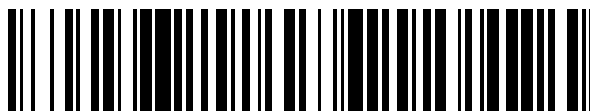


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 416**

51 Int. Cl.:

A61K 38/50 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2003 E 03764850 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1530482**

54 Título: **Uso de ureasa para inhibir el crecimiento de células cancerosas**

30 Prioridad:

18.07.2002 US 397244 P

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

19.02.2014

73 Titular/es:

**HELIX BIOPHARMA CORP. (100.0%)
3-305 INDUSTRIAL PARKWAY SOUTH
AURORA, ONTARIO L4G 6X7, CA**

72 Inventor/es:

**CHAO, HEMAN;
WONG, WAH;
SEGAL, DONALD;
MCELROY, JERRY;
DOCHERTY, JOHN y
DICKSTEIN, JODI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 443 416 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de ureasa para inhibir el crecimiento de células cancerosas

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para tratar el cáncer empleando una enzima ureasa y un anticuerpo anti-antígeno tumoral.

- 5 El cáncer representa la quinta parte de la mortalidad total en los Estados Unidos y es la segunda causa principal de muerte. El cáncer se caracteriza típicamente por la división incontrolada de una población de células. Esta división incontrolada puede afectar a células sanguíneas, tal como en diversos tipos de linfomas, o a células que se agregan en, o son nativas de, un tejido u órgano particular, por ejemplo, en tumores sólidos, tales como tumores secundarios o primarios de la mama, el hígado, el esófago, el estómago, los intestinos, el cerebro, el hueso o la próstata.
- 10 Se han propuesto una diversidad de modalidades de tratamiento para la terapia del cáncer. Éstas incluyen, en general, la resección quirúrgica de tumores sólidos, el tratamiento con radiación, tal como con rayos X, la quimioterapia, la terapia inmune y la terapia génica. El (los) tipo(s) de terapia que se selecciona(n) para un cáncer dado dependerá(n) de factores tales como la edad del paciente, el grado de localización del cáncer, y el tipo y la fase del cáncer. La terapia implica a menudo una combinación de dos o más modalidades, tal como una terapia con rayos X en combinación con quimioterapia, o con inmunoterapia en combinación con quimioterapia.

15 Para tratar los cánceres se ha empleado un gran número de compuestos y composiciones y estrategias quimioterapéuticos. Se diseñan muchos compuestos antineoplásicos para alterar la replicación en células que se dividen rápidamente, o para inhibir un vínculo metabólico esencial en células que proliferan activamente. Aunque tales planteamientos han conducido a niveles de éxito en ciertos tipos de cánceres, o en cánceres en ciertas fases, la quimioterapia se asocia generalmente con efectos secundarios que van de desagradables a debilitantes, tales como malestar, náuseas, pérdida de apetito, alopecia y anemia. Además, los compuestos que actúan a nivel de la replicación celular, sea al introducir compuestos nucleotídicos análogos en células que se dividen o sea al alterar la replicación normal, presentan la posibilidad de introducir mutaciones genéticas generalizadas en células normales del sujeto. Además, las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a muchos tipos de agentes antitumorales, sea limitando la incorporación del agente a las células o sea alterando el metabolismo del agente dentro de las células.

El Documento WO-A-95/22987 se refiere al uso del antígeno de ureasa de *H. pylori* para cambiar los niveles de pH en el tracto gastrointestinal, para el tratamiento y la erradicación de la enfermedad gastroduodenal asociada con una infección por *Helicobacter* en mamíferos.

- 30 En el Documento US 6.248.330 se describe una composición inmunogénica para inducir anticuerpos protectores frente a una infección por *Helicobacter* usando los polipéptidos de ureasa de *H. felis*, de modo que la composición comprende (i) al menos una subunidad de un polipéptido estructural de ureasa de *H. pylori* y/o al menos una subunidad de un polipéptido estructural de ureasa de *H. felis*, (ii) y/o una proteína de choque térmico o chaperonina de *Helicobacter*.
- 35 En el Documento US 6.126.938 se describen una composición y un método para inducir una respuesta inmune contra un antígeno de un patógeno del tracto respiratorio, gastrointestinal o genitourinario en un sitio efector mucoso de un mamífero, que comprende ureasa encerrada en liposomas.

40 A. Zimmer et al., *Proceedings of the Society for Exp. Biology and Medicine*, volumen 139, nº 1, 1972, páginas 143-149, describen estudios sobre el efecto de una inyección intraperitoneal (IP) de ureasa en ratones a los que se ha inyectado subcutáneamente líquido ascítico que contiene células de tumor ascítico de Ehrlich (EAT; del inglés, Earlich ascites tumor).

45 En respuesta a estas limitaciones, se han desarrollado intentos para modificar los agentes quimioterapéuticos con objeto de reducir sus efectos secundarios, solventar los problemas de resistencia o mejorar su direccionamiento a sitios tumorales seleccionados. Aunque estos esfuerzos han producido resultados terapéuticos mejorados en ciertos casos, sigue siendo una necesidad el proporcionar un agente y un método quimioterapéuticos mejorados. En particular, dicho agente debería ser eficaz en cuanto a matar células cancerosas o inhibir su crecimiento, debería ser relativamente atóxico en términos de efectos secundarios y efectos a largo plazo sobre la integridad genética del sujeto tratado, y preferiblemente debería ser suministrable en una forma que permitiera la introducción directa en un tumor o el direccionamiento selectivo a tumores.

50 La invención proporciona una composición farmacéutica para uso en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero, como se define en las reivindicaciones. La composición incluye una enzima ureasa, tal como una ureasa bacteriana o vegetal, y un componente de direccionamiento asociado con la ureasa para potenciar el suministro de la enzima a las células cancerosas, cuando la composición se administra al sujeto.

Se proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende

55 una enzima ureasa;

un componente de direccionamiento conjugado con dicha ureasa, en donde dicho componente de direccionamiento es un anticuerpo anti-antígeno tumoral o un fragmento del mismo, componente de direccionamiento que es eficaz para potenciar el suministro de la enzima a las células de un tumor sólido, cuando la composición se administra a un sujeto; y

5 un vehículo farmacéutico.

El componente de direccionamiento fijado a la ureasa es un anticuerpo anti-antígeno tumoral o un fragmento del mismo. Cuando el componente de direccionamiento es un polipéptido, la composición puede ser una proteína de fusión del componente de direccionamiento y la enzima ureasa.

10 En otro aspecto, la invención incluye el uso de ureasa para inhibir el crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. El método incluye exponer las células a ureasa en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las células cancerosas.

15 Cuando las células cancerosas comprenden un tumor sólido, la ureasa puede ser inyectada directamente en el tumor del sujeto o puede ser administrada parenteralmente salvo por administración directa, por ejemplo, por inyección. Además de ureasa en un vehículo farmacéuticamente aceptable, las diferentes composiciones que contienen ureasa anteriormente indicadas son adecuadas para uso en la invención.

La ureasa se puede administrar en dos fases: una primera fase que implica un producto de conjugación de un componente de direccionamiento tumoral y un primer componente ligante que tiene la capacidad para interactuar con un segundo componente ligante; y una segunda fase con un segundo producto de conjugación que comprende el segundo componente ligante conjugado con ureasa.

20 Se describe además una composición para terapia génica, compuesta de un vector de direccionamiento eficaz, cuando se administra al sujeto, en cuanto a transfectar selectivamente células cancerosas, y, transportada en dicho vector, una secuencia de ácido nucleico recombinante eficaz en cuanto a producir una mRNA de ureasa en células cancerosas transfectadas. Un vector ejemplar es un adenovirus. Una secuencia de ácido nucleico ejemplar codifica ureasa y una secuencia líder secretora eficaz en cuanto a promover la secreción de la ureasa desde las células cancerosas transfectadas.

25 En un aspecto relacionado, se describe un método para potenciar la eficacia terapéutica de un compuesto antitumoral débilmente básico cuya eficacia está reducida por un gradiente de pH intracelular mayor/extracelular menor en un tumor sólido, en un sujeto que recibe el agente para tratamiento tumoral. Se administra por ello al sujeto una cantidad de ureasa eficaz en cuanto a reducir o invertir el gradiente de pH intracelular mayor/extracelular menor en un tumor sólido. La cantidad de ureasa administrada es eficaz para elevar el pH del fluido extracelular del tumor a un valor de al menos 7,2. La ureasa se puede inyectar directamente en el tumor o, como antes, se puede administrar parenteralmente salvo por administración directa.

30 El compuesto antitumoral puede ser, por ejemplo, doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, epirubicina, mitomicina, bleomicina, alcaloides de *Vinca*, tales como vinblastina y vincristina, agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida e hidrocloreto de mecloretamina, y derivados antineoplásicos de purina o pirimidina.

35 Se describe además un método para evaluar la presencia, el tamaño o el estado de un tumor sólido en un sujeto. Se administra aquí ureasa al sujeto que contiene, o del que se sospecha que contiene, un tumor sólido, bajo unas condiciones eficaces en cuanto a localizar la ureasa en un tumor sólido del sujeto. El sujeto es luego investigado con una herramienta diagnóstica, tal como fluoroscopia, obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI; del inglés, magnetic resonance imaging), o tomografía por emisión de positrones (PET; del inglés, positron emission tomography), capaz de detectar cambios en el pH extracelular de un tejido del sujeto, sea en presencia o sea en ausencia de un informador sensible al pH, para identificar una región tisular del sujeto que muestre una elevación del pH extracelular.

40 Este método se puede emplear junto con el método de tratamiento anterior para evaluar el grado y/o la eficacia de la dosificación de ureasa o el tratamiento con ureasa. De esta manera, por ejemplo, al administrar ureasa a un sujeto, se puede seguir la extensión y el grado de cambio de pH en una región tumoral para guiar la administración de ureasa o para evaluar cambios en el tamaño o la extensión del tumor durante el tratamiento.

45 También se describe un kit para uso en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. El kit tiene una composición farmacéutica que contiene enzima ureasa, y materiales instructivos que enseñan la administración de la composición a un sujeto, para el tratamiento de un cáncer en el sujeto.

50 El material instructivo puede enseñar cómo administrar la composición de ureasa a un sujeto en una cantidad que depende del tamaño del tumor y está en el intervalo de 0,1 a 100, preferiblemente de 0,5 a 10, unidades internacionales de actividad ureasa por mm³ de tumor cuando la composición se administra por inyección directa en el tumor, y en una cantidad en el intervalo de 100-100.000, preferiblemente de 500-10.000, unidades internacionales de actividad ureasa/kg de peso corporal del sujeto cuando la composición se administra al sujeto parenteralmente salvo por inyección directa en el tumor.

El material instructivo puede enseñar cómo administrar ureasa a un sujeto que está también recibiendo un compuesto antitumoral débilmente básico cuya eficacia está reducida por un gradiente de pH intracelular mayor/extracelular menor en un tumor sólido, en una cantidad de ureasa eficaz en cuanto a reducir o invertir el gradiente de pH intracelular mayor/extracelular menor en un tumor sólido.

- 5 El material instructivo puede enseñar cómo administrar ureasa a un sujeto que contiene, o del que se sospecha que contiene, un tumor sólido, bajo unas condiciones eficaces en cuanto a localizar la ureasa en un tumor sólido del sujeto, investigar al sujeto con una herramienta diagnóstica capaz de detectar cambios en el pH extracelular de un tejido del sujeto, e identificar una región tisular del sujeto que muestre una elevación del pH extracelular después de dicha administración.
- 10 También se describe una composición para terapia génica, para uso en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. Esta composición incluye, como se indicó anteriormente, un vector de direccionamiento eficaz, cuando se administra al sujeto, en cuanto a transfectar selectivamente células cancerosas, y, transportada en el vector, una secuencia de ácido nucleico recombinante eficaz en cuanto a producir una mRNA de ureasa en células cancerosas transfectadas.
- 15 Estos y otros objetos y características de la invención se harán más evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos adjuntos.

Las Figuras 1A-1D ilustran los pasos de la reacción de la ureasa. La urea es escindida por la ureasa para producir una molécula de amoníaco y una de carbamato (A). El carbamato se descompone espontáneamente hasta amoníaco y ácido carbónico (B). El ácido carbónico alcanza un equilibrio en agua (C), al igual que las dos moléculas de amoníaco, que llegan a protonarse para producir iones amonio e hidróxido (D). La reacción da lugar a un aumento en el pH del entorno de reacción;

La Figura 2 muestra el perfil de una muestra cruda que contiene ureasa, preparada de acuerdo con una realización de la invención, por espectrometría de masas (ES; del inglés, mass spectrometry);

La Figura 3 ilustra los perfiles de purificación de ureasa por afinidad durante varias fases del proceso de purificación, de acuerdo con otra realización de la invención;

La Figura 4 ilustra la purificación del producto de conjugación bucle E-IgG α hEGFR mediante una columna de proteína G preparada de acuerdo con una realización de la invención; y

La Figura 5 muestra el título de anticuerpos del producto de conjugación bucle E-IgG α hEGFR purificado, preparado de acuerdo con una realización de la invención, según se determina mediante un ensayo ELISA con bucle K inmovilizado.

I. Definiciones

A menos que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen un significado igual al que tendrían para un experto en la técnica de la presente invención. Para las definiciones y términos de la técnica, los profesionales se dirigen particularmente a Sambrook et al. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, 3ª edición, y F. M. Ausubel et al. (1993) en "Current Protocols in Molecular Biology". Se ha de entender que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar.

El término "ureasa" se refiere a una enzima que tiene la actividad enzimática de una urea amidohidrolasa (E.C. 3.5.1.5), esté presente en la naturaleza o se obtenga, por ejemplo, mediante técnicas de ácido nucleico recombinante y/o síntesis química. La ureasa también incluye proteínas de fusión que comprenden la ureasa completa o subunidades o fragmentos de la misma, y/o una ureasa con sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos que mantienen la actividad urea amidohidrolasa del polipéptido. Como se emplea en esta memoria, una secuencia de ureasa truncada es un fragmento de ureasa que carece de una porción de la secuencia de ureasa intacta que comienza en el extremo amínico o carboxílico de la ureasa. Más adelante se proporcionan métodos para aislar ureasa nativa, para sintetizar recombinantemente ureasa y para identificar fragmentos activos y polipéptidos de ureasa modificados.

Con el término "cáncer" se quiere hacer referencia a una célula o unas células anormales, o una masa de tejido anormal. El crecimiento de estas células o estos tejidos es excesivo y no está coordinado con el de los tejidos o células normales, y persiste del mismo modo excesivo después de la cesación de los estímulos que provocaron el cambio. Estos tejidos o células neoplásicos presentan una falta de organización estructural y de coordinación con respecto a los tejidos o células normales, lo que puede dar lugar a una masa de tejidos o células que pueden ser benignos o malignos. Como se utiliza en esta memoria, el cáncer incluye cualquier neoplasia. Esto incluye, pero no se limita a, melanoma, adenocarcinoma, glioma maligno, carcinoma prostático, carcinoma de riñón, carcinoma de vejiga, carcinoma pancreático, carcinoma de tiroides, carcinoma de pulmón, carcinoma de colon, carcinoma rectal, carcinoma de cerebro, carcinoma de hígado, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, y similares.

Un "tumor" o "tumor sólido" se refiere a una masa cohesiva de células cancerosas, incluyendo, pero sin limitarse a, tumores semisólidos y sólidos, metástasis de tumores sólidos, angiofibromas, fibroplasia retrolental, hemangiomas y sarcoma de Kaposi.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "componente de direccionamiento" se refiere a una molécula que se une a una población definida de células o a un tipo celular seleccionado. El componente de direccionamiento se puede unir a un receptor, un oligonucleótido, un sustrato enzimático, un determinante antigénico, u otro sitio ligante presente sobre, o en, la célula diana o la población de células diana. El componente de direccionamiento es un anticuerpo. Se consideran también componentes de direccionamiento los fragmentos de anticuerpo y secuencias peptídicas pequeñas capaces de reconocer antígenos expresados.

Como se emplean en esta memoria, las expresiones "inhibe el crecimiento de células cancerosas" e "inhibir el crecimiento de células cancerosas" se refieren a cualquier lentificación de la velocidad de proliferación y/o migración de células cancerosas, la detención de la proliferación y/o migración de células cancerosas, o la muerte de células cancerosas, por lo que la velocidad de crecimiento de células cancerosas se reduce en comparación con la observada o prevista velocidad de crecimiento de una célula cancerosa testigo no tratada. La expresión "inhibe el crecimiento" se puede también referir a una reducción de tamaño o a la desaparición de una célula cancerosa o un tumor, así como a una reducción de su potencial metastásico. Preferiblemente, dicha inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, evitar el crecimiento, reducir la agresividad, o prevenir o inhibir la metástasis de un cáncer en un paciente. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente, mediante cualquiera de una diversidad de indicios adecuados, si el crecimiento de células cancerosas resulta inhibido.

La inhibición del crecimiento de células cancerosas puede ser evidenciada, por ejemplo, por la detención de las células cancerosas en una fase particular del ciclo celular, por ejemplo, la detención en la fase G2/M del ciclo celular. La inhibición del crecimiento de células cancerosas puede ser también evidenciada por la medición directa o indirecta del tamaño de las células cancerosas o los tumores. En pacientes humanos con cáncer, dichas mediciones se realizan generalmente usando métodos de obtención de imágenes bien conocidos, tales como la obtención de imágenes por resonancia magnética, la tomografía axial computarizada (CAT; del inglés, computerized axial tomography) y los rayos X. El crecimiento de células cancerosas puede ser también determinado indirectamente, tal como determinando los niveles en circulación del antígeno carcinoembrionario, el antígeno específico de la próstata u otros antígenos específicos del cáncer que estén correlacionados con el crecimiento de células cancerosas. La inhibición del crecimiento del cáncer también se correlaciona generalmente con una supervivencia prolongada y/o con una salud y un bienestar aumentados del sujeto.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "induce apoptosis" se refiere a la promoción de una forma de muerte celular programada caracterizada por fragmentación del DNA. La apoptosis puede ser determinada mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se dispone comercialmente de kits que permiten detectar la presencia de DNA fragmentado por inmunohistoquímica *in situ* (por ejemplo, Apoptag, asequible de Intergen, Purchase, New York). Además, la apoptosis puede ser también determinada mediante un análisis por FACS, en el que las células apoptóticas presentan un contenido de DNA sub-G1, lo que indica fragmentación de DNA.

