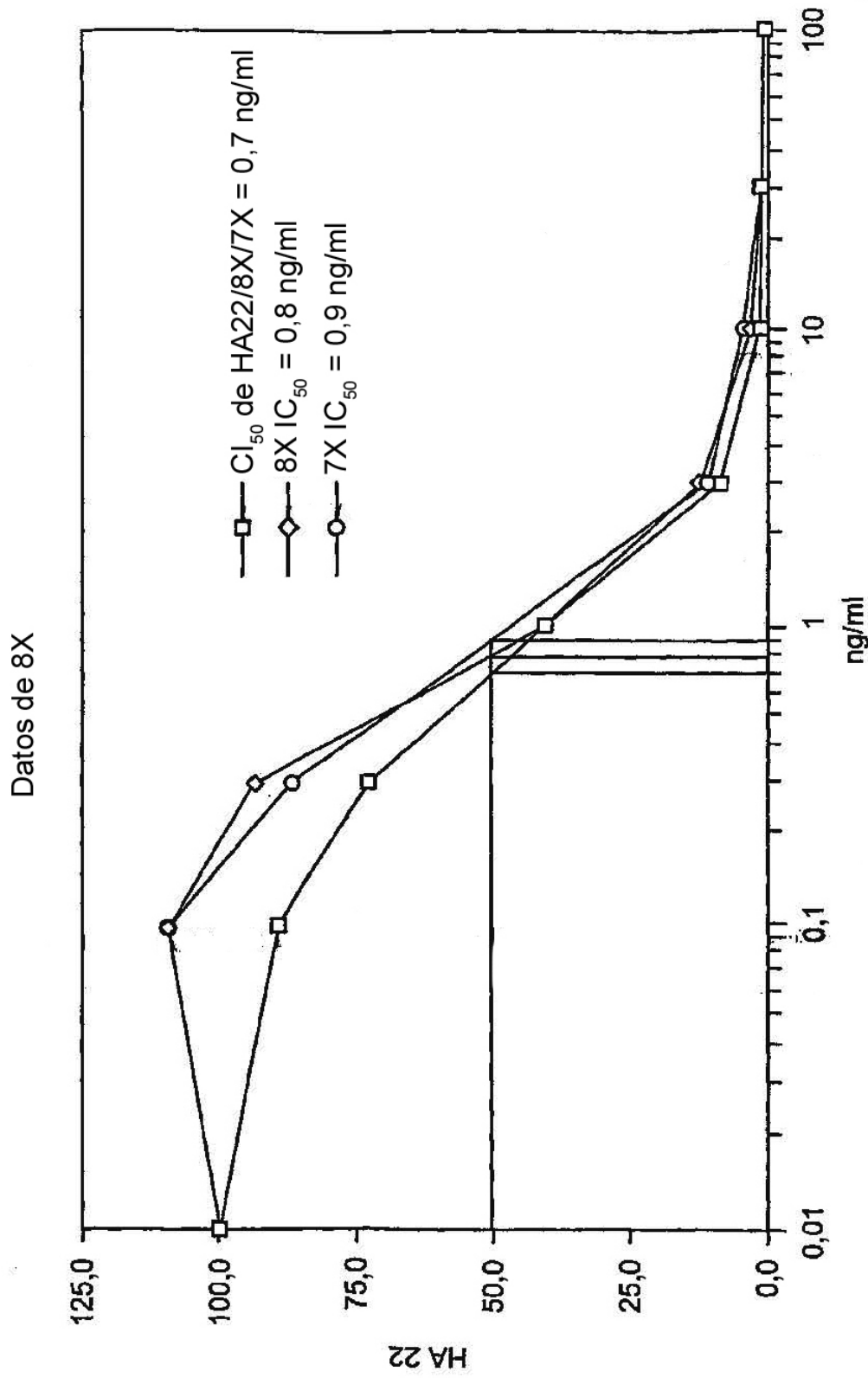


FIG. 5

Actividad antitumoral y toxicidad de HA22-8M en tumores de CA46 (ratones scid)