Como se emplea en esta memoria, un "anticuerpo" se refiere a un péptido, polipéptido o proteína que comprende uno o más péptidos o polipéptidos sustancial o parcialmente codificados por al menos una molécula de ácido nucleico de inmunoglobulina o un gen o fragmento de inmunoglobulina de al menos una molécula de inmunoglobulina o un gen de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes de regiones variables de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta y épsilon, las cuales definen a su vez las clases inmunoglobulínicas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina (por ejemplo, de anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, esencialmente responsable del reconocimiento antigénico. Las expresiones "cadena ligera variable" (VL; del inglés, variable light) y "cadena pesada variable" (VH; del inglés, variable heavy) se refieren a esas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con diversas peptidasas. De esta manera, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de las uniones disulfuro de la región bisagra para producir F(ab)₂, un dímero de Fab que en sí es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab)₂ puede ser reducido bajo condiciones suaves para romper la unión disulfuro de la región bisagra, convirtiendo por ello el dímero F(ab)₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra [véase *Fundamental Immunology*, redactado por W. E. Paul, Raven Press, New York (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo]. Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, quien tiene una experiencia normal en la técnica apreciará que tales fragmentos Fab' pueden ser sintetizados *de novo*, sea químicamente o sea utilizando una metodología de DNA recombinante. Por lo tanto, el término "anticuerpo", como se emplea en esta memoria, también incluye fragmentos de anticuerpo, ya sean producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o ya sean sintetizados *de*

novus usando metodologías de DNA recombinante. Los anticuerpos incluyen anticuerpos de cadena única, incluyendo anticuerpos Fv de cadena única (sFV) en que un VH y un VL están unidos entre sí (directamente o a través de un conector peptídico) para formar un polipéptido continuo.

Un "fragmento ligante de antígeno" de un anticuerpo es un fragmento peptídico o polipeptídico del anticuerpo que se une a un antígeno. Un sitio ligante de antígeno está formado por aquellos aminoácidos del anticuerpo que contribuyen a, están implicados en, o afectan a, la unión del antígeno. Véanse T. A. Scott y E. I. Mercer, CONCISE ENCYCLOPEDIA: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (de Gruyter, 3ª edición, 1997), y J. D. Watson et al., RECOMBINANT DNA (2ª edición, 1992). La expresión "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o genéticamente diseñada que actúa como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo.

Las expresiones "agente activo", "fármaco" y "agente farmacológicamente activo" se usan indistintamente en esta memoria para referirse a un material o compuesto químico que, cuando se administra a un sujeto, induce un efecto farmacológico deseado, y en él se pretende incluir un agente diagnóstico o terapéutico, incluyendo radionucleidos, fármacos, agentes anticancerosos, toxinas y similares. Preferiblemente, la expresión "agente activo" incluye proteínas, glicoproteínas, péptidos naturales y sintéticos, alcaloides, polisacáridos, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas y similares. Más preferiblemente, la expresión "agente activo" se refiere a proteínas. Un agente activo ejemplar es la ureasa.

Un agente activo "sensible al pH" se refiere a un agente activo cuya capacidad para inducir un efecto farmacológico deseado depende, al menos en parte, del pH del entorno extracelular circundante.

La expresión "agente supresor", como se emplea en esta memoria, se refiere a un agente capaz de unirse a, complejar o, si no, asociarse con, un componente administrado, tal como, por ejemplo, un componente de direccionamiento-ligando, un componente de direccionamiento-antiligando o un antiligando solo, presente en la circulación del receptor, facilitando por ello la supresión del componente circulante del cuerpo del receptor, su eliminación de la circulación sanguínea o su inactivación en circulación. El agente supresor se caracteriza preferiblemente por unas propiedades físicas, tales como el tamaño, la carga, la configuración o una combinación de estos, que limitan el acceso del agente supresor a la población de células diana reconocidas por un componente de direccionamiento usado en el mismo protocolo de tratamiento que el agente supresor.

Con la expresión "agente formador de imágenes" se quiere hacer referencia a compuestos que pueden ser detectados.

El término "adyuvante" se refiere a una sustancia o agente añadido a una formulación o composición para facilitar la acción del ingrediente principal.

Las expresiones "fluido intersticial" y "fluido" extracelular" se refieren al fluido que se extiende entre, o baña, las células de los mamíferos.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en esta memoria para referirse a cualquier objetivo del tratamiento. La presente invención también proporciona un método para tratar células tumorales *in situ*, o en su posición o localización normales, por ejemplo, células neoplásicas de tumores de mama o de próstata. Estos tumores *in situ* pueden ser localizados dentro o sobre una gran variedad de huéspedes, tales como, por ejemplo, huéspedes humanos, huéspedes caninos, huéspedes felinos, huéspedes equinos, huéspedes bovinos, huéspedes porcinos, y similares. Cualquier huésped en que se halle un tumor o células tumorales puede ser tratado y es acorde con la presente invención. De este modo, un sujeto incluye un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

Por "tiempo de retención en la célula diana" se quiere significar la cantidad de tiempo que una molécula de ureasa u otro agente activo permanece en la superficie de la célula diana o dentro de la célula diana.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "producto de conjugación" abarca productos de conjugación químicos (covalente o no covalentemente unidos), proteínas de fusión y similares.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido", como se emplean en esta memoria, se refieren indistintamente a un biopolímero compuesto de subunidades de aminoácido o subunidades de compuesto análogo a aminoácido, típicamente algunos de, o todos, los 20 L-aminoácidos comunes hallados en proteínas biológicas, unidos por enlaces peptídicos intersubunitarios u otros enlaces intersubunitarios. La proteína tiene una estructura primaria representada por su secuencia de subunidades, y puede tener estructuras secundarias en hélice o en lámina plegada, así como una estructura tridimensional global. Aunque "proteína" se refiere comúnmente a un polipéptido relativamente grande, que contiene, por ejemplo, 100 o más aminoácidos, y "péptido" a polipéptidos más pequeños, los términos se usan indistintamente en esta memoria. Es decir, el término "proteína" se puede referir a un polipéptido más grande así como a un péptido más pequeño, y viceversa.

Un "modulador de ureasa" es un inhibidor de ureasa o un potenciador de ureasa.

Un "inhibidor de ureasa" comprende una molécula o grupo de moléculas que interfiere en: (1) la expresión, modificación, regulación, activación o degradación de la ureasa; o (2) una o más de las funciones normales de la ureasa. Las funciones normales de la ureasa incluyen la hidrólisis de urea, que conduce a la producción de carbamato y amoníaco. Un inhibidor "actúa directamente sobre la ureasa" cuando el inhibidor se une a la ureasa a través de interacciones electrostáticas o químicas. Dichas interacciones pueden ser mediadas o no por otras moléculas. Un inhibidor actúa "indirectamente sobre la ureasa" cuando su efecto más inmediato es sobre una molécula distinta de la ureasa que influye en la expresión, activación o acción de la ureasa.

Un "potenciador de ureasa" comprende una molécula o grupo de moléculas que potencia: (1) la expresión, modificación, regulación o activación de la ureasa; o (2) una o más de las funciones normales de la ureasa. Un potenciador actúa "indirectamente sobre la ureasa" cuando su efecto más inmediato es sobre una molécula distinta de la ureasa que influye en la expresión, activación o acción de la ureasa.

Una "mutación diseñada" en un gen de ureasa comprende un cambio en la secuencia de nucleótidos del gen de ureasa que da lugar a la producción de (1) cantidades aumentadas o reducidas de proteína ureasa con respecto a las cantidades producidas en ausencia de dicho cambio; o (2) una proteína ureasa que tiene unas funciones normales potenciadas o deterioradas con respecto a dichas funciones en ausencia de dichos cambios.

La expresión "composición farmacéutica" significa una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto, incluyendo un animal y un ser humano. Una composición farmacéutica comprende generalmente una cantidad eficaz de un agente activo y un vehículo, incluyendo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una "formulación farmacéuticamente aceptable" comprende una formulación que es adecuada para administrar el agente activo (por ejemplo, ureasa o un modulador de ureasa) de un modo que proporciona los resultados deseados y además no produce efectos secundarios negativos suficientes para convencer a un médico de que el posible daño a un paciente es mayor que el posible beneficio a ese paciente. El ingrediente básico para una formulación inyectable es típicamente un vehículo acuoso. Los vehículos acuosos que son útiles incluyen disolución de cloruro sódico (NaCl), disolución de Ringer, disolución de NaCl/dextrosa, y similares. Los vehículos miscibles con agua son también útiles para efectuar la solubilización total del agente activo. Agentes antimicrobianos, tampones y antioxidantes pueden ser útiles, dependiendo de la necesidad. Similarmente, una sal "farmacéuticamente aceptable" o un derivado "farmacéuticamente aceptable" de un compuesto, como se proporcionan en esta memoria, es una sal u otro derivado que no es biológicamente, ni de ningún otro modo, indeseable.

Con la expresión "liberación controlada" se quiere hacer referencia a cualquier formulación que contiene fármaco en que se controlan el modo y el perfil de liberación del fármaco desde la formulación. La expresión "liberación controlada" se refiere a formulaciones de liberaciones tanto inmediata como no inmediata; formulaciones de liberación no inmediata que incluyen, pero no se limitan a, formulaciones de liberaciones ininterrumpida y retardada.

La expresión "liberación ininterrumpida" (a la que también se hace referencia como "liberación prolongada ") se utiliza en su sentido convencional para referirse a una formulación farmacológica que proporciona la liberación gradual de un fármaco a lo largo de un periodo prolongado de tiempo y que, preferiblemente, aunque no necesariamente, da lugar a niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco a lo largo de un periodo prolongado de tiempo. La expresión "liberación retardada" se utiliza en su sentido convencional para referirse a una formulación farmacológica en que hay un retraso temporal entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco de la misma. La "liberación retardada" puede implicar o no la liberación gradual del fármaco a lo largo de un periodo prolongado de tiempo y, por lo tanto, puede ser o no una "liberación ininterrumpida".

Un "tratamiento terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta síntomas o indicios de patología, enfermedad o trastorno, tratamiento que se administra al sujeto con la finalidad de disminuir o eliminar esos indicios o síntomas de patología, enfermedad o trastorno. Una "actividad terapéutica" es una actividad de un agente, tal como un ácido nucleico, un vector, un gen, un polipéptido, una proteína, una sustancia, o una composición de los mismos, que elimina o disminuye indicios o síntomas de patología, enfermedad o trastorno cuando se administra a un sujeto que padece dichos indicios o síntomas. Un agente o compuesto "terapéuticamente útil" (por ejemplo, un ácido nucleico o un polipéptido) indica que un agente o compuesto es útil en cuanto a disminuir, tratar o eliminar tales indicios o síntomas de una patología, enfermedad o trastorno.

La expresión "molécula pequeña" incluye un compuesto o complejo molecular, sea sintético, de origen natural o parcialmente sintético, que tiene preferiblemente un peso molecular inferior a 5000 dáltones. Más preferiblemente, una molécula pequeña tiene un peso molecular de entre 100 y 1500 dáltones.

Las expresiones "molécula de ácido nucleico" y "oligonucleótido" y sus equivalentes gramaticales se refieren a al menos dos nucleótidos covalentemente unidos entre sí, y típicamente se refieren a moléculas de RNA, DNA y cDNA. Un ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente de cadena sencilla o cadena doble y contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque, en algunos casos, se incluyen compuestos análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas principales alternas que comprendan, por ejemplo, uniones fosforamida, fosforotioato, fosforoditioato y/o O-metilfosforamidita. Se entenderá que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias nucleotídicas que codifiquen péptidos dados, tal como la ureasa.

- Una construcción o secuencia de ácido nucleico "heteróloga" tiene una porción de la secuencia que no es nativa con respecto a la célula en que se expresa. Heteróloga, con respecto a una secuencia de control, se refiere a una secuencia de control (es decir, un promotor o un potenciador) que no actúa en la naturaleza para regular el mismo gen cuya expresión está regulando en ese momento. En general, las secuencias de ácido nucleico heterólogas no son endógenas con respecto a la célula o parte del genoma en que están presentes y han sido añadidas a la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, o similar. Una construcción de ácido nucleico heteróloga puede contener una combinación de secuencia de control/secuencia de codificación de DNA que sea igual o diferente a una combinación de secuencia de control/secuencia de codificación de DNA hallada en la célula nativa.
- Como se emplea en esta memoria, el término "vector" se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para transferencia entre células huésped diferentes. Un "vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad para incorporar y expresar fragmentos de DNA heterólogo en una célula extraña. Se dispone comercialmente de muchos vectores de expresión procarióticos y eucarióticos. La selección de los vectores de expresión apropiados está dentro del conocimiento de quienes tienen experiencia en la técnica.
- Como se emplea en esta memoria, un "casete de expresión" o "vector de expresión" es una construcción de ácido nucleico generada recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico específicos que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana o *in vitro*. El casete de expresión recombinante se puede incorporar a un plásmido, un cromosoma, DNA mitocondrial, DNA plastidial, un virus o un fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor.
- Como se emplea en esta memoria, el término "plásmido" se refiere a una construcción de DNA circular de doble cadena usada como vector de clonación y que forma un elemento genético autorreplicativo extracromosómico en muchas bacterias y algunos eucariontes.
- Como se emplea en esta memoria, la expresión "secuencia de nucleótidos que codifica un marcador seleccionable" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es capaz de expresión en células huésped, donde la expresión del marcador seleccionable confiere a las células que contienen el gen expresado la capacidad para crecer en presencia de un correspondiente agente selectivo.
- Como se emplean en esta memoria, el término "promotor" y la expresión "iniciador de la transcripción" se refieren a una secuencia de ácido nucleico que actúa para dirigir la transcripción de un gen cadena abajo. El promotor será generalmente apropiado para la célula huésped en que se está expresando el gen diana. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y la traducción (también denominadas "secuencias de control"), son necesarios para que se exprese un gen dado. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras.
- "Gen quimérico" y "construcción de ácido nucleico heteróloga", como se definen en esta memoria, se refieren a un gen no nativo (es decir, uno que ha sido introducido en un huésped) que puede estar compuesto de partes de genes diferentes, incluyendo elementos reguladores. Una construcción génica quimérica para la transformación de una célula huésped está típicamente compuesta de una región reguladora de la transcripción (promotor) operativamente unida a una secuencia de codificación proteica heteróloga o, en un gen quimérico marcador seleccionable, a un gen marcador seleccionable que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos a las células huésped transformadas. Un gen quimérico típico de la presente invención, para la transformación de una célula huésped, incluye una región reguladora de la transcripción que es constitutiva o inducible, una secuencia de codificación proteica y una secuencia terminadora. Una construcción génica quimérica puede también incluir una segunda secuencia de DNA que codifique un péptido señal si se desea la secreción de la proteína diana.
- Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando está colocado en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA que codifica una secuencia líder secretora está operativamente unido al DNA para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si está situado de modo que facilita la traducción. En general, "operativamente unido" significa que las secuencias de DNA que están unidas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan los adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.
- Como se emplea en esta memoria, la expresión "gen" significa el segmento de DNA implicado en la producción de una cadena polipeptídica, que puede incluir o no regiones que preceden y siguen a la región de codificación, por ejemplo, secuencias 5' no traducidas [5' UTR (del inglés, 5' untranslated region)] o "líder" y secuencias 3' UTR o "tráiler", así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones).

Como se emplea en esta memoria, "recombinante" incluye la referencia a una célula o un vector que han sido modificados mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, o a que la célula procede de una célula así modificada. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en forma idéntica en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que, en cualquier caso, se expresan anormalmente, se infraexpresan o no se expresan en absoluto como resultado de una intervención humana deliberada.

El término "introducida", en el contexto de la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula, significa "transfección", "transformación" o "transducción" e incluye la referencia a la incorporación de una secuencia de ácido nucleico a una célula eucariótica o procariótica, donde la secuencia de ácido nucleico se puede incorporar al genoma de la célula (por ejemplo, un cromosoma, plásmido, plastidio o DNA mitocondrial), se puede convertir en un replicón autónomo o se puede expresar transitoriamente (por ejemplo, mRNA transfectado).

Como se emplea en esta memoria, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

La expresión "secuencia señal" se refiere a una secuencia de aminoácidos en la porción N-terminal de una proteína, que facilita la secreción de la forma madura de la proteína fuera de la célula. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia señal, que es escindida durante el proceso de secreción.

Mediante la expresión "célula huésped" se quiere significar una célula que contiene un vector y soporta la replicación, o la transcripción y traducción (expresión), de la construcción de expresión. Las células huésped para uso en la presente invención pueden ser células procarióticas, tales como *E. coli*, o células eucarióticas, tales como células de levadura, planta, insecto, anfibio o mamífero.

Como se emplea en esta memoria, "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de un agente activo se refiere a una cantidad suficiente para obtener un cambio mensurable en un parámetro fisiológico de la célula o el sujeto dianas y/o para proporcionar o modular la expresión o actividad del agente activo a través de la administración de una o más de las unidades de dosificación farmacéuticas. Dicha cantidad eficaz puede variar de persona a persona dependiendo de su estado, altura, peso, edad y/o salud, el modo de administración del agente activo (por ejemplo, ureasa o un modulador de ureasa), el agente activo particular administrado, y otros factores. Como resultado, puede resultar útil el determinar empíricamente una cantidad eficaz para un paciente particular bajo un conjunto particular de circunstancias.

II. Composición de la invención

La invención incluye, en un aspecto, una composición que contiene ureasa como un agente activo para uso en la inhibición del crecimiento de células cancerosas. Un componente de direccionamiento está asociado con el agente activo, como se describe más adelante, para potenciar el suministro del agente activo a células cancerosas. Se ha descubierto que la exposición de células cancerosas de un paciente a ureasa, como se describe en esta memoria, proporciona un tratamiento eficaz para el cáncer del paciente. Las células cancerosas pueden estar contenidas dentro de un tumor, por ejemplo, un tumor sólido o semisólido. Alternativamente, las células cancerosas pueden estar circulando por la corriente sanguínea de un sujeto.

Los cánceres, tumores y/o neoplasias incluyen nuevos crecimientos de células o tejidos en que la multiplicación de las células es incontrolada y progresiva. Algunos de dichos crecimientos son benignos, pero otros son denominados "malignos", lo que conduce a la muerte del organismo. Las neoplasias malignas se distinguen de los crecimientos benignos en que los cánceres, además de presentar una proliferación celular agresiva, invaden tejidos circundantes y metastatizan. Además, las neoplasias malignas se caracterizan por mostrar una mayor pérdida de diferenciación, y de su organización entre sí y con respecto a sus tejidos circundantes.

A continuación se consideran los componentes incluidos en las composiciones de la invención.

A. Ureasa

Como se indicó anteriormente, el agente activo de la composición es una ureasa. La ureasa puede ser de cualquier origen, incluyendo, por ejemplo, de bacterias, plantas, hongos y virus. Ciertos estudios han proporcionado información detallada acerca de la genética de las ureasas de una diversidad de bacterias, plantas, hongos y virus evolutivamente distintos [H. L. T. Mobley et al. (1995), *Microbiol. Rev.* 59: 451-480; *Eur. J. Biochem.* 175, 151-165 (1988); A. Labigne (1990), Publicación Internacional nº WO 90/04030; C. L. Clayton et al. (1990), *Nucleic Acid Res.* 18, 362; y Patentes de EE.UU. números 6.248.330 y 5.298.399]. Es de particular interés la ureasa que se halla en plantas [A. Sirko y R. Brodzik (2000), *Acta Biochim. Pol.* 47 (4): 1189-95]. Una ureasa vegetal ejemplar es la ureasa de *Canavalia ensiformis*, que se describe en los Ejemplos 2-3. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de la ureasa de *Canavalia ensiformis* se representa mediante la ID. SEC. nº 7.

Se pueden identificar secuencias de ureasa útiles en bases de datos públicas, por ejemplo, en Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>). Además, se pueden utilizar cebadores que sean útiles para multiplicar ureasas

de una gran variedad de organismos, del modo descrito por K. M. Baker y J. L. Collier (http://www.science.smith.edu/departments/Biology/lkatz/NEMEB_webpage/abstracts.html), o se puede usar el cebador oligonucleotídico híbrido degenerado de consenso (CODEHOP; del inglés, Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers) del modo descrito por Rose et al. (1998), *Nucl. Acids Res.* 26: 1628.

La ureasa puede entrar en contacto con las células tumorales, situarse en el entorno extracelular o el fluido intersticial que rodea las células tumorales, o expresarse dentro de las células cancerosas o de las células próximas a las células cancerosas. Sin pretender vinculación alguna a mecanismos moleculares específicos que sirvan de base a la exitosa inhibición del crecimiento de células cancerosas por la ureasa, el compuesto de ureasa puede elevar el pH del fluido intersticial que baña a las células cancerosas, mediante la adición de ureasa al fluido intersticial del sujeto. La ureasa puede convertir el sustrato urea en amoníaco y carbamato. Esta actividad enzimática puede aumentar el pH haciendo más básico el entorno (Figuras 1A-1D). El entorno alrededor de una célula cancerosa es típicamente ácido [S. D. Webb et al. (2001), *Novartis Found. Symp.* 240: 169-81]. Por lo tanto, al elevar de este modo el pH del entorno extracelular, se inhibe el crecimiento de la célula cancerosa. En consecuencia, en ciertas realizaciones de la invención, la adición del agente activo causa que el pH del fluido intersticial se eleve en aproximadamente 0,1 unidades de pH, por ejemplo, en 0,1-0,5 unidades de pH o más.

Por lo tanto, los agentes activos de la invención incluyen las formas de ureasa presentes en la naturaleza así como variantes funcionalmente activas de las mismas. Se contemplan dos tipos generales de variantes de secuencia de aminoácidos. Las variantes de secuencia de aminoácidos son aquellas que tienen una o más sustituciones de aminoácidos específicos que no destruyen la actividad ureasa. Estas variantes incluyen variantes silenciosas y variantes conservativamente modificadas que son sustancialmente homólogas y funcionalmente equivalentes a la proteína nativa. Una variante de una proteína nativa es "sustancialmente homóloga" a la proteína nativa cuando al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, incluso más preferiblemente el 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 99%, de su secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa. Una variante puede diferir en tan sólo 1 aminoácido o en hasta 10 o más aminoácidos.

Un segundo tipo de variante incluye variantes de tamaño de la ureasa, que son fragmentos aislados activos de ureasa. Se pueden formar variantes de tamaño, por ejemplo, al fragmentar la ureasa, mediante modificación química, mediante digestión con enzimas proteolíticas, o mediante combinaciones de las técnicas anteriores. Además, para producir variantes de tamaño, se pueden emplear técnicas de ingeniería genética así como métodos para sintetizar directamente polipéptidos a partir de restos de aminoácido.

Por "funcionalmente equivalente" se quiere significar que la secuencia de la variante define una cadena que produce una proteína que tiene sustancialmente la misma actividad biológica que la ureasa nativa. Dichas variantes funcionalmente equivalentes que comprenden variaciones de secuencia sustanciales quedan también abarcadas por la invención. Por lo tanto, una variante funcionalmente equivalente de la proteína ureasa nativa tendrá la suficiente actividad biológica para ser terapéuticamente útil. En la técnica se dispone de métodos para determinar una equivalencia funcional. Se puede medir la actividad biológica usando ensayos específicamente diseñados para medir la actividad de la proteína ureasa nativa, como en el Ejemplo 3. Además, anticuerpos generados contra la proteína nativa biológicamente activa pueden ser examinados en cuanto a su capacidad para unirse a la variante funcionalmente equivalente, donde una unión eficaz es indicativa de una proteína que tiene una conformación similar a la de la proteína nativa.

Los expertos en la técnica apreciarán que, debido a la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias de ácido nucleico que codifiquen polipéptidos de ureasa de la invención, algunas de las cuales pueden tener una mínima homología secuencial con respecto a secuencias de ácido nucleico de ureasa conocidas. Dichas "variaciones silenciosas" son una especie de "variaciones conservativamente modificadas", discutidas más adelante. La invención proporciona cada una y todas las posibles variaciones de la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención que se puedan realizar seleccionando combinaciones basadas en posibles elecciones de codones. Estas combinaciones se realizan de acuerdo con el código genético estándar de tripletes, según se aplica a la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de proteína ureasa de la invención.

Los polipéptidos de ureasa de la presente invención incluyen una o más variaciones conservativamente modificadas (o simplemente "variaciones conservativas") de las secuencias de polipéptidos de ureasa conocidas. Dichas variaciones conservativas comprenden sustituciones, adiciones o supresiones que alteran, añaden o suprimen un sólo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos. Quien tiene una experiencia normal en la técnica reconocerá que una sustitución, supresión o adición individual que sustituya, suprima o añada un sólo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos del 5%, más típicamente menos del 4%, 2%, 1% o menos) de una secuencia constituye típicamente variaciones conservativas en que tales cambios dan lugar a la supresión de un aminoácido, la adición de un aminoácido, o la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar.

Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. En la Tabla 1 se exponen seis grupos que

contienen aminoácidos, que son sustituciones conservativas o variaciones conservativas para unos y otros.

Tabla 1. Grupos de sustituciones conservativas

1	Alanina (A)	Serina (S)	Treonina (T)	
2	Ácido aspártico (D)	Ácido glutámico (E)		
3	Asparagina (N)	Glutamina (Q)		
4	Arginina (R)	Lisina (K)		
5	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M)	Valina (V)
6	Fenilalanina (F)	Tirosina (Y)	Triptófano (W)	

También se pueden formular grupos adicionales de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden agrupar los aminoácidos por una función o estructura química o composición similares (por ejemplo, ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, y que contienen azufre). Por ejemplo, un agrupamiento alifático puede comprender: glicocola, alanina, valina, leucina e isoleucina. Otros grupos que contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas para unos y otros incluyen los siguientes: (i) aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano; (ii) que contienen azufre: metionina y cisteína; (iii) básicos: arginina, lisina e histidina; y (iv) ácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y glutamina. Véase Creighton (1984), *Proteins*, W. H. Freeman and Company, para agrupamientos adicionales de aminoácidos.

Las secuencias de proteína ureasa de la invención, incluyendo secuencias conservativamente sustituidas, pueden estar presentes como parte de secuencias polipeptídicas más grandes, tal como ocurre tras la adición de uno o más dominios para la purificación de la proteína (por ejemplo, segmentos de poli-His, segmentos de etiquetas FLAG, etc.), por ejemplo, donde los dominios funcionales adicionales ejercen poco o ningún efecto sobre la actividad de la porción proteica de ureasa de la proteína, o donde los dominios adicionales pueden ser eliminados mediante operaciones de procesamiento tras la síntesis, tal como mediante tratamiento con una proteasa.

La adición de uno o más ácidos nucleicos o secuencias que no alteran la actividad codificada de una molécula de ácido nucleico, tal como la adición de una secuencia no funcional, es una variación conservativa de la molécula de ácido nucleico básica, y la adición de uno o más restos de aminoácido que no alteran la actividad de un polipéptido de la invención es una variación conservativa del polipéptido básico. Los dos tipos citados de adiciones son características de la invención. Quien tiene una experiencia normal en la técnica apreciará que muchas variaciones conservativas de las construcciones de ácido nucleico que se describen producen una construcción funcionalmente idéntica.

Se puede utilizar una diversidad de métodos para determinar relaciones secuenciales, incluyendo el alineamiento manual, y el alineamiento y el análisis de secuencias asistidos por ordenador. Este último planteamiento es un planteamiento preferido en la presente invención a causa de la aumentada capacidad de procesamiento proporcionada por los métodos asistidos por ordenador. Se dispone de una diversidad de programas informáticos para llevar a cabo el alineamiento de secuencias, o quien tiene experiencia los puede producir.

Como se indicó anteriormente, no es necesario que las secuencias de los ácidos nucleicos y polipéptidos (y fragmentos de los mismos) empleados en la presente invención sean idénticas, aunque pueden ser sustancialmente idénticas (o sustancialmente similares), a la correspondiente secuencia de una molécula de polipéptido o ácido nucleico de ureasa (o fragmento de la misma) de la invención o de una molécula relacionada. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser sometidos a diversos cambios, tales como una o más inserciones, supresiones y sustituciones de aminoácidos o de ácido nucleico, sean conservativas o sean no conservativas, incluyendo, por ejemplo, cuando tales cambios pudieran proporcionar ciertas ventajas en su uso, por ejemplo, en su uso terapéutico o profiláctico o su administración o su aplicación diagnóstica.

El alineamiento y la comparación de secuencias de aminoácidos relativamente cortas (menos de aproximadamente 30 restos) son típicamente directos. La comparación de secuencias más largas puede requerir métodos más sofisticados para alcanzar el alineamiento óptimo de dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede ser llevado a cabo mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2: 482, mediante el algoritmo de alineamiento de homologías de Needleman y Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48: 443, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos [GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, EE.UU.; y BLAST, véanse, por ejemplo, Altschul et al. (1977), *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402, y Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215: 403-410], o por inspección, seleccionándose el mejor alineamiento (es decir, el que da lugar al mayor porcentaje de similitud secuencial o identidad secuencial sobre la ventana de comparación) generado por los diversos métodos.

Un algoritmo ejemplar que es adecuado para determinar los porcentajes de identidad secuencial (porcentaje de identidad) y de similitud secuencial es el algoritmo FASTA, que es descrito por W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444. Véase también W. R. Pearson (1996), *Methods Enzymology* 266: 227-258. Se

optimizan los parámetros preferidos usados en un alineamiento de secuencias de DNA por FASTA para calcular el porcentaje de identidad: matriz BL50 15: -5; k-tuplo (que contiene un valor k veces) = 2; penalización por unión = 40; optimización = 28; penalización por hueco = -12; penalización por longitud de hueco = -2; y anchura = 16.

- 5 Quien tiene una experiencia normal en la técnica entenderá que la anterior discusión sobre algoritmos de búsqueda y alineamiento también se aplica a la identificación y evaluación de secuencias polinucleotídicas, con la sustitución por secuencias de búsqueda que comprenden secuencias nucleotídicas y, cuando es apropiado, la selección de bases de datos de ácidos nucleicos.

B. Componente de direccionamiento asociado

- 10 La composición de la invención puede comprender un componente de direccionamiento que se asocia con el agente activo para potenciar el suministro del agente activo a las células cancerosas.

- 15 fijaciones covalentes con ligandos de direccionamiento, como se describe en esta memoria. El polímero puede estar entrecruzado o no entrecruzado. Los términos "entrecruzar", "entrecruzado" y "entrecruzamiento", como se emplean en esta memoria, se refieren generalmente a la unión de dos o más compuestos o materiales, por ejemplo, polímeros, mediante uno o más puentes. Los puentes, que pueden estar compuestos de uno o más elementos, grupos o compuestos, sirven generalmente para unir un átomo de una primera molécula de compuesto o material con un átomo de una segunda molécula de compuesto o material. Los puentes de entrecruzamiento pueden implicar asociaciones covalentes y/o no covalentes. Cualquiera de una diversidad de elementos, grupos y/o compuestos puede formar los puentes en los entrecruzamientos, y los compuestos o materiales se pueden entrecruzar naturalmente o a través de medios sintéticos.

- 20 De acuerdo con ciertas realizaciones, el polímero, sea lineal, en estrella o ramificado, puede ser seleccionado del grupo que consiste en un poli(óxido de alqueno), polialquilenimina, polialquilenamina, poli(sulfuro de alqueno), poli(sulfonato de alqueno), polialquilensulfona, poli(alquilensulfonilalquilenimina) y copolímeros de los mismos.

- 25 Como se indicó anteriormente, dependiendo del polímero particular empleado, los polímeros pueden ser relativamente más hidrófilos o relativamente más hidrófobos. Los ejemplos de polímeros relativamente más hidrófilos adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, polipropilenglicol, polietilenimina ramificada, polivinilpirrolidona, polilactida, poli(lactida-co-glicolida), polisorbato, poli(óxido de etileno), poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), poli(glicerol oxietilado), poli(sorbitol oxietilado), poli(glucosa oxietilada), polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, poli(alcohol vinílico), poli(ácido hidroxialquilcarboxílico), poli(ácido hidroxietilacrílico), poli(ácido hidroxipropilmetacrílico), polihidroxivalerato, polihidroxibutirato, polioxazolidina, poliaspartamida, poli(ácido siálico), y derivados, mezclas y copolímeros de los mismos.

- 35 En consecuencia, se puede conjugar un polímero, preferiblemente hidrófilo, con el agente activo, u otros elementos químicos asociados descritos en esta memoria, para potenciar el suministro del agente activo a las células cancerosas. El producto de conjugación de polímero-agente activo se administra preferiblemente en una cantidad eficaz para prolongar el tiempo de circulación en la sangre y/o reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad de dicha composición con respecto al agente activo nativo o no derivatizado. Los polímeros hidrófilos particularmente preferidos incluyen polivinilpirrolidona, poli(vinil-metil-éter), polihidroxipropilmetacrilamida, poli(metacrilato de hidroxipropilo), poli(acrilato de hidroxietilo), polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, poliaspartamida y/o derivados hidrófilos de celulosa. Un polímero hidrófilo preferible es un polietilenglicol que tiene, por ejemplo, un peso molecular de entre aproximadamente 1000 y 10.000 dáltones. El polietilenglicol tiene un peso molecular de entre 1000 y 5000 dáltones. En la Publicación de EE.UU. n° 20020041898 Previa a la Concesión, publicada el 11 de abril de 2002, se discuten con más detalle polímeros adicionales considerados para uso.

- 45 Los componentes de direccionamiento se unen a un tipo celular seleccionado definido o a una población definida de células diana, tal como células cancerosas. Los componentes de direccionamiento útiles a este respecto incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

- 50 Los componentes de direccionamiento de la presente invención son anticuerpos, que reaccionan con un antígeno sobre la superficie de una célula diana. Se pueden emplear anticuerpos tanto policlonales como monoclonales que son comercialmente asequibles o se describen en la bibliografía. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de los mismos. Se pueden producir anticuerpos monoclonales y fragmentos de acuerdo con técnicas convencionales, tales como síntesis de hibridomas, técnicas de DNA recombinante y síntesis proteica. Los anticuerpos monoclonales y fragmentos útiles pueden proceder de cualquier especie (incluyendo seres humanos) o se pueden formar como proteínas quiméricas en que se emplean secuencias de más de una especie.

- 55 En un aspecto, como componentes de direccionamiento se usan anticuerpos monoclonales humanos o anticuerpos murinos humanizados. Los componentes de direccionamiento humanizados son capaces de disminuir la inmunorreactividad del anticuerpo o polipéptido en el huésped receptor, permitiendo un aumento de la semivida y una reducción de las reacciones inmunes negativas. Los anticuerpos monoclonales murinos se pueden humanizar,

por ejemplo, al recombinar genéticamente la secuencia de nucleótidos que codifica la región Fv murina o las regiones determinantes de complementariedad de la misma con la secuencia de nucleótidos que codifica una región de dominio constante humano y una región de Fc. También se pueden conservar restos murinos dentro de los dominios estructurales de región variable humanos para asegurar unas apropiadas características de unión al sitio diana. Un ejemplo no restrictivo de un componente de direccionamiento es el anticuerpo anti- α -2-GP hacia células gliales del cerebro (alfa-2 glicoproteína), que es descrito por Slepnev et al., *Bioconjugate Chem.* 3: 273-274 (1992). B. Bodey (2001), *Expert Opin. Biol. Ther.* 1 (4): 603-17, ha revisado anticuerpos genéticamente modificados para el suministro de diversos agentes activos a células cancerosas.

Con objeto de disminuir la exposición de la ureasa, como agente activo, a células o tejidos no diana, se pueden explorar los componentes de direccionamiento para identificar aquellos que presentan una reactividad mínima hacia no dianas mientras conservan la especificidad y la reactividad por la diana. Al reducirse la exposición a no dianas (y la localización y/o toxicidad negativas sobre no dianas), se pueden administrar dosis aumentadas de ureasa u otro agente activo. Esto permite la administración de la mayor concentración posible de ureasa u otro agente terapéutico con objeto de maximizar la exposición de las células diana, mientras se permanece por debajo del umbral de la toxicidad inaceptable sobre células no diana.

En ciertas realizaciones se emplean dos o más productos de conjugación de agente activo-componente de direccionamiento, en donde cada producto de conjugación incluye un componente de direccionamiento diferente, tal como, por ejemplo, una especie de anticuerpo diferente. Cada uno de los componentes de direccionamiento utilizados se une a una diferente región de sitio diana que puede estar asociada con el mismo sitio diana o con un sitio diana diferente. El componente de agente activo de cada producto de conjugación administrado puede ser igual o diferente. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 4.867.962 y 5.976.535. En la práctica de esta realización de la invención, se mejora la acumulación de producto de conjugación de agente activo en el sitio diana porque cada componente de direccionamiento, por ejemplo, cada especie de anticuerpo, reconoce una diferente región de sitio diana, por ejemplo, un epítipo de sitio diana. Este planteamiento alternativo de regiones de sitio diana proporciona más posibles puntos de unión al sitio diana para el agente activo. En consecuencia, se puede evitar la saturación real o eficaz de sitios diana, por ejemplo, a través de saturación de epítopos y/o impedimento estérico. De esta manera, se puede llevar a cabo una acumulación aditiva de agente activo, por ejemplo, de ureasa. Alternativamente, o en combinación, se pueden emplear productos adicionales de genes específicos de ureasa como agentes activos, por ejemplo, para la producción de una holoenzima catalíticamente activa en el sitio diana. Una apoenzima ureasa ejemplar incluye las subunidades gamma, beta y alfa codificadas por los genes bacterianos *ureABC* (R. A. Burne y Y. M. Chen (2000), *Microbes and Infection* 2: 533-542).

Los patrones de reactividad cruzada para los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un sitio diana particular pueden ser analizados para identificar un conjunto de dos o más anticuerpos monoclonales específicos de la diana con reactividad cruzada no solapante, para uso en una aplicación diagnóstica o terapéutica. La frase "patrones de reactividad cruzada no solapantes" indica que los tejidos no diana a los que se une una especie de anticuerpo difieren sustancialmente de los tejidos no diana a los que se une otra especie de anticuerpo. Los patrones de reactividad cruzada difieren hasta el punto necesario para reducir proporcionalmente la exposición del agente activo para aplicaciones terapéuticas. Se prefiere menos solapamiento de pares de anticuerpos (o un conjunto más grandes de anticuerpos).

Los anticuerpos pueden ser explorados mediante una diversidad de métodos. Se puede emplear un análisis inmunohistoquímico para determinar la reactividad con tejido diana y la reactividad cruzada con tejido no diana. Los tejidos a los que se une la especie de anticuerpo pueden ser identificados al exponer el tejido al anticuerpo; lavar el tejido para eliminar todo anticuerpo no unido; y detectar la presencia de anticuerpo unido. En la técnica se conocen procedimientos histoquímicos *in vitro*. Véase, por ejemplo, E. Sánchez-Islas y M. León-Olea (2001), *Nitric Oxide* 5 (4): 302-16.

La composición descrita puede tener también utilidad en el tratamiento de tumores que secretan hCG. Puesto que el trofoblasto placentario es el sitio normal de la síntesis de hCG, es comprensible que los tumores trofoblásticos tanto gestacionales como no gestacionales sinteticen y secreten hCG. En realidad, las mediciones de hCG han sido bastante útiles para el diagnóstico de estos tumores, determinando la fase de los tumores, y para controlar los efectos de la terapia. Además, algunos tumores no trofoblásticos pueden producir ectópicamente hCG. La hCG puede actuar como un factor de crecimiento para ciertos tumores [S. Melmed y G. D. Braunstein: "Human chorionic gonadotropin stimulates proliferation of Nb 2 rat lymphoma cells", *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 1068-1070 (1983)]. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 6.448.022.

Por lo tanto, el uso de un anticuerpo anti-hCG para dirigir el agente activo a un tumor que secreta hCG suprime el crecimiento del tumor que secreta hCG.

Como se indicó anteriormente, de acuerdo con una realización de la invención, el agente activo se conjuga directamente con el componente de direccionamiento. Alternativamente, se emplea una estrategia de dos o tres etapas para suministrar el agente activo a las células cancerosas. De este modo, el agente activo puede incluir una primera pareja ligante que sea capaz de interaccionar con una segunda pareja ligante, y la especie química puede incluir un componente de direccionamiento que incluya la segunda pareja ligante. Estas realizaciones se describen

más adelante, en la Sección III, con mayor detalle.

Quien tiene experiencia apreciará que los componentes de direccionamiento de esta invención y los agentes activos se pueden unir entre sí en cualquier orden. De este modo, cuando el componente de direccionamiento es un polipéptido, el agente activo se puede unir al extremo amínico o al carboxílico de la molécula de direccionamiento. El componente de direccionamiento se puede unir también a una región interna del agente activo o, por el contrario, el agente activo se puede unir a una posición interna del componente de direccionamiento, con tal de que la fijación no interfiera en las respectivas actividades de las moléculas.

El componente de direccionamiento y el agente activo se pueden unir mediante cualquiera de diversos medios bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica. Típicamente, el agente activo se conjuga, directamente o por medio de un conector (espaciador), con el componente de direccionamiento. Sin embargo, cuando tanto el componente de direccionamiento como el agente activo son polipéptidos, puede resultar preferible que se exprese recombinantemente la molécula quimérica como una proteína de fusión de cadena única.

En una realización, el componente de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo IgG α hEGFR) se conjuga químicamente con el agente activo. Los medios para conjugar químicamente moléculas son bien conocidos por quienes tienen experiencia.

El procedimiento para fijar un agente a un anticuerpo u otra molécula polipeptídica de direccionamiento variará de acuerdo con la estructura química del agente. Los polipéptidos contienen típicamente una variedad de grupos funcionales, por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH) y amina libre ($-NH_2$), que están disponibles para su reacción con un grupo funcional adecuado de un agente activo con objeto de unir a éste el componente de direccionamiento.

Alternativamente, se pueden derivatizar el componente de direccionamiento y/o el agente activo para exponer o fijar grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la fijación de cualquiera de diversas moléculas conectoras, tales como las asequibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, EE. UU.

Un "conector", como se emplea en esta memoria, es una molécula que se utiliza para unir el componente de direccionamiento al agente activo. El conector es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el componente de direccionamiento como con el agente activo. Los conectores adecuados son bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, conectores carbonados de cadena lineal o ramificada, conectores carbonados heterocíclicos y conectores peptídicos. Cuando el componente de direccionamiento y la molécula de agente activo son polipéptidos, los conectores se pueden unir a los aminoácidos constitutivos por medio de sus grupos laterales (por ejemplo, a la cisteína por medio de un enlace disulfuro). Sin embargo, en una realización preferida, los conectores se unirán a los grupos amino y carboxilo de carbono alfa de los aminoácidos terminales.

Para formar el producto de inmunoconjugación deseado, se puede utilizar un conector bifuncional que tenga un grupo funcional que reacciona con un grupo de un agente particular, y otro grupo que reacciona con un anticuerpo. Alternativamente, la derivatización puede implicar el tratamiento químico del componente de direccionamiento, tal como, por ejemplo, la escisión glicólica del componente de azúcar de un anticuerpo glicoproteico con peryodato para generar grupos aldehído libres. Los grupos aldehído libres del anticuerpo pueden ser hechos reaccionar con grupos amina o hidrazina libres de un agente para unir el agente a aquél (véase la Patente de EE.UU. n° 4.671.958). También se conocen procedimientos para la generación de grupos sulfhidrido libres en polipéptidos tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (véase la Patente de EE.UU. n° 4.659.839).

Se conocen muchos procedimientos y moléculas conectoras para la fijación de diversos compuestos, incluyendo quelatos de metales radionucleidos, toxinas y fármacos, a proteínas, tales como anticuerpos [véanse, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea n° 188.256; las Patentes de EE.UU. números 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784, 4.680.338, 4.569.789 y 4.589.071; y Borlinghaus et al. (1987), *Cancer Res.* 47: 4071-4075]. En particular, la producción de diversas inmunotoxinas es bien conocida en la técnica y se puede hallar, por ejemplo, en "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpe et al., *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, páginas 168-190 (1982); Waldmann (1991), *Science* 252: 1657; y las Patentes de EE.UU. números 4.545.985 y 4.894.443.

En algunas circunstancias, es deseable liberar a la molécula de agente activo del componente de direccionamiento cuando la molécula quimérica ha alcanzado su sitio diana. Por lo tanto, los productos de conjugación quiméricos que comprenden enlaces que son escindibles en las inmediaciones del sitio diana se pueden utilizar cuando el efector va a ser liberado en el sitio diana. La escisión del enlace para liberar el agente del componente de direccionamiento puede ser provocada por actividad enzimática o por las condiciones a que es sometido el producto de conjugación, sea dentro de la célula diana o sea en las inmediaciones del sitio diana. Se ha de apreciar que, cuando el sitio diana es un tumor, se puede utilizar un conector que sea escindible bajo las condiciones presentes en el sitio del tumor (por ejemplo, cuando se expone a un pH ácido o a enzimas asociadas al tumor).

Quienes tienen experiencia en la técnica conocen diversos conectores escindibles diferentes (véanse las Patentes

de EE.UU. números 4.618.492, 4.542.225 y 4.625.014). Los mecanismos para la liberación de un agente activo de estos grupos conectores incluyen, por ejemplo, la irradiación de un enlace fotolábil y la hidrólisis catalizada por ácidos. La Patente de EE.UU. n° 4.671.958, por ejemplo, incluye una descripción de productos de inmunconjugación que comprenden conectores que son escindidos *in vivo* en el sitio diana por las enzimas proteolíticas del sistema de complemento del paciente. A la vista del gran número de métodos que se han comunicado para fijar una diversidad de compuestos radiodiagnósticos, compuestos radioterapéuticos, fármacos, toxinas y otros agentes a componentes de direccionamiento, un experto en la técnica será capaz de determinar un método adecuado para fijar un agente dado a un componente de direccionamiento seleccionado.

Cuando el componente de direccionamiento y/o el agente activo son relativamente cortos, pueden ser sintetizados usando técnicas químicas estándares para síntesis peptídica. Cuando ambas moléculas son relativamente cortas, la molécula química puede ser sintetizada como un único polipéptido contiguo. Alternativamente, el componente de direccionamiento y el agente activo pueden ser sintetizados separadamente y ser luego fusionados por condensación del extremo amínico de una molécula con el extremo carboxílico de la otra molécula, formándose por ello un enlace peptídico. Alternativamente, cada una de las moléculas de componente de direccionamiento y de agente activo se puede condensar con un extremo de una molécula espaciadora peptídica, formándose por ello una proteína de fusión contigua.

Para una realización del método para la síntesis química de los polipéptidos de esta invención, se contempla una síntesis en fase sólida en que se fija el aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble y luego se añaden secuencialmente los restantes aminoácidos de la secuencia. Barany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, páginas 3-284, en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A; Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2156 (1963); y Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª edición, Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois, EE.UU. (1984), describen técnicas para síntesis en fase sólida.

En una realización preferida, las proteínas de fusión químicas de la presente invención se sintetizan usando una metodología de DNA recombinante. En general, esto implica crear una secuencia de DNA que codifique la proteína de fusión, colocar el DNA en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, hacer que se exprese la proteína en un huésped, aislar la proteína expresada y, si es necesario, renaturalizar la proteína.

El DNA que codifica las proteínas de fusión de esta invención se puede preparar mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas o la síntesis química directa mediante métodos tales como el método del fosfotriéster de Narang et al. (1979), *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; el método del fosfodiéster de Brown et al. (1979), *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; el método de la dietilfosforamida de Beaucage et al. (1981), *Tetra. Lett.* 22: 1859-1862; y el método del soporte sólido de la Patente de EE.UU. n° 4.458.066.

La síntesis química produce un oligonucleótido de cadena sencilla. Éste se puede convertir en DNA de doble cadena por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una DNA polimerasa usando la cadena sencilla como molde. Quien tiene experiencia reconocerá que, aunque la síntesis química de DNA está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

Alternativamente, se pueden clonar subsecuencias y se pueden escindir las subsecuencias apropiadas usando enzimas de restricción apropiadas. Luego se pueden ligar los fragmentos para producir la secuencia de DNA deseada.

Preferiblemente, aunque las dos moléculas son esencialmente unidas directamente entre sí, quien tiene experiencia apreciará que las moléculas pueden ser separadas por un espaciador peptídico que consista en uno o más aminoácidos. En general, el espaciador no tendrá actividad biológica específica alguna que no sea la de unir las proteínas o mantener cierta distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, los aminoácidos constitutivos del espaciador pueden ser seleccionados para que influyan en alguna propiedad de la molécula, tal como la plegadura, la carga neta o la hidrofobia.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión se pueden expresar en una diversidad de células huésped, incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levaduras y diversas células eucarióticas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y líneas celulares de mieloma. El gen de la proteína recombinante estará operativamente unido a secuencias de control de la expresión apropiadas para cada huésped. Para *E. coli*, esto incluye un promotor tal como el promotor de T7, trp o lambda, un sitio de unión al ribosoma y, preferiblemente, una señal de terminación de la transcripción. Para células eucarióticas, las secuencias de control incluirán un promotor y preferiblemente un potenciador derivados de genes inmunoglobulínicos, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias dadoras yceptoras de corte y empalme.

Los plásmidos pueden ser transferidos a la célula huésped elegida mediante métodos bien conocidos, tales como la transformación con cloruro cálcico para *E. coli* y el tratamiento con fosfato cálcico o la electroporación para células

de mamífero. Las células transformadas por los plásmidos pueden ser seleccionadas por su resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes amp, gpt, neo e hyg.

Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes pueden ser purificadas de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares [véanse R. Scopes (1982), *Protein Purification*, Springer-Verlag, New York; y Deutscher (1990), *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., New York]. Se prefieren composiciones sustancialmente puras con una homogeneidad de al menos aproximadamente 90 a 95%, y las más preferidas para usos farmacéuticos son aquéllas con una homogeneidad de 98 a 99% o más. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad, según se desee, los polipéptidos pueden ser usados terapéuticamente.

Quien tiene experiencia en la técnica reconocerá que, después de la síntesis química, la expresión biológica o la purificación, la proteína de fusión dirigida puede poseer una conformación sustancialmente distinta a las conformaciones nativas de los polipéptidos constitutivos. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y hacer luego que el polipéptido se vuelva a plegar en la conformación preferida. Los métodos para reducir y desnaturalizar proteínas e inducir la replegadura son bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica [véanse, Debinski et al. (1993), *J. Biol. Chem.* 268: 14.065-14.070; Kreitman y Pastan (1993), *Bioconjug. Chem.* 4: 581-585; y Buchner et al. (1992), *Anal. Biochem.* 205: 263-270].

Quien tiene experiencia reconocerá que se pueden realizar modificaciones en las proteínas de fusión dirigidas sin disminuir su actividad biológica. Algunas modificaciones se pueden realizar para facilitar la clonación, la expresión, o la incorporación de la molécula de direccionamiento a una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por quienes tienen experiencia en la técnica e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida al extremo amínico para proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales situados en cualquier extremo para crear codones de terminación o sitios de restricción convenientemente colocados.

B3. Agentes activos encerrados

Se describe además el uso de vesículas tales como liposomas y/o nanocápsulas como sistemas químicos para el suministro de un agente activo o unos agentes activos, es decir, ureasa, a células cancerosas. Se pueden preferir tales formulaciones para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos, productos farmacéuticos, y/o anticuerpos descritos en esta memoria. La formación y el uso de liposomas son generalmente conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica [véase, por ejemplo, M. V. Backer et al. (2002), *Bioconjug. Chem.* 13 (3): 462-7]. En una realización preferida, la composición descrita puede ser encerrada en un liposoma.

En general, las nanocápsulas pueden encerrar compuestos de un modo estable y reproducible [J. Whelan (2001), *Drug Discov. Today* 6 (23): 1183-84]. Para evitar efectos secundarios debidos a una sobrecarga polímera intracelular, dichas partículas ultrafinas (con un tamaño de aproximadamente 0,1 µm) se pueden diseñar usando polímeros que pueden ser degradados *in vivo*. Para uso en la presente invención se contemplan nanopartículas biodegradables de poli(cianoacrilato de isobutilo) que satisfacen estos requisitos, y tales partículas pueden ser fácilmente preparadas, como se describe en, por ejemplo, G. Lambert et al. (2001), *Int. J. Pharm.* 214 (1-2): 13-6. En las Patentes de EE.UU. números 4.329.332, 4.489.055 y 4.913.908 se describen métodos para preparar nanopartículas de poli(cianoacrilato de alquilo) que contienen sustancias biológicamente activas, y su uso. Las nanocápsulas son comercialmente asequibles de fuentes tales como Capsulation, Inc. (www.capsulation.com).

En las Patentes de EE.UU. números 5.500.224, 5.620.708 y 6.514.481 se describen composiciones farmacéuticas que contienen nanocápsulas para el suministro de agentes activos. En la Patente de EE.UU. nº 5.500.224 se describe una composición farmacéutica en forma de una suspensión coloidal de nanocápsulas que comprenden una fase oleosa que consiste esencialmente en un aceite que contiene un agente tensioactivo disuelto en él, y, suspendidas en aquélla, una pluralidad de nanocápsulas que tienen un diámetro inferior a 500 nanómetros. En la Patente de EE.UU. nº 5.620.708 se describen composiciones y métodos para la administración de fármacos y otros agentes activos. Las composiciones comprenden una partícula portadora de agente activo fijada a un componente ligante que se une específicamente a una molécula diana presente en la superficie de un enterocito de mamífero. El componente ligante se une a la molécula diana con una afinidad o avedez de unión suficiente para iniciar la endocitosis o fagocitosis del portador corpuscular de agente activo para que el portador sea absorbido por el enterocito. El agente activo será luego liberado del portador a la circulación sistémica del huésped. De este modo, se puede evitar la degradación de fármacos sensibles a la degradación, tales como polipéptidos, en los intestinos mientras se aumenta la absorción de proteínas y polipéptidos desde el tracto intestinal. Alternativamente, se contempla la liberación del agente activo en el entorno que rodea la célula diana. Por ejemplo, se libera ureasa de la nanocápsula después de que el componente diana se una a la célula diana, por lo que se libera ureasa en el microentorno que rodea la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral. En las Patentes de EE.UU. números 6.379.683 y 6.303.150 se describen métodos para preparar nanocápsulas y el uso de las mismas.

Por lo tanto, la puesta en contacto puede incluir añadir a las células un producto de conjugación que comprende un componente de direccionamiento y un primer péptido que forma bucles caracterizado por una carga seleccionada y

una capacidad para interaccionar con un segundo péptido que forma bucles, opuestamente cargado, para formar un heterodímero estable de bucles enrollados α -helicoidales. Posteriormente se añade un liposoma a las células. El liposoma comprende una superficie exterior y un compartimento interno; un agente activo, por ejemplo, ureasa, situado dentro del compartimento interno del liposoma; y una pluralidad de segundos péptidos, en donde cada segundo péptido está conectado a la superficie exterior del liposoma.

En otra realización, descrita más adelante con detalle, la puesta en contacto incluye añadir liposomas a las células, en donde los liposomas tienen el agente activo, por ejemplo, ureasa, en forma encerrada, y la superficie externa del liposoma incluye un componente de direccionamiento celular eficaz para unirse específicamente a una superficie diana, y un revestimiento de polímero hidrófilo eficaz para proteger al componente de direccionamiento de la interacción con la superficie diana. El revestimiento de polímero hidrófilo puede estar compuesto de cadenas de polímero que están covalentemente unidas a componentes lipídicos superficiales de los liposomas por medio de enlaces escindibles. En esta realización, se añade un agente de liberación a las células tumorales en una cantidad eficaz para causar la liberación de una porción sustancial de los enlaces de los liposomas añadidos, exponiéndose por ello el componente de direccionamiento a la superficie diana. Los enlaces escindibles pueden ser enlaces químicos reducibles tales como enlaces disulfuro, éster y peptídico. Preferiblemente, el componente de afinidad es eficaz para unirse específicamente a un antígeno específico del cáncer.

De acuerdo con esta realización, se contempla un método de terapia basada en liposomas para un sujeto mamífero. El método incluye administrar sistémicamente al sujeto, por ejemplo, administrar intravenosamente, liposomas que tienen un componente de direccionamiento unido a la superficie y un revestimiento de polímero hidrófilo. El revestimiento de polímero hidrófilo, compuesto de cadenas de polímero escindiblemente fijadas, es eficaz para proteger al componente de direccionamiento de la interacción con su diana. Los polímeros hidrófilos preferidos se discutieron anteriormente. Los liposomas administrados son dejados circular sistémicamente hasta que se alcanza una biodistribución deseada de los liposomas. Se administra al sujeto un agente de liberación, como se describe más adelante, en una cantidad eficaz para causar la escisión de una porción sustancial, por ejemplo, más de aproximadamente el 50%, preferiblemente más de aproximadamente el 70%, y más preferiblemente más de aproximadamente el 90%, de los enlaces escindibles de los liposomas administrados. El componente de direccionamiento queda expuesto para la interacción con su diana tras la liberación de la cadena de polímero hidrófilo.

En una realización preferida, se usan los liposomas para el tratamiento de un tumor sólido. Los liposomas incluyen ureasa, y opcionalmente un agente activo adicional, por ejemplo, un fármaco antitumoral, en forma encerrada y se dirigen a la región tumoral por medio de un componente de direccionamiento eficaz para unirse específicamente a un antígeno específico del tumor. En un método ejemplar, los liposomas se dirigen a las células del endotelio vascular de tumores al incluirse un ligando de VEGF en los liposomas, para la fijación selectiva a los receptores Flk-1,2 expresados en las células endoteliales tumorales en proliferación [T. M. Niederman et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (10): 7009-14].

Preferiblemente, los liposomas tienen un tamaño de aproximadamente 30-400 nm. Se ha mostrado que los liposomas con tamaño en este intervalo son capaces de entrar en tumores a través de "brechas" presentes en el revestimiento de células endoteliales de la vasculatura tumoral [K. Maruyama et al. (1999), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 40 (1-2): 89-102].

Después de la administración de los liposomas, por ejemplo, una administración intravenosa, y después de que ha transcurrido el tiempo suficiente para permitir a los liposomas distribuirse por el sujeto y unirse al tumor, se administra un agente de liberación al sujeto para liberar de los liposomas el revestimiento superficial hidrófilo. La liberación del revestimiento superficial es eficaz para exponer el componente de direccionamiento para permitir la unión de los liposomas a las células diana. En una realización, el revestimiento superficial hidrófilo se fija a los liposomas mediante enlaces sensibles al pH. Los enlaces se liberan después de que los liposomas se unen al tumor.

En cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas, los liposomas pueden incluir opcionalmente uno o más fármacos antitumorales o agentes formadores de imágenes, o ambos, encerrados. Se pueden añadir los liposomas y dejar que se distribuyan, después de lo cual se puede administrar un agente de liberación para liberar el revestimiento superficial hidrófilo para exponer el componente de direccionamiento fijado e iniciar la unión. De esta forma, el fármaco antitumoral o el agente formador de imágenes, o ambos, encerrados se administran específica y localmente a la diana. Más adelante, en la Sección III.A, se describen fármacos anticancerosos ejemplares. Más adelante, en la Sección III.B, se describen agentes ejemplares formadores de imágenes para uso en el método de la invención. Los liposomas se pueden preparar y administrar del modo descrito en la Patente de EE.UU. n° 6.043.094.

Se pueden emplear agentes de suministro adicionales, tales como vesículas unilaminares pequeñas (SUVs; del inglés, *small unilamellar vesicles*), como se describe en la Patente de EE.UU. n° 6.180.114.

modulador. Un "modulador de ureasa" es un inhibidor de ureasa o un potenciador de ureasa. En consecuencia, en las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), el modulador puede ser seleccionado de entre todas, o porciones de, las secuencias polinucleotídicas de ureasa, moléculas antisentido de ureasa, polipéptidos de ureasa, y moduladores proteicos, peptídicos u orgánicos de la bioactividad ureasa, tales como inhibidores,

antagonistas (incluyendo anticuerpos) y agonistas. Preferiblemente, el modulador es activo en cuanto a tratar un estado médico que es mediado o mejorado por la expresión de ureasa o la actividad ureasa.

Un "inhibidor de ureasa" comprende una molécula o grupo de moléculas que interfiere en: (1) la expresión, modificación, regulación, activación o degradación de la ureasa; o (2) una o más de las funciones normales de la ureasa, incluyendo la hidrólisis de urea que conduce a la producción de carbamato y amoníaco. Un inhibidor "actúa directamente sobre la ureasa" cuando el inhibidor se une a la ureasa a través de interacciones electrostáticas o químicas. Dichas interacciones pueden ser mediadas o no por otras moléculas. Un inhibidor actúa "indirectamente sobre la ureasa" cuando su efecto más inmediato es sobre una molécula distinta de la ureasa que influye en la expresión, activación o acción de la ureasa.

Los inhibidores de ureasa sirven para lentificar la conversión de urea en iones amonio. Los inhibidores de ureasa incluyen, pero no se limitan a, derivados del ácido hidroxámico (por ejemplo, ácido acetohidroxámico), derivados de fosforamida (por ejemplo, fluorofamida), fosfatos, tioles (por ejemplo, 2-mercaptoetanol, etc.), ácido bórico, compuestos de halógeno (por ejemplo, fluoruros, etc.) y extracto de corteza de *Cinnamomum cassia*. Inhibidores de ureasa adicionales son conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica y se describen en la Patente de EE.UU. nº 4.824.783 (25 de abril de 1989).

Un "potenciador de ureasa" comprende una molécula o grupo de moléculas que potencia: (1) la expresión, modificación, regulación o activación de la ureasa; o (2) una o más de las funciones normales de la ureasa. Un potenciador "actúa directamente sobre la ureasa" cuando el potenciador se une a la ureasa a través de interacciones electrostáticas o químicas. Dichas interacciones pueden ser mediadas o no por otras moléculas. Un potenciador actúa "indirectamente sobre la ureasa" cuando su efecto más inmediato es sobre una molécula distinta de la ureasa que influye en la expresión, activación o acción de la ureasa.

C. Agentes activos adicionales

También se pueden incluir agentes activos adicionales en la composición de la invención. Como agente activo adicional se utiliza un agente antitumoral (un agente activo contra las células en proliferación) en la composición antes de, concurrentemente con, o después de que las células entren en contacto con un primer agente activo. Por ejemplo, una vez que se ha dirigido ureasa a las células tumorales, puede tener la capacidad para modular o regular el entorno externo del tumor, por ejemplo, por medio de cambios en el pH. Los agentes activos, es decir, agentes antitumorales, que favorecen un entorno básico serán entonces más eficaces.

El agente activo es un compuesto antitumoral débilmente básico cuya eficacia está reducida por un gradiente de pH intracelular mayor/extracelular menor en un tumor sólido. Los compuestos antitumorales débilmente básicos ejemplares incluyen doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, epirubicina, mitomicina, bleomicina, alcaloides de *Vinca*, tales como vinblastina y vincristina, agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida e hidrocloreto de mecloretamina, y derivados antineoplásicos de purina y pirimidina.

Los agentes formadores de imágenes incluyen metales, isótopos radiactivos y agentes radioopacos (por ejemplo, compuestos que contienen galio, tecnecio, indio, estroncio, yodo, bario, bromo y fósforo), agentes radiotranslúcidos, agentes de contraste, colorantes (por ejemplo, colorantes fluorescentes y cromóforos) y enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica. En general, dichos agentes pueden ser fijados o encerrados usando diversas técnicas como las anteriormente descritas y pueden estar presentes en cualquier orientación. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 6.159.443 y 6.391.280.

Los agentes de contraste de acuerdo con la presente invención son útiles en las modalidades de obtención de imágenes, tales como agentes de contraste para rayos X, sondas lumínicas para obtención de imágenes, etiquetas de espín o unidades radiactivas.

Los ejemplos de materiales adecuados para uso como agentes de contraste en MRI incluyen los quelatos de gadolinio actualmente disponibles, tales como el ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) y la gadopentotato dimeglumina, así como hierro, magnesio, manganeso, cobre y cromo.

Los ejemplos de materiales útiles para CAT y rayos X incluyen materiales basados en yodo, tales como monómeros iónicos tipificados por el diatrizoato y el iotalamato, monómeros no iónicos tales como iopamidol, isohexol e ioversol, dímeros no iónicos tales como iotrol e iodixanol, y dímeros iónicos tales como, por ejemplo, ioxaglate.

Se pueden incorporar el aire y otros gases para uso en la obtención de imágenes por ultrasonidos. Estos agentes pueden ser detectados usando técnicas estándares disponibles en la técnica y un equipo comercialmente disponible.

De acuerdo con una realización de la invención, las células cancerosas son puestas en contacto con un agente formador de imágenes antes o después de, o tanto antes como después de, entrar en contacto con el agente activo. Por ejemplo, una vez que se ha dirigido la ureasa a las células tumorales, puede tener la capacidad de modular o regular el entorno externo del tumor, por ejemplo, a través de cambios en el pH. Los agentes formadores de imágenes que favorezcan un entorno básico serán entonces más eficaces.

Se ha mostrado que tanto los quelatos lantánidos luminiscentes basados en cicleno como aquellos que producen esencialmente señales de resonancia magnética son sensibles a cambios de pH. Las sondas luminiscentes utilizadas para percibir cambios en el pH detectan típicamente cambios en la duración de la fluorescencia del ion lantánido en función del pH. Análogamente, los agentes de contraste para resonancia magnética que modulan la relaxividad del protón del agua a través de cambios en el pH son útiles en la presente invención. En ambos casos, al cambiar el pH en un sistema dado, se pueden idear agentes con un contraste potenciado.

En consecuencia, se utiliza un agente de contraste sensible al pH en, o cerca de, la célula cancerosa. La célula o las células cancerosas también se exponen a una composición de ureasa que contiene enzima ureasa para causar un cambio de pH en, o cerca de, la célula cancerosa. De este modo, un cambio de pH causa que las propiedades de relajación de resonancia magnética nuclear de los protones del agua u otros núcleos del medio acuoso se cambien de un modo que sea reflejo del pH. Los ejemplos de agentes de contraste sensibles al pH que se pueden utilizar incluyen aquellos agentes que contienen un metal lantánido, tal como Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Db, Dy, Ho, Er, Tm, Yb y similares, u otro elemento paramagnético, tal como Fe, Mn, ^{17}O o similares. Los agentes de contraste específicos que se pueden utilizar incluyen H_2^{17}O , GdDOTA-4AmP(5-), que se describe en *Magn. Reson. Med.*, febrero de 2003, 49 (2): 249-57, y Fe(III)meso-tetra(4-sulfonatofenil)porfina (Fe-TPPS4), como se describe en Helpert et al. (1987), *Magnetic Resonance in Medicine* 5: 302-305, y la Patente de EE.UU. nº 6.307.372. Además, en la invención se puede utilizar Gd basado con polión, como se describe en Mikawa et al., *Acad. Radiol.* (2002), 9 (supl. 1): S109-S111.

Como otra alternativa, se puede proporcionar un reactivo de desplazamiento al medio acuoso que rodea la célula cancerosa. El reactivo de desplazamiento es configurado para que un cambio de pH afecte a las propiedades de desplazamiento químico de los protones del agua u otros núcleos de un modo que sea reflejo del pH. Luego se puede medir el cambio de las propiedades de desplazamiento químico usando resonancia magnética nuclear para determinar si el agente activo es biológicamente activo. Los reactivos de desplazamiento ejemplares que se pueden usar incluyen aquellos que contienen un metal lantánido, tal como Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Db, Dy, Ho, Er, Tm o Yb, u otro elemento paramagnético. Los ejemplos de reactivos de desplazamiento específicos que se pueden utilizar incluyen Tm(DOTP) (5-), el complejo de tulio (III) y 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetra(metilenofosfato), Dy(PPP) (2)(7)-tripolifosfato de disprosio, y similares.

En una realización de la invención, una estrategia de agente de contraste dual utilizando dos agentes de gadolinio, tales como el GdDTP(-5) insensible al pH y el pH-

E. Formulación de la composición

Como se indicó anteriormente, las composiciones de la invención comprenden un agente activo y un componente de direccionamiento asociado, por ejemplo, un polipéptido de ureasa o un polinucleótido de ureasa, y/o comprenden un compuesto químico o biológico que es activo como modulador de la expresión de ureasa o la actividad ureasa. Además, también se puede incluir un vehículo o agente adyuvante farmacéuticos biocompatibles.

La composición puede también incluir otras secuencias de nucleótidos, polipéptidos, fármacos u hormonas mezclados con excipiente(s) u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones distintas de las composiciones farmacéuticas comprenden opcionalmente líquido, es decir, agua o un líquido de base acuosa.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables que se van a añadir a las composiciones farmacéuticas son también bien conocidos por quienes son expertos en la técnica, y son fácilmente asequibles. La elección del excipiente vendrá determinada en parte por el método particular empleado para administrar el producto de acuerdo con la invención. En consecuencia, hay una gran variedad de formulaciones adecuadas para uso en el contexto de la presente invención.

En Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, Williams & Wilkins, 1995, se pueden hallar técnicas para la formulación y administración de composiciones farmacéuticas, técnicas que son bien conocidas por los expertos en este campo técnico. La elección del excipiente vendrá determinada en parte por el método particular empleado para administrar el producto de acuerdo con la invención. En consecuencia, hay una gran variedad de formulaciones adecuadas para uso en el contexto de la presente invención. Los métodos y excipiente siguientes son meramente ejemplares y no son restrictivos en modo alguno.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar usando cualquier método convencional, por ejemplo, mediante procedimientos de mezclamiento, disolución, granulación, levigación, emulsionamiento, encapsulación, encerramiento, solidificación rápida de masas fundidas, secado por pulverización, o liofilización. Sin embargo, la formulación farmacéutica óptima será determinada por quien tiene experiencia en la técnica dependiendo de la vía de administración y de la dosificación deseada. Tales formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, el índice de liberación *in vivo* y el índice de supresión *in vivo* del agente administrado. Dependiendo del estado que se trate, estas composiciones farmacéuticas se pueden formular y administrar del modo descrito más adelante en la Sección III.

Las composiciones farmacéuticas se formulan para que contengan vehículos farmacéuticamente aceptables

adecuados, y pueden comprender opcionalmente excipientes y agentes auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos hasta preparaciones que se puedan emplear farmacéuticamente. En general, la modalidad de administración determinará la naturaleza del vehículo. Por ejemplo, las formulaciones para administración parenteral pueden comprender disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Los vehículos adecuados para administración parenteral pueden ser seleccionados de entre disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua y otras disoluciones fisiológicamente compatibles. Los vehículos preferidos para administración parenteral son tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disoluciones de Ringer y disolución salina fisiológicamente tamponada. Para administración tisular o celular, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera particular en que se han de filtrar. Dichos agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Para preparaciones que comprenden proteínas, la formulación puede incluir materiales estabilizantes, tales como polioles (por ejemplo, sacarosa) y/o agentes tensioactivos (por ejemplo, agentes tensioactivos no iónicos), y similares.

Alternativamente, las formulaciones para uso parenteral pueden comprender suspensiones de los compuestos activos preparadas como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, y ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como triglicéridos y oleato de etilo, y liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede también contener adecuados estabilizantes o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas. También se pueden utilizar emulsiones, por ejemplo, dispersiones de aceite en agua y de agua en aceite, opcionalmente estabilizadas mediante un agente emulsivo o un agente dispersivo (materiales superficialmente activos; agentes tensioactivos). Para la administración parenteral también se pueden emplear liposomas, como se describió anteriormente, que contengan el agente activo.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente en dosis adecuadas para administración oral se pueden formular usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de tabletas, píldoras, cápsulas, sellos, pastillas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones o polvos. Como ilustración, se pueden obtener preparaciones farmacéuticas para uso oral combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, triturando opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados si es necesario, para obtener tabletas. En las formulaciones orales se pueden emplear vehículos líquidos de tipos similares a los descritos para uso parenteral, tal como, por ejemplo, disoluciones acuosas tamponadas, suspensiones y similares.

Estas preparaciones pueden contener uno o más excipientes, que incluyen, sin limitación: a) diluyentes tales como azúcares, incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol y sorbitol; b) aglutinantes tales como silicato de aluminio y magnesio, almidón de maíz, trigo, arroz o patata, etc.; c) materiales de celulosa tales como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona, gomas tales como goma arábiga y goma tragacanto, y proteínas tales como gelatina y colágeno; d) agentes disgregantes o solubilizantes tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, almidones, agar, y ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato sódico; o composiciones efervescentes; e) lubricantes tales como sílice, talco, ácido esteárico o su sal de magnesio o de calcio, y polietilenglicol; f) agentes saboreadores y edulcorantes; g) colorantes o pigmentos para, por ejemplo, identificar el producto o caracterizar la cantidad (dosificación) de agente activo; y h) otros ingredientes tales como conservantes, estabilizadores, agentes dilatadores, agentes emulsivos, agentes promotores de la solubilización, sales para regular la presión osmótica, y tampones.

La composición farmacéutica se puede proporcionar como una sal del agente activo, la cual se puede formar con muchos ácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, los ácidos clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes próticos que sean las correspondientes formas de base libre.

Como se indicó anteriormente, las características del propio agente y la formulación del agente pueden influir en el estado físico, la estabilidad, el índice de liberación *in vivo* y el índice de supresión *in vivo* del agente administrado. Dicha información farmacocinética y farmacodinámica puede ser recogida a través de estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*, y puede ser confirmada más tarde en seres humanos durante el curso de pruebas clínicas. Las directrices para llevar a cabo pruebas clínicas en seres humanos basándose en datos *in vivo* sobre animales se pueden obtener de diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, <http://www.clinicaltrials.gov>. De este modo, para cualquier compuesto de acuerdo con la invención, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz en mamíferos, particularmente en seres humanos, a partir de ensayos bioquímicos y/o de base celular. A continuación, se puede formular una dosificación en modelos animales para alcanzar un intervalo deseable de concentraciones en circulación que module la expresión o actividad del agente activo. Puesto que se llevan a cabo estudios en seres humanos, surgirá más información relativa a los niveles de dosificación y a la duración del tratamiento apropiados para diversas enfermedades y estados.

Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales experimentales para, por ejemplo, determinar la DL50

(la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población).

III. Método de la invención

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células cancerosas. El uso implica emplear uno o más de los componentes de la composición descrita anteriormente en la Sección II y/o más adelante en las Secciones IV-VII. El uso incluye exponer las células a ureasa, como un agente activo, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las células cancerosas.

A. Exposición de células cancerosas a un agente activo

La composición de ureasa, es decir, ureasa en combinación con un componente de direccionamiento eficaz para potenciar el suministro de la enzima a células cancerosas, se puede suministrar a las células cancerosas mediante diversos métodos conocidos en la técnica. En aplicaciones terapéuticas, la composición se administra a un paciente que tiene células cancerosas, en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de la(s) célula(s) cancerosa(s). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser expuestas a las células cancerosas mediante administración por diversas vías, incluyendo, sin limitación, las vías parenteral, entérica, transepitelial, transmucosa, transdérmica y/o quirúrgica.

Las modalidades de administración parenteral incluyen aquellas en que la composición se administra, por ejemplo, mediante inyecciones intravenosas, intraarteriales, intraperitoneales, intramedulares, intramusculares, intraarticulares, intratecales e intraventriculares, inyecciones subcutáneas, intragonadales e intratumorales mediante bolos, y perfusiones o microinfusiones continuas, periódicas o programadas prolongadas usando la apropiada tecnología de bombas. Las modalidades de administración entérica incluyen, por ejemplo, las administraciones oral (incluyendo bucal y sublingual) y rectal. Las modalidades de administración transepitelial incluyen, por ejemplo, la administración transmucosa y la administración transdérmica. La administración transmucosa incluye, por ejemplo, la administración entérica así como las administraciones nasal, por inhalación, y en el fondo del pulmón, la administración vaginal y la administración rectal. La administración transdérmica incluye las modalidades transdérmicas y transcutáneas pasivas y activas, incluyendo, por ejemplo, parches y dispositivos para iontoforesis, así como la aplicación tópica de pastas, pomadas o ungüentos. Las técnicas quirúrgicas incluyen la implantación de composiciones en depósito, bombas osmóticas y similares.

Se pueden administrar administraciones individuales o múltiples del agente activo dependiendo de la dosificación y la frecuencia, según sean requeridas y toleradas por el sujeto. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cantidad suficiente del agente activo de la invención para tratar eficazmente al sujeto.

Quien tiene experiencia en la técnica apreciará que hay ciertas regiones que no están muy vascularizadas o que están protegidas por células unidas mediante juntas apretadas y/o mecanismos de transporte activo que reducen o evitan la entrada de macromoléculas presentes en la corriente sanguínea. De esta manera, por ejemplo, la administración sistémica de productos terapéuticos para tratar gliomas u otros cánceres de cerebro puede estar restringida por la barrera hematoencefálica, que se opone a la entrada de macromoléculas en el espacio subaracnoideo. En este tipo de tumores, preferiblemente, la composición terapéutica se puede administrar directamente al sitio del tumor. Por lo tanto, los tumores de cerebro se pueden tratar, por ejemplo, administrando directamente la composición terapéutica al sitio del tumor, por ejemplo por medio de una inyección en bolo, una microinfusión o un catéter quirúrgicamente implantado.

La exposición puede incluir visualizar la célula cancerosa o el tumor con una herramienta para guía de imágenes, como se describe en, por ejemplo, "Enhanced Magnetic Resonance Imaging", redactado por V. M. Runge, C. V. Mosby Co. (1989), para MRI; en, por ejemplo, el Documento EP 188.256; Kozak et al., TIBTEC, octubre de 1986, 262; y "Radiotracers for Medical Applications", CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., para radiodiagnóstico y/o para radioterapia; en "Positron Emission Tomography of the Brain", Springer Verlag, 1983, para PET; y en J. W. Nowicky et al., "Macroscopic UV-Marking through Affinity", J. Tumor Marker Oncology 31, 463-465 (1988). De esta manera, se puede incorporar cualquiera de una diversidad de agentes diagnósticos a las composiciones, las cuales pueden suministrar local o sistémicamente los agentes incorporados después de su administración a un paciente.

En una realización, la exposición incluye investigar al sujeto con una herramienta diagnóstica capaz de detectar cambios en el pH extracelular de un tejido del sujeto, e identificar una región tisular del sujeto que muestre una elevación seleccionada del pH extracelular después de la administración. Basándose en la identificación, se puede repetir la exposición hasta que se alcance un cambio seleccionado en el pH extracelular dentro del tumor sólido entero.

En una realización, la exposición incluye administrar parenteralmente la composición de agente activo al sujeto de un modo distinto a mediante inyección directa. El agente activo puede ser derivatizado, como se discutió anteriormente en la Sección II.

Como se discutió anteriormente, la ureasa cataliza la hidrólisis de urea, lo que conduce a la producción de carbamato y amoníaco. En un entorno acuoso, el carbamato se descompone rápida y espontáneamente para producir una segunda molécula de amoníaco y una de dióxido de carbono (Figura 1). La ureasa tiene una gran

variedad de funciones. Su papel ambiental primario es permitir que los organismos usen la urea externa y la internamente generada como una fuente de nitrógeno. En las plantas, la ureasa puede participar en las vías sistémicas de transporte de nitrógeno y posiblemente actuar como una proteína de defensa frente a compuestos tóxicos.

5 El sustrato de la ureasa es la urea, que es producida en el hígado, transportada a los riñones por la corriente sanguínea y excretada en la orina. Las concentraciones séricas de urea en los seres humanos sanos están típicamente entre 1 y 10 mM, aunque los niveles de urea en orina pueden exceder de 0,5 M (Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck and Co., Inc., Rahway, New Jersey, EE.UU., 1999). La urea está también presente en las secreciones de las glándulas exocrinas principales y secundarias en concentraciones aproximadamente equivalentes a las del suero, por lo que una gran proporción de la urea circulante es translocada a superficies celulares por los sistemas secretores, y en exudados tisulares (R. A. Burne e Y. M. Chen, *Microbes and Infection*, 2, 2000: 533-542). Por ejemplo, los seres humanos adultos secretan al día casi 1 litro de saliva que contiene urea 1-10 mM, y aproximadamente el 20-25% de toda la urea producida entra en el tracto intestinal en lugar de salir del cuerpo por la orina [W. J. Visek, *Fed. Proc.* 31 (1972), 1178-1193]. No hay un evidente mecanismo de fluencia activa para la secreción exocrina de urea, por lo que se cree que la molécula de urea no cargada simplemente sigue al agua a través de las células y las junturas apretadas del epitelio. Como consecuencia, las superficies de las células del cuerpo humano están bañadas por un fluido que contiene urea [R. J. C. McLean et al., *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 16 (1988), 37-39].

B. Exposición en dos y tres fases

20 También se describe una estrategia de dos etapas que se puede usar para suministrar el agente activo a las células tumorales. Preferiblemente, las células tumorales están contenidas dentro de un sujeto. La estrategia de dos etapas tiene la ventaja de desacoplar la farmacocinética del agente activo de la del componente de direccionamiento. Se permite que el componente de direccionamiento se fije a los sitios diana mientras está conjugado con una primera pareja ligante, por ejemplo, un péptido que forma bucles. Después de la fijación del componente de

25 direccionamiento, sustancialmente todo el producto de conjugación no dirigido puede ser suprimido de la circulación del sujeto. Luego se puede administrar el agente activo como un producto de conjugación con el miembro complementario de la pareja ligante, por ejemplo, un segundo péptido que forma bucles.

Se puede utilizar cualquier sistema de dos fases conocido en la técnica, tal como biotina, haptenos, etc., que tengan una pareja ligante de alta afinidad, por ejemplo, avidina, anticuerpos específicos, etc. Véanse las Patentes de EE.UU. números 6.190.923, 6.187.285 y 6.183.721.

Un sistema de dos fases preferido incluye un sistema de bucles enrollados. De esta manera, empleando una estrategia de dos etapas como la anteriormente descrita, se añade a las células tumorales un primer producto de conjugación que comprende un componente de direccionamiento y un primer péptido que forma bucles caracterizado por una carga seleccionada y una capacidad para interactuar con un segundo péptido que forma bucles, opuestamente cargado, para formar un heterodímero estable de bucles enrollados α -helicoidales. En el Ejemplo 4 se describe un método ejemplar para conjugar un componente de direccionamiento de anticuerpo con un péptido que forma bucles.

Posteriormente se añade a las células un segundo producto de conjugación que comprende el segundo péptido que forma bucles y el agente activo. Un agente activo preferible es la ureasa. En el Ejemplo 2 se describe un método ejemplar para la conjugación de ureasa de *Canavalia ensiformis* con un péptido que forma bucles.

Cuando se mezclan entre sí un primer péptido que forma bucles y un segundo péptido que forma bucles bajo unas condiciones que favorecen la formación de heterodímeros de bucles enrollados α -helicoidales, interactúan para formar un complejo heterodímero de bucles enrollados α -helicoidales de dos subunidades. Los péptidos en conformación de bucles enrollados α -helicoidales interactúan entre sí de un modo característico que viene determinado por la secuencia primaria de cada péptido. La estructura terciaria de una hélice α es tal que siete restos de aminoácido de la secuencia primaria corresponden a aproximadamente dos vueltas de la hélice α . En consecuencia, una secuencia primaria de aminoácidos que da lugar a una conformación α -helicoidal se puede romper en unidades de siete restos cada una, denominadas "héptadas". Los heterodímeros-péptidos subunitarios están compuestos por una serie de héptadas en tándem. Cuando la secuencia de una héptada se repite en un heterodímero-péptido subunitario particular, a la héptada se puede hacer referencia como "héptada repetitiva", o simplemente "repetición".

Un primer péptido que forma bucles y un segundo péptido que forma bucles se pueden ensamblar en una hélice con bucles enrollados de heterodímero (heterodímero de bucles enrollados) en configuración paralela o antiparalela. En una configuración paralela, las dos hélices del heterodímero-péptido subunitario están alineadas de modo que tienen la misma orientación (amino-terminal a carboxilo-terminal). En una configuración antiparalela, las hélices están dispuestas de modo que el extremo amino-terminal de una hélice está alineado con el extremo carboxilo-terminal de la otra hélice, y viceversa. Dichas subunidades de heterodímero se describen en la solicitud de patente PCT WO 95/31480, "Heterodimer Polypeptide Immunogen Carrier Composition and Method", con fecha de publicación 23 de noviembre de 1995. A las unidades ejemplares se hace referencia en este documento como bucles K, refiriéndose a

subunidades positivamente cargadas cuya carga es proporcionada predominantemente por restos de lisina, y bucles E, refiriéndose a subunidades negativamente cargadas cuya carga es proporcionada predominantemente por restos de ácido glutámico. Los ejemplos preferidos de la solicitud anteriormente mencionada incluyen las ID. SEC. números 1-2.

- 5 Los heterodímeros-péptidos subunitarios diseñados de acuerdo con las directrices presentadas en la solicitud anteriormente referida muestran típicamente una preferencia por ensamblarse en una orientación paralela en vez de en una orientación antiparalela. Por ejemplo, los péptidos ejemplares identificados mediante la ID. SEC. nº 3 y la ID. SEC. nº 4 forman heterodímeros en configuración paralela, al igual que otras secuencias peptídicas (como se discute en la solicitud WO 95/31480). Un péptido ejemplar adicional incluye un péptido de bucle K compuesto por 7
- 10 aminoácidos, por ejemplo, repeticiones de la ID. SEC. nº 5. En una realización, el bucle K tiene una longitud de 35 aminoácidos y está positivamente cargado, sin estructura específica alguna en disolución. El bucle E puede ser un péptido compuesto por 7 aminoácidos, por ejemplo, repeticiones de la ID. SEC. nº 6. En una realización, el bucle E tiene una longitud de 35 aminoácidos, está negativamente cargado y no tiene estructura específica alguna en disolución.
- 15 Como se indicó, uno de los dos péptidos subunitarios del heterodímero contiene un componente de direccionamiento, y el otro péptido contiene un agente activo. En ambos casos, el péptido puede ser sintetizado o ser derivatizado después de la síntesis, para que proporcione la requerida función de fijación. Un método ejemplar de síntesis peptídica se describe en el Ejemplo 1. En general, la mayoría de los métodos de conjugación no alteran la actividad formadora de bucles del péptido que forma bucles, y dichas conjugaciones no alteran la actividad del
- 20 agente activo ni la del componente de direccionamiento conjugados.

Considerando la modificación del primer péptido que forma bucles, el péptido puede ser sometido a síntesis en su extremo N o C para que lleve péptidos terminales adicionales que puedan actuar como un espaciador entre el componente de direccionamiento y la parte del péptido que forma hélices. El componente de direccionamiento-péptido que forma bucles y/o el agente activo-péptido que forma bucles pueden ser sintetizados, como se indicó anteriormente, mediante métodos en estado sólido, de PCR o recombinantes, *in vivo* o *in vitro*.

25

Al formarse el producto de conjugación por medio de métodos en estado sólido, se fija el agente activo o el componente de direccionamiento, preferiblemente de modo covalente, al resto de aminoácido N-terminal o a uno de los restos que miran hacia la cara expuesta del heterodímero. Los grupos de copulación preferidos son los grupos tiol de restos de cisteína, que son fácilmente modificados mediante métodos estándares. Otros grupos de copulación

30 útiles incluyen el tioéster de la metionina, el grupo imidazolilo de la histidina, el grupo guanidinilo de la arginina, el grupo fenólico de la tirosina y el grupo indolilo del triptófano. Estos grupos de copulación pueden ser derivatizados usando condiciones de reacción conocidas por los expertos en la técnica.

Para unir el agente activo-segundo péptido que forma bucles con el componente de direccionamiento-primer péptido que forma bucles, se ponen los dos péptidos en contacto bajo unas condiciones que favorecen la formación del heterodímero. Un medio ejemplar que favorece la formación del heterodímero de bucles enrollados es una disolución acuosa fisiológicamente compatible que tiene típicamente un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8 y una concentración de sal de entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 500 mM. Preferiblemente, la concentración de sal es entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 200 mM. Un medio ejemplar tiene la composición siguiente: fosfato potásico 50 mM, KCl 100 mM, pH de 7. Se pueden preparar medios igualmente eficaces al sustituir, por ejemplo, el fosfato potásico por fosfato sódico y/o el KCl por NaCl. Se pueden formar heterodímeros bajo condiciones al margen del medio con los anteriores intervalos de pH y sal, pero algunas de las interacciones moleculares y la estabilidad relativa de los heterodímeros con respecto a los homodímeros pueden diferir de las características anteriormente detalladas. Por ejemplo, las interacciones iónicas entre los grupos iónicos, que tienden a estabilizar los heterodímeros, se pueden romper en valores de pH bajos o altos a causa de la protonación de, por ejemplo, las cadenas laterales de Glu en un pH ácido, o de la desprotonación de, por ejemplo, las cadenas laterales de Lys en un pH básico. Sin embargo, dichos efectos de los valores de pH bajos y altos sobre la formación del heterodímero de bucles enrollados pueden ser superados aumentando la concentración de sal.

35

40

45

Aumentar la concentración de sal puede neutralizar las atracciones iónicas estabilizantes o suprimir las repulsiones iónicas desestabilizantes. Ciertas sales presentan mayor eficacia a la hora de neutralizar las interacciones iónicas. Por ejemplo, en el caso del péptido de bucle K, se requiere una concentración 1 M o mayor de aniones ClO_4^- para inducir la máxima estructura α -helicoidal, mientras que se requiere una concentración 3 M o mayor de iones Cl^- para el mismo efecto. Los efectos de una elevada concentración de sal sobre la formación de bucles enrollados en pHs bajos y altos también muestran que las atracciones iónicas interhelicoidales no son esenciales para la formación de las hélices sino que, más bien, controlan si un bucle enrollado tiende a formarse más como un heterodímero que como un homodímero. El primer péptido que forma bucles, por ejemplo, un péptido de bucle E, y el segundo péptido que forma bucles, por ejemplo, un péptido de bucle K, también se pueden conjugar con componentes de direccionamiento y agentes activos del modo descrito en el Ejemplo 2 de la solicitud de propiedad conjunta de EE.UU. número 09/654.191 (nº de expediente del agente de patentes: 4800-0015.31). Véase también la Patente de EE.UU. nº 6.300.141.

50

55

60 En una realización, el agente activo-péptido que forma bucles tiene una semivida sérica corta y es excretado a

través de la vía renal. Por lo tanto, o el agente activo se fija al sitio diana o se elimina rápidamente del sujeto. Esta biodistribución de agente activo facilita la protección de los tejidos normales del receptor frente a una exposición indeseada. Con objeto de potenciar la excreción renal, se puede emplear la conjugación con una molécula que dirige la biodistribución promoviendo la excreción renal. Una alternativa a la etapa de supresión opcional es dejar que pase una cantidad de tiempo suficiente que permita que los mecanismos de supresión nativos del sujeto eliminen sustancialmente el primer producto de conjugación circulante.

En otra realización, se emplean componentes de direccionamiento basados en anticuerpo o no basados en anticuerpo para suministrar un ligando o un antiligando a un sitio diana que tiene un antígeno no regulado. Preferiblemente, con este fin se utiliza un agente ligante natural para dicho antígeno no regulado. Por ejemplo, enfermedades tales como el hepatoma y el mieloma se caracterizan generalmente por receptores de IL-6 no regulados para los cuales IL-6 actúa como un componente autocrino o paracrino con respecto a la rápida proliferación de estos tipos celulares diana. Por lo tanto, para el tratamiento de tales males se puede emplear IL-6 como un componente de direccionamiento. Véase, por ejemplo, C. Miki et al. (2002), *Cancer* 94 (5): 1584-92.

Por ejemplo, IL-6 y un primer péptido que forma bucles se pueden conjugar por medios químicos o se pueden formar como una molécula recombinante. Se administra el producto de conjugación de IL-6-primer péptido que forma bucles a un sujeto receptor, y el componente IL-6 del producto de conjugación dirige la localización del producto de conjugación en receptores de IL-6. Esta localización se producirá preferentemente en sitios que tienen receptores de IL-6 no regulados. Una vez que se ha producido la localización en el sitio diana, se administra opcionalmente un agente supresor, como se describe más adelante, para suprimir sustancialmente la circulación del producto de conjugación de IL-6-primer péptido que forma bucles del sujeto receptor. Los agentes supresores adecuados para este fin son, por ejemplo, receptor de IL-6-HSA-galactosa o anticuerpo anti-IL-6-HSA-galactosa. Después de un tiempo suficiente para la supresión sustancial, por ejemplo, del 50%, el 70% o preferiblemente el 90%, de IL-6 de la circulación del sujeto receptor, se administra el agente activo-segundo péptido que forma bucles, por ejemplo, ureasa-segundo péptido que forma bucles, que se localiza en sitios diana a través del producto de conjugación de IL-6-primer péptido que forma bucles.

Como se describe más adelante en la Sección VII con más detalle, se pueden utilizar vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, herpesvirus o vacciniavirus, o de diversos plásmidos bacterianos, para el suministro de moléculas de ureasa recombinantes a la población de células diana. Para construir vectores recombinantes que contengan ureasa, se pueden usar métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. y Ausubel et al. Alternativamente, se pueden suministrar agentes activos a células diana utilizando liposomas o nanocápsulas, como se describió en la Sección II anterior. En una realización, el método de la invención incluye administrar al sujeto una composición que contiene el agente activo y un componente de direccionamiento eficaz en cuanto a dirigir la composición a las células.

C. Agentes supresores

Como se discutió anteriormente, se puede administrar un agente supresor a un sujeto. El agente supresor es capaz de dirigir el primer producto de conjugación circulante a receptores de hepatocitos, disminuyendo por ello la cantidad de primer producto de conjugación circulante antes de la administración del segundo producto de conjugación.

Como se indicó anteriormente, los agentes supresores de composición proteica o no proteica que tienen propiedades físicas que facilitan su uso para la complejación *in vivo* y la supresión sanguínea de productos de conjugación de componente de direccionamiento no unidos pueden ser útiles cuando las células tumorales están contenidas dentro de un sujeto, por ejemplo, un ser humano. Los agentes supresores presentan preferiblemente una o más de las características siguientes: complejación rápida y eficaz con el componente de direccionamiento *in vivo*; rápida supresión de la sangre de los productos de conjugación de componente de direccionamiento capaces de unirse a un agente activo posteriormente administrado; elevada capacidad para suprimir o inactivar grandes cantidades de productos de conjugación de componente de direccionamiento; y baja inmunogenicidad.

Los agentes supresores útiles incluyen componentes basados en hexosas y no basados en hexosas. Los agentes supresores basados en hexosas son moléculas que se han derivatizado para incorporar a ellas una o más hexosas (componentes de azúcar de seis carbonos) reconocidas por receptores de Ashwell u otros receptores tales como el receptor de manosa/N-acetilglucosamina que están asociados con células endoteliales y/o células de Kupffer del hígado, o el receptor de manosa-6-fosfato. Las hexosas ejemplares incluyen galactosa, manosa, manosa-6-fosfato, N-acetilglucosamina y similares. También se pueden emplear otros componentes reconocidos por receptores de Ashwell, incluyendo glucosa, N-galactosamina, N-acetilgalactosamina, tioglicósidos de galactosa y, en general, D-galactósidos y glucósidos. La conjugación de tioglicósido de galactosa con una proteína se puede llevar a cabo del modo descrito, por ejemplo, en Lee et al. (1976), *Biochemistry* 15 (18): 3956, o Drantz et al. (1976), *Biochemistry* 15 (18): 3963.

Los agentes supresores de tipo proteico basados en galactosa incluyen proteínas que tienen restos de galactosa endógenos expuestos o que han sido derivatizadas para que expongan o incorporen tales restos de galactosa. Los restos de galactosa expuestos dirigen el agente supresor a una rápida supresión por endocitosis en el hígado a través de receptores específicos (receptores de Ashwell). Estos receptores se unen al agente supresor e inducen

endocitosis en el hepatocito, lo que conduce a la fusión con un lisosoma y a la recirculación del receptor de vuelta a la superficie celular. Este mecanismo de supresión se caracteriza por una elevada eficacia, una elevada capacidad y una rápida cinética.

5 Un agente supresor ejemplar de la variedad basada en proteína/que tiene galactosa es el derivado asialo-
orosomucoide de la glicoproteína ácida alfa-1 humana. La rápida supresión del asialo-orosomucoide de la sangre se
describe en Galli et al., *J. of Nucl. Med. Allied Sci.* (1988), 32 (2): 110-16. El tratamiento del orosomucoide con
neuraminidasa elimina los restos de ácido siálico, exponiendo por ello los restos de galactosa. Agentes supresores
derivatizados adicionales incluyen, por ejemplo, albúmina galactosilada, IgM galactosilada, IgG galactosilada,
asialohaptoglobina, asialofetúna y asialoceruloplasmina.

10 En la Patente de EE.UU. n° 6.358.490, expedida el 19 de marzo de 2002, la Patente de EE.UU. n° 6.172.045,
expedida el 9 de enero de 2001, y la Patente de EE.UU. n° 5.886.143, expedida el 23 de marzo de 1999, se
describen agentes supresores adicionales.

15 Otra clase de agentes supresores útiles en la presente invención incluye moléculas pequeñas, por ejemplo, con
tamaños en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 dáltones. Las moléculas pequeñas
pueden ser derivatizadas con galactosa. Los agentes supresores de molécula pequeña son preferiblemente capaces
de (1) complejarse rápida y eficazmente con el producto de conjugación, el péptido que forma bucles, el agente
activo y/o el componente de direccionamiento pertinentes; y (2) suprimir dichos complejos de la sangre a través del
receptor de galactosa, un sistema de degradación específico del hígado, en lugar de la agregación en complejos que
son absorbidos, por ejemplo, por el pulmón y el bazo. Además, la rápida cinética de la absorción hepática mediada
20 por galactosa, asociada con la afinidad de la interacción ligando-anti-ligando, permiten el uso de vehículos de peso
molecular intermedio o incluso bajo.

Se pueden usar agentes supresores no basados en galactosa de tipo proteico y de tipo polímero. Estos agentes
supresores pueden actuar a través de un mecanismo mediado por agregación. El agente supresor usado se puede
seleccionar basándose en el órgano diana del que se va a excluir el acceso del agente supresor. Por ejemplo,
25 cuando están implicadas dianas de células tumorales, puede ser útil un peso molecular elevado, por ejemplo, en el
intervalo de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 1.000.000 de dáltones.

Otra clase de agentes supresores incluye agentes que no eliminan los productos de conjugación de agente
activo/componente de direccionamiento circulantes sino que inactivan los productos de conjugación circulantes
bloqueando los sitios pertinentes del agente activo, el componente de direccionamiento, el liposoma, el vector vírico
30 y/o cualquier otra porción de los mismos. Estos agentes supresores de "tipo remate" son moléculas preferiblemente
pequeñas, por ejemplo, de 500 a 10.000 dáltones, y muy cargadas, tal como, por ejemplo, la sal tetrasódica del
ácido 6,6'-[(3,3'-dimetil[1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis(azo)bis[4-amino-5-hidroxi-1,3-naftaleno-disulfónico] derivatizado.

E. Dosificación/Administración

35 Para el uso de la invención, se puede utilizar cualquier régimen de administración eficaz que regule el tiempo y la
secuencia de las dosis. Los niveles de dosificación ejemplares para un sujeto humano dependerán del modo de
administración, la extensión (el tamaño y la distribución) del tumor, el tamaño del paciente y la sensibilidad del
cáncer al tratamiento con ureasa.

40 Cuando se inyecta directamente una composición de ureasa en un tumor, una dosis ejemplar es de 0,1 a 1000
unidades internacionales de actividad ureasa por mm³ de tumor. Por ejemplo, y suponiendo que se consiga una
distribución relativamente uniforme de la ureasa en el tumor, puede ser adecuada una dosis de entre 0,5 y 5
unidades internacionales. La colocación de la aguja de inyección puede ser guiada mediante técnicas
convencionales para guía por imágenes, por ejemplo, por fluoroscopia, para que el médico pueda ver la posición de
la aguja con respecto al tejido diana. Dichas herramientas de guía pueden incluir ultrasonidos, fluoroscopia,
tomografía computarizada (CT; del inglés, computerized tomography) y MRI.

45 De acuerdo con un aspecto, la eficacia o distribución de la dosis de ureasa administrada puede ser controlada,
durante o después de la inyección directa de ureasa en el tumor, controlando el tejido tumoral mediante una
herramienta capaz de detectar cambios de pH dentro de la región de tejido canceroso del sujeto. Dichas
herramientas pueden incluir una sonda de pH que se pueda insertar directamente en el tumor, o una herramienta de
visualización, tal como la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), la tomografía computarizada (CT)
50 o la fluoroscopia. La investigación mediante MRI puede ser llevada a cabo en ausencia de agentes adicionales
formadores de imágenes, basándose simplemente en diferencias de propiedades magnéticas del tejido en función
del pH. La CT o la obtención fluoroscópica de imágenes pueden requerir un agente formador de imágenes adicional,
sensible al pH, cuya opacidad se vea afectada por el pH del medio tisular. Dichos agentes son bien conocidos por
quienes tienen experiencia en la técnica.

55 Antes de cualquier inyección de ureasa, el tejido tumoral puede ser visualizado por su menor pH con respecto al del
tejido normal circundante. De esta manera, el tejido normal puede tener un pH normal de aproximadamente 7,2
mientras que el tejido tumoral puede tener de 0,1 a 0,4 o más unidades de pH menos. Es decir, antes de que se

inyecte ureasa, se puede definir la extensión del tejido tumoral por su menor pH. Después de la administración de ureasa, el pH de la región tumoral que tiene ureasa comenzará a crecer, y se puede identificar dicha región comparando las imágenes resultantes con las imágenes previas antes de la administración.

5 Investigando el tejido de este modo, se pueden controlar el grado de cambio del pH y la extensión del tejido afectado. Basándose en esta investigación, el médico puede administrar una composición adicional al sitio y/o puede administrar la composición a zonas adicionales situadas dentro del sitio tumoral. Este procedimiento se puede repetir hasta que se haya alcanzado un grado deseado de cambios de pH, por ejemplo, de 0,2 a 0,4 unidades de pH, a lo largo de la región total de tumor sólido.

10 Se puede repetir la administración por inyección directa a intervalos adecuados, por ejemplo, cada semana o dos veces a la semana, hasta que se observe un punto final deseado, preferiblemente la regresión sustancial o completa de la masa tumoral. La eficacia del tratamiento puede ser controlada, como antes, visualizando cambios en el pH del tejido tratado durante el curso del tratamiento. De esta manera, antes de cada inyección adicional, se puede visualizar el pH del tejido para determinar la extensión existente presente de tumor, después de lo cual se pueden utilizar los cambios en el pH del tejido para controlar la administración de la nueva dosis de composición de ureasa al tejido.

15 Cuando la ureasa se administra parenteralmente mediante un método distinto a la inyección directa, una dosis ejemplar de la ureasa es 100-100.000 unidades internacionales de actividad ureasa/kg de peso corporal del sujeto. Como se indicó en esta memoria, la composición de ureasa de este método incluye preferiblemente un agente de direccionamiento para dirigir la ureasa a las células cancerosas, por ejemplo, al sitio de un tumor sólido, o para secuestrar selectivamente ureasa, por ejemplo, en forma liposómica, en el sitio tumoral.

20 Como antes, se pueden utilizar técnicas de obtención de imágenes que sean sensibles a cambios en el pH tisular, para controlar la eficacia de la dosis administrada. Puesto que dicho direccionamiento puede llevar varias horas o más, el método puede implicar controlar el pH del tumor, como antes, antes de la inyección de ureasa y varias horas después de la administración, por ejemplo, 12-24 horas después, para confirmar que se ha administrado adecuadamente la dosis al sitio tumoral, según se evidencia por una elevación en el pH de la región tumoral. Dependiendo de los resultados de esta investigación, el método puede aconsejar una administración adicional hasta que se observe una elevación deseada del pH, por ejemplo, de 0,2-0,4 unidades de pH. Una vez que se ha establecido esta dosis, el paciente puede ser tratado con una dosis similar de la composición de ureasa sobre una base regular, por ejemplo, una o dos veces a la semana, hasta que se alcance un cambio en el tamaño o el estado del tumor.

25 En ambos tipos de administración, el régimen de dosificación final será determinado por el médico responsable a la vista de una buena práctica médica, considerando diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del agente, la gravedad del estado morbo, la sensibilidad del paciente, la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, y similares. Factores adicionales que se pueden tener en cuenta incluyen el tiempo y la frecuencia de administración, la(s) combinación(es) de fármacos, las sensibilidades de reacción, y la tolerancia/respuesta a la terapia. La refinación adicional de la dosificación apropiada para un tratamiento en que está implicada cualquiera de las formulaciones mencionadas en esta memoria es rutinariamente realizada por el facultativo experto, especialmente a la luz de la información y los ensayos sobre dosificación descritos así como de los datos farmacocinéticos observados en pruebas clínicas. Se pueden averiguar las dosificaciones apropiadas mediante el uso de ensayos establecidos para determinar la concentración del agente en un fluido corporal u otra muestra, junto con datos de respuesta a las dosis.

30 La frecuencia de administración dependerá de los parámetros farmacocinéticos del agente y de la vía de administración. Se ajustan la dosificación y la administración para proporcionar niveles suficientes del agente activo o para mantener el efecto deseado. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una sola dosis, múltiples dosis discretas, infusión continua, depósitos de liberación ininterrumpida, o combinaciones de los mismos, según se requiera para mantener el nivel mínimo deseado del agente.

35 Se pueden administrar composiciones farmacéuticas de corta duración (es decir, de corta semivida) una vez al día o más de una vez al día (por ejemplo, dos, tres o cuatro veces al día). Se podrían administrar composiciones farmacéuticas de larga duración cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas. Para infusión continua se pueden preferir bombas, tales como bombas subcutáneas, intraperitoneales o subdurales.

40 Se pueden preparar composiciones que comprendan un agente activo de la invención, formuladas del modo descrito en la Sección II anterior, en un vehículo farmacéutico aceptable, colocarlas en un recipiente apropiado y etiquetarlas para el tratamiento de un estado indicado. Los estados indicados en la etiqueta pueden incluir, pero no se limitan a, el tratamiento y el diagnóstico de diversos tipos de cáncer. También se contemplan kits, como se describen más adelante, en donde el kit comprende una forma de dosificación de una composición farmacéutica y un prospecto que contiene instrucciones para el uso de la composición en el tratamiento de un estado médico.

45 En general, los agentes activos usados en la invención se administran a un sujeto en una cantidad eficaz. En

general, una cantidad eficaz es una cantidad eficaz en cuanto a (1) reducir los síntomas de la enfermedad que se procura tratar; o (2) inducir un cambio farmacológico relevante para el tratamiento de la enfermedad que se procura tratar. Para el cáncer, una cantidad eficaz puede incluir una cantidad eficaz en cuanto a: reducir el tamaño de un tumor; lentificar el crecimiento de un tumor; prevenir o inhibir metástasis; o aumentar la esperanza de vida del sujeto afectado. Más adelante, en el Ejemplo 6, se describe un método ejemplar para administrar el agente activo a ratones.

Los agentes activos de la presente invención se pueden administrar en dosis únicas o múltiples. Alternativamente, los agentes se pueden infundir intravenosamente a lo largo de un periodo prolongado de tiempo.

En las realizaciones de la invención en que se administran múltiples componentes de direccionamiento, anteriormente descritas, las dosis de cada componente administrado pueden ser determinadas por el médico responsable de acuerdo con su experiencia; los pormenores del estado del sujeto receptor; por ejemplo, la naturaleza y localización del sitio diana, incluyendo los antígenos asociados con él, afectarán a las decisiones sobre la selección del componente de direccionamiento y sobre la vía de administración; y la combinación de componentes de direccionamiento que se va a emplear; por ejemplo, la eficacia del anticuerpo puede variar en relación con la densidad de antígeno y con la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

IV. Método de potenciación de un fármaco anticanceroso

Como se indicó anteriormente, una de las limitaciones de la quimioterapia actual es que el tumor diana se vuelve cada vez más resistente al efecto del compuesto antitumoral. Esta resistencia se puede deber a una incorporación reducida del compuesto a las células tumorales, una reducida disponibilidad del fármaco en el sitio de incorporación, o un metabolismo intracelular aumentado.

Para diversos fármacos débilmente básicos, es decir, fármacos que tienen una o mas aminas protonables, el mecanismo de incorporación del fármaco puede implicar la difusión pasiva a través de la membrana celular en forma no cargada. En consecuencia, la velocidad de movimiento del compuesto a través de la membrana celular dependerá del gradiente de pHs interno/externo. Si el pH extracelular es igual o mayor que el pH intracelular, por ejemplo, un pH de aproximadamente 7,2, el compuesto tenderá a entrar en las células en forma no cargada al menos tan frecuentemente como salga de la célula. Por el contrario, cuando el pH extracelular cae con respecto al pH intracelular, como se produce en tumores sólidos, el menor pH externo favorecerá la forma cargada protonada del compuesto, y esto inhibirá la incorporación del fármaco a las células. En efecto, uno de los efectos del menor pH extracelular en los tumores es proteger al tumor frente a compuestos antitumorales débilmente básicos.

Los compuestos antitumorales débilmente básicos cuya actividad puede resultar negativamente afectada por un menor pH extracelular incluyen doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, epirubicina, mitomicina, bleomicina, alcaloides de *Vinca*, tales como vinblastina y vincristina, agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida e hidrocloreuro de mecloretamina, y derivados antineoplásicos de purina o pirimidina.

En el método presente, se administra ureasa o una composición que contiene ureasa a un tumor sólido en una cantidad eficaz para elevar el pH extracelular del fluido tumoral al menos 0,1 unidades de pH, por ejemplo, de 0,1 a 0,5 unidades de pH o más. En ciertas realizaciones, el pH extracelular del fluido se eleva a al menos 7,0, 7,2 o más.

La ureasa se puede administrar del modo descrito en la Sección III anterior, por ejemplo, directamente en el tumor del sujeto o parenteralmente salvo por inyección directa. Como también se describió anteriormente, el cambio de pH producido por la administración de ureasa puede ser controlado determinando cambios en el pH del tejido tumoral y la extensión de esos cambios, usando herramientas de obtención de imágenes para visualizar el pH del tumor, o mediante mediciones directas del pH del tumor.

La dosis administrada en este método puede ser menor que la necesaria cuando la ureasa es el único agente antitumoral, con tal de que la cantidad inyectada sea suficiente para producir la deseada elevación del pH tumoral. Alternativamente, el método puede implicar la administración de una cantidad terapéutica de ureasa y una cantidad terapéutica o subterapéutica del compuesto antitumoral. Como se puede apreciar, el método puede permitir una dosis menor que la normal del compuesto antitumoral que se va administrar, tanto porque la ureasa potencia el efecto terapéutico del compuesto como porque la propia ureasa está contribuyendo al efecto terapéutico. Resulta una mayor eficacia con menos efectos secundarios.

VI. Kits

También se describen kits para inhibir el crecimiento de células tumorales usando los métodos descritos en esta memoria. Los kits incluyen un recipiente que contiene uno o más agentes activos. Los kits pueden incluir además cualesquiera de los otros componentes descritos en esta memoria para la práctica de los métodos de esta invención. Tales componentes pueden incluir componentes farmacéuticos, componentes de direccionamiento, agentes formadores de imágenes, agentes supresores, componentes para terapia génica, y similares.

Los kits pueden incluir opcionalmente materiales instructivos que contengan directrices (es decir, protocolos) que describan el uso de agentes activos para inhibir el crecimiento de células tumorales. De este modo, el kit puede

incluir una composición farmacéutica que contiene un agente activo, preferiblemente una enzima ureasa, y materiales instructivos que enseñan la administración de la composición a un sujeto, para el tratamiento de un cáncer en el sujeto. El material instructivo enseña cómo administrar la composición de ureasa a un sujeto en una cantidad que depende del tamaño del tumor y está en el intervalo de 0,1 a 100 unidades internacionales de actividad ureasa por mm³ de tumor cuando la composición se administra por inyección directa en el tumor, y en una cantidad en el intervalo de 100-100.000 unidades internacionales de actividad ureasa/kg de peso corporal del sujeto cuando la composición se administra al sujeto parenteralmente salvo por inyección directa en el tumor.

El material instructivo enseña cómo administrar la composición de ureasa a un sujeto que está también recibiendo un compuesto antitumoral débilmente básico cuya eficacia está reducida por un gradiente de pH intracelular mayor/extracelular menor en un tumor sólido, en una cantidad de ureasa eficaz en cuanto a reducir o invertir el gradiente de pH intracelular mayor/extracelular menor en un tumor sólido.

Alternativamente, el material instructivo enseña cómo administrar la composición de ureasa a un sujeto que contiene, o del que se sospecha que contiene, un tumor sólido, bajo unas condiciones eficaces en cuanto a localizar la ureasa en un tumor sólido del sujeto, investigar al sujeto con una herramienta diagnóstica capaz de detectar cambios en el pH extracelular de un tejido del sujeto, e identificar una región tisular del sujeto que muestre una elevación del pH extracelular después de dicha administración.

Aunque los materiales instructivos comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a los mismos. Este invento contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlás a un usuario final. Dichos medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos y chips), medios ópticos (por ejemplo, CD-ROM) y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones a sitios de Internet que proporcionan dichos materiales instructivos.

VII. Terapia génica/celular

Se describe también una composición para terapia génica, para uso en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. La composición para terapia génica incluye un vector de direccionamiento eficaz, cuando se administra al sujeto, en cuanto a transfectar selectivamente células cancerosas, y, transportada en dicho vector, una secuencia de ácido nucleico recombinante eficaz en cuanto a producir una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, mRNA, que codifica el agente activo, preferiblemente ureasa, en células cancerosas transfectadas.

En una realización, las células tumorales se ponen en contacto con células no tumorigénicas modificadas que expresan una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica el agente activo. Las células modificadas no tumorigénicas pueden ser, sin limitación, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, células óseas, queratinocitos, o células no tumorigénicas modificadas e irradiadas procedentes de tumores.

En otra realización, las células tumorales son transfectadas con una construcción génica que codifica un componente de direccionamiento celular y una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica la proteína ureasa y una secuencia líder secretora. La construcción génica es capaz de expresar el componente de direccionamiento celular y la proteína ureasa heteróloga y la secuencia líder secretora como un producto de conjugación dentro de las células tumorales, y, por ello, el producto de conjugación es dirigido por la secuencia líder secretora para que abandone más tarde la célula para su localización selectiva en un antígeno de la superficie celular reconocido por el componente de direccionamiento celular.

Preferiblemente, el componente de direccionamiento celular se localiza selectivamente en un antígeno de la superficie celular, y el antígeno de la superficie celular es específico para al menos un tumor sólido humano. La construcción génica puede comprender una secuencia reguladora de la transcripción que comprenda un promotor y un elemento de control que comprenda un interruptor genético para controlar la expresión de la construcción génica.

De acuerdo con una realización, la construcción génica es empaquetada dentro de un vector vírico. Se dispone de una diversidad de vectores víricos para el direccionamiento a tumores. Los parvovirus son conocidos por infectar selectivamente células tumorales. Alternativamente, se puede diseñar el virus para que se replique selectivamente en células tumorales, de acuerdo con métodos publicados. Véanse, por ejemplo, M. Puhlmann et al., *Hum. Gene Ther.* (1999), 10 (4): 649-57; P. Noguez-Hellin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996), 93 (9): 4175-80; y M. J. Cooper, *Semin. Oncol.* (1996), 23 (1): 172-87. Por ejemplo, se puede alterar el virus para que contenga un gen de timidina cinasa o polimerasa mutado que permita la replicación vírica sólo en células que se dividen rápidamente y contienen estas enzimas. Alternativamente, se puede modificar genéticamente el virus para que contenga elementos de control específicos del tumor, por ejemplo, regiones promotoras específicas del tumor, que sean sensibles y expresen la proteína deseada o una proteína necesaria para la replicación vírica sólo en células tumorales. Preferiblemente, la construcción génica es empaquetada dentro de un adenovirus.

A. Vectores para clonación, transferencia génica y expresión

Se describen además vectores de expresión que se emplean para que se exprese el producto polipeptídico de ureasa, el cual puede ser luego purificado. En otras realizaciones, los vectores de expresión se utilizan en terapia

génica. Los vectores de expresión pueden incluir apropiadas señales que se proporcionan en el vector, y diversos elementos reguladores, tales como potenciadores/promotores procedentes de fuentes víricas y/o de mamífero que conducen la expresión de los genes de interés en células huésped. También se definen elementos diseñados para optimizar la estabilidad y traducibilidad del RNA mensajero en células huésped. También se proporcionan las condiciones para el uso de un número de marcadores dominantes para selección por fármacos, para establecer clones celulares estables y permanentes que expresen los productos, al igual que un elemento que enlaza la expresión de los marcadores para selección por fármacos con la expresión del polipéptido.

B. Elementos reguladores

Con la frase "construcción de expresión" se quiere incluir cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica un producto génico, en que parte de, o toda, la secuencia de codificación de ácido nucleico puede ser transcrita. El transcrito se puede traducir en una proteína, aunque no es necesario. En ciertas realizaciones, la expresión incluye tanto la transcripción de un gen como la traducción del mRNA en un producto génico. En otras realizaciones, la expresión sólo incluye la transcripción del ácido nucleico que codifica un gen de interés.

En realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica un producto génico está bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de DNA reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o por maquinaria sintética introducida, necesaria para que se inicie la transcripción específica de un gen. La frase "bajo el control transcripcional" significa que el promotor está en la posición y la orientación correctas en relación con el ácido nucleico, para controlar la iniciación de la RNA polimerasa y la expresión del gen.

El término "promotor" se utilizará en esta memoria para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que están agrupados alrededor del sitio de iniciación para la RNA polimerasa II. Los promotores pueden estar compuestos de módulos funcionales discretos, consistiendo cada uno en aproximadamente 7-20 pares de bases de DNA, y conteniendo cada uno uno o más sitios de reconocimiento para proteínas activadoras o represoras de la transcripción. Al menos un módulo de cada promotor actúa para situar el sitio de inicio para la síntesis de RNA. Un módulo ejemplar es la caja TATA pero, en ciertos promotores que carecen de una caja TATA, tales como el promotor para el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que rodea el propio sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de la iniciación.

No se cree que el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés sea importante con tal de que sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula diana. De este modo, cuando la diana es una célula humana, es preferible situar la región de codificación de ácido nucleico adyacente a, y bajo el control de, un promotor que sea capaz de expresarse en una célula humana. En general, dicho promotor puede incluir un promotor humano o vírico.

En diversas realizaciones, se pueden usar el promotor del gen precoz inmediato del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor precoz de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el promotor de insulina de rata y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, para obtener un alto nivel de expresión de la secuencia de codificación de interés. También se contempla el uso de otros promotores de fagos víricos o bacterianos o de células de mamífero, que son bien conocidos en la técnica para alcanzar la expresión de una secuencia de codificación de interés.

Cuando se emplea un inserto de cDNA, se puede desear incluir una señal de poliadenilación para efectuar la apropiada poliadenilación del transcrito génico. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de la invención y se puede emplear cualquiera de dichas secuencias, tales como las señales de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana y del SV40. También se contempla un terminador como un elemento del casete de expresión. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura a través del casete en otras secuencias.

C. Marcadores seleccionables

Las células que contienen construcciones de ácido nucleico de la presente invención pueden ser identificadas *in vitro* o *in vivo* al incluir un marcador en la construcción de expresión. Dichos marcadores confieren a la célula un cambio identificable que permite una identificación sencilla de las células que contienen la construcción de expresión. Típicamente, la inclusión de un marcador para selección por fármacos ayuda a la clonación y a la selección de los transformantes. Son marcadores seleccionables útiles, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a la neomicina, puomicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol. Alternativamente, también se pueden emplear enzimas tales como la cloranfenicol acetiltransferasa y la timidina cinasa (tk; del inglés, thymidine kinase) del virus herpes simplex. Otros ejemplos de marcadores seleccionables son bien conocidos por quien tiene experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, R. P. Baumann et al. (2002), *Biotechniques* 32 (5): 1030-34.

D. Suministro de vectores de expresión

Hay diversos modos mediante los cuales se pueden introducir vectores de expresión en células. En ciertas realizaciones, la construcción de expresión comprende un virus o una construcción modificada procedente de un

genoma vírico, que se utiliza para suministrar una composición de ureasa a una célula diana. La capacidad de ciertos virus para entrar en células por medio de endocitosis mediada por receptor, integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar estable y eficazmente genes víricos les han convertido en candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños a células de mamífero.

5 Uno de los métodos preferidos para el suministro *in vivo* implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Mediante "vector de expresión de adenovirus" se quiere incluir aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) sustentar el empaquetamiento de la construcción y (b) expresar un polinucleótido que haya sido clonado en ellas. En este contexto, la expresión no requiere que se sintetice el producto génico. Véase, por ejemplo, B. G. Barnett et al. (2002), "Targeted Adenovirus Vectors", *Biochim. Biophys. Acta* 1575 (1-3): 1-14.

10 En una realización, el vector de expresión puede comprender una forma de adenovirus genéticamente modificada. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de DNA de doble cadena, lineal y de 36 kb, permite la sustitución de grandes trozos de DNA adenovírico por secuencias extrañas de hasta 7 kb. A diferencia del retrovirus, la infección adenovírica de células huésped no da lugar a integración cromosómica porque el DNA adenovírico se puede replicar de modo episomal sin genotoxicidad potencial. Además, los adenovirus son
15 estructuralmente estables y no se ha detectado reordenamiento genómico después de una extensa multiplicación.

El adenovirus es particularmente adecuado para uso como un vector de transferencia génica a causa de su genoma de tamaño medio, su facilidad de manipulación, su título elevado, su amplia variedad de células diana y su elevada infectividad. La generación y propagación de vectores adenovíricos puede depender de una línea celular auxiliar. Las líneas celulares auxiliares pueden proceder de células humanas, tales como células renales, células musculares
20 o células hematopoyéticas embrionarias humanas, u otras células mesenquimáticas o epiteliales embrionarias humanas. Alternativamente, las células auxiliares pueden proceder de las células de otras especies de mamífero que sean permisivas en cuanto al adenovirus humano. Dichas células incluyen, por ejemplo, células Vero y otras células mesenquimáticas o epiteliales embrionarias de mono. Una línea celular auxiliar ejemplar es la línea celular 293, que fue transformada a partir de células renales embrionarias humanas mediante fragmentos de DNA de Ad5 y
25 expresa constitutivamente proteínas E1. Se han descrito métodos para cultivar células 293 y propagar adenovirus.

Se pueden emplear vectores víricos adicionales como construcciones de expresión en la presente invención. Se pueden emplear vectores derivados de virus tales como vacciniavirus [W. Walther y U. Stein (2000), *Drugs* 60 (2): 249-71], virus adenoasociado [N. Zhao et al. (2001), *Mol. Biotechnol.* 19 (3): 229-37] y herpesvirus [E. A. Burton et al. (2001), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2): 155-70]. L. K. Hawkins et al. (2002), *Lancet Oncol.* 3 (1): 17-26, han revisado
30 virus adicionales específicos de tumores y selectivos en cuanto a la replicación que se pueden utilizar.

También se contemplan diversos métodos no víricos para la transferencia de construcciones de expresión a células de mamífero en cultivo. Estos incluyen precipitación con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección directa, complejos de lipofectamina-DNA y liposomas cargados de DNA, sonicación celular, bombardeo génico usando microproyectiles de alta velocidad, y transfección mediada por receptores.

35 Una vez que se ha suministrado la construcción de expresión a la célula, el ácido nucleico que codifica el gen de interés, por ejemplo, el gen de ureasa, se puede situar y expresar en diferentes sitios. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el agente activo se puede integrar establemente en el genoma de la célula. Esta integración puede ser en la posición y la orientación correspondientes, por medio de recombinación homóloga (sustitución génica), o puede ser en una posición aleatoria e inespecífica (aumento génico). En aún otras
40 realizaciones, el ácido nucleico se puede mantener establemente en la célula como un segmento separado y episomal de DNA. Dichos segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir un mantenimiento y una replicación independientes de, o en sincronización con, el ciclo de la célula huésped. El método de suministro de la construcción de expresión y la posición en la célula donde permanece el ácido nucleico dependen del tipo de construcción de expresión empleada.

45 En aún otra realización, la construcción de expresión puede consistir simplemente en DNA recombinante desnudo o plásmidos. La transferencia de la construcción se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos anteriormente mencionados que permeabilizan física o químicamente la membrana celular. Esto es particularmente aplicable a la transferencia *in vitro* pero también se puede aplicar al uso *in vivo*.

En aún otra realización, la transferencia de una construcción de expresión de DNA desnudo a células puede implicar
50 un bombardeo con partículas. Este método depende de la capacidad para acelerar microproyectiles revestidos con DNA a una velocidad elevada para permitirles perforar las membranas celulares y entrar en las células sin matarlas. Diversos dispositivos para acelerar partículas pequeñas son útiles a este respecto. Uno de dichos dispositivos se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica que, a su vez, proporciona la fuerza motriz. Los microproyectiles usados pueden consistir en sustancias biológicamente inertes tales como glóbulos de wolframio
55 u oro.

En una realización, dichas construcciones de expresión pueden ser encerradas en un liposoma, un complejo lipídico, una nanocápsula u otra formulación usando uno o más de los métodos anteriormente descritos en la Sección II. También se contemplan complejos de lipofectamina-DNA.

En ciertas realizaciones, el liposoma puede ser complejoado con un virus hemaglutinante (HVJ). En otras realizaciones, el liposoma puede ser complejoado o empleado junto con proteínas nucleares cromosómicas no histónicas (HMG-1). En aún otras realizaciones, el liposoma puede ser complejoado o empleado junto con ambos, HVJ y HMG-1.

- 5 Otras construcciones de expresión que se pueden emplear para suministrar a células un ácido nucleico que codifica un gen particular son los vehículos para suministro mediado por receptor. Estos se aprovechan de la incorporación selectiva de macromoléculas a casi todas las células eucarióticas mediante endocitosis mediada por receptor. A causa de la distribución específica del tipo celular de los diferentes receptores, el suministro puede ser muy específico.
- 10 Los vehículos para direccionamiento génico mediado por receptor consisten generalmente en dos componentes: un ligando específico del receptor celular y un agente ligante de DNA. Para la transferencia génica mediada por receptor se han utilizado diversos ligandos, por ejemplo, asialo-orosomucoide y transferrina. Además, también se ha utilizado el factor de crecimiento epidérmico (EGF; del inglés, *epidermal growth factor*) para suministrar genes a células escamosas de carcinoma (Publicación nº EP 0360257 de Solicitud de Patente Europea).
- 15 En otras realizaciones, el vehículo de suministro puede comprender un ligando y un liposoma. De esta manera, es factible que un ácido nucleico que codifica un gen particular pueda ser también específicamente suministrado a un tipo celular tal como células pulmonares, epiteliales o tumorales, mediante diversos sistemas de receptor-ligando con o sin liposomas. Por ejemplo, se pueden usar EGF u otras moléculas pequeñas como receptor para el suministro mediado de un ácido nucleico que codifica un gen a muchas células tumorales que presentan
- 20 suprarregulación del receptor de EGF [J. Basela (2002), *J. Clin. Oncol.* 20 (9): 2217-9]. Además, se pueden usar similarmente anticuerpos hacia CD5 (CLL), CD22 (linfoma), CD25 (leucemia de células T) y MAA (melanoma) como componentes de direccionamiento.

En ciertas realizaciones, la transferencia génica se puede llevar más fácilmente a cabo bajo condiciones *ex vivo*. La terapia génica *ex vivo* se refiere al aislamiento de células de un animal, el suministro de un ácido nucleico a las

25 células *in vitro*, y la vuelta luego de las células modificadas a un animal. Esto puede implicar la extracción quirúrgica de tejidos/órganos de un animal o el cultivo primario de células y tejidos. Véanse, por ejemplo, M. Ahonen et al. (2002), *Mol. Ther.* 5 (6): 705-15; K. Kawai et al. (2000), *Mol. Urol.* 4 (2): 43-6; y las Patentes de EE.UU. números 6.395.712, 6.149.904 y 6.410.029.

Se pueden preparar cultivos primarios de células de mamífero de diversas maneras. Con objeto de que las células se mantengan viables mientras están *in vitro* y en contacto con la construcción de expresión, las células se mantendrán típicamente en contacto con oxígeno y dióxido de carbono y nutrientes en la relación correcta y se protegerán de la contaminación microbiana. Las técnicas para cultivo celular son bien conocidas por quienes tienen experiencia en este campo técnico.

30

Las células Vero y HeLa y líneas celulares de ovario de hámster chino, y las células W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, NIH3T3, RIN y MDCK, son ejemplos de líneas celulares de huésped mamífero útiles. Además, se puede escoger una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto génico de la manera deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Células huésped diferentes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación

40 postraduccionales de proteínas. Se pueden escoger líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada.

Se pueden usar diversos sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, los genes de timidina cinasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa de HSV, en células tk-, hgprt- y apt-, respectivamente. Además, se puede usar la resistencia a antimetabolitos como base de selección para gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G418; e hygromycin, que confiere resistencia a la higromicina.

45

A partir de lo precedente, se puede ver cómo se satisfacen diversos objetos y características de la invención.

Tabla 2

Secuencias proporcionadas en apoyo de la invención

Descripción	ID. SEC. nº
Bucle E: Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys	1
Bucle K: Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu	2
Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Cys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys	3
Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Cys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys	4
Bucle K: KVSALKE	5
Bucle E: EVSALEK	6
Ureasa de <i>Canavalia ensiformis</i> MKLSPREVEKLGLHNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGE KTVAQLMCLGQHLLGRRQVLPVPHLLNAVQVEATFPDGTKLTVHDPISR ENGELQEALFGSLLPVPSLDKFAETKEDNRIPGEILCEDECLTLNIGRKAVILK VTSKGDRPIQVGSHYHFIEVNPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDC KSVTLVSIENKQVIRGGNAIADGPVNETNLEAMHAVRSKGFGEHEEKDAS EGFTKEDPNPCFNTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGDTNLLAEIEKDIALYG DECVFGGGKVIRDMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIIDYTGIIKADIGIKDGLIA SIGKAGNPDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYEA ISSGITTTLVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMRLMLQSTDDLPLNFGFTGKG SSSKPDELHEIKAGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTDTLN EAGFVEHSIAAFKGRTHYHSEAGAGGGHAPDIKVCIGIKNVLPSSSTNPTRPL TSNTIDEHLDMMLMVCHHLDREIPEDLAFHRSRIRKKTIAAEDVLNDIGAISS DSQAMGRVGEVISRTWQTADKMKAQTGPLKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTIN PAIANGFSQYVGSVEVGKLADLVMWKPSFFGTPKPEMVIKGGMVAWADIGD PNASIPTPEPVKMRPMYGTLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLYGLNKRV EAVSNVRKLTKLDMKLNDALPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVPLSRN YFLF	7

IV. Ejemplos

- 5 Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención descrita en esta memoria y no están destinados a limitar en modo alguno el alcance de la invención.

A. Ejemplo 1A1. Síntesis peptídica

Se prepararon los péptidos mediante una metodología de síntesis en fase sólida usando la química convencional del N-t-butiloxycarbonilo (t-Boc). Los péptidos fueron escindidos de la resina por reacción con fluoruro de hidrógeno (20 ml/g de resina) que contenía anisol al 10% y 1,2-etanoditiol al 2%, durante 1,5 horas a 4 °C. Los péptidos crudos fueron lavados con éter frío, y fueron extraídos de la resina con ácido acético glacial y liofilizados. El péptido sintético fue purificado mediante HPLC de fase inversa en una columna C-8 semipreparativa Zorbax (250 x 10 mm de diámetro interno, partículas de 6,5 µm de tamaño, poros de 30 nm de tamaño), con un gradiente AB lineal (que variaba de 0,2 a 1,0% de B/min) a un caudal de 2 ml/min, donde el disolvente A es ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,05% y el disolvente B es TFA al 0,05% en acetonitrilo. La homogeneidad de los péptidos purificados fue verificada mediante HPLC analítica de fase inversa, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas MALDI.

A2. Purificación de la ureasa por afinidad

Se preparó la columna de afinidad al hacer reaccionar hidroxurea con Sepharose 6B activada con epóxido (Amersham Biosciences). Los restantes grupos activos fueron bloqueados usando etanolamina 1 M.

La purificación se llevó a cabo del modo siguiente. Se equilibró la columna con PEB (fosfato 0,02 M, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, pH de 7,0). Se aplicó (Figura 2) una muestra de ureasa cruda (0,5 mg/ml en PEB; 8 ml en total). Se lavó la columna con 15 ml de PB (fosfato 0,02 M, β-mercaptoetanol 1 mM, pH de 7,0). Luego se lavó la columna con 8 ml de cada una de las mezclas siguientes: PB + NaCl 0,1 M, PB + NaCl 0,5 M, y PB + NaCl 0,95 M. Se eluyó la ureasa con 8 ml de EB (fosfato 0,2 M, β-mercaptoetanol 1 mM, pH de 4,6), recogiendo fracciones de 1 ml. Se examinaron las fracciones mediante lectura de la DO a 280 nm (Figura 3) y análisis por HPLC (columna C5). La columna se guardó en NaN₃ al 0,01%.

B. Ejemplo 2 -- Preparación del producto de conjugación de ureasa-bucle

Se preparó el producto de conjugación de ureasa y bucle disolviendo 10 mg de ureasa de *Canavalia ensiformis* en 300 µl de tampón de fosfato 2 mM, pH de 7,2. Luego se añadieron 5 mg del agente entrecruzante bifuncional Sulfo-MBS a la disolución y se agitó lentamente la mezcla durante una hora a temperatura ambiental. Luego se sometió la mezcla a diálisis frente a tampón de fosfato 2 mM en un pH de 7,2 para eliminar el conector en exceso.

Se añadió bucle K o bucle E con un conector de cys C-terminal (1,5 mg) a la disolución de ureasa modificada con conector y se mezcló lentamente durante 3 horas a temperatura ambiental. El producto de conjugación de bucle y ureasa fue sometido a diálisis frente a tampón