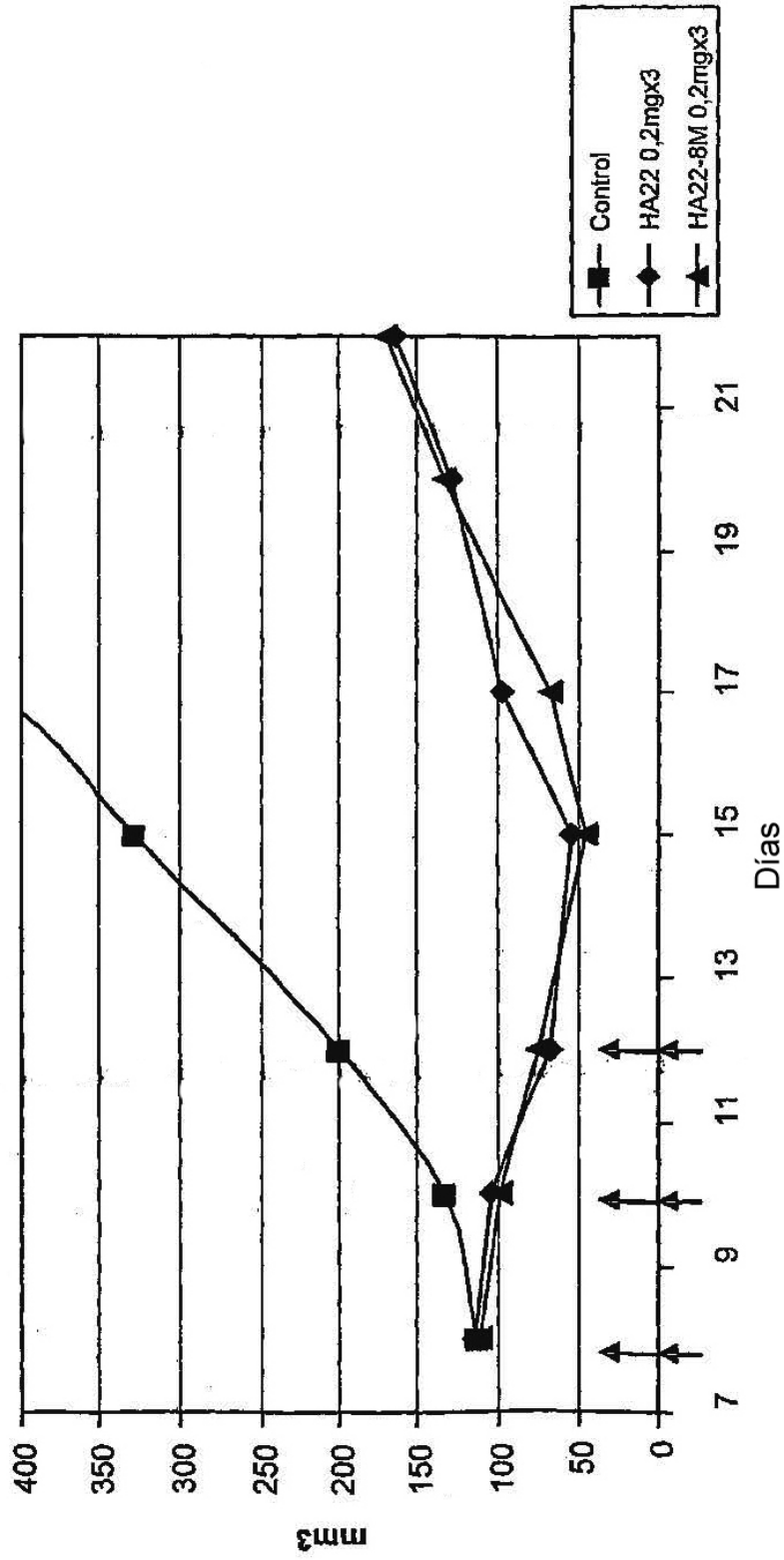


FIG. 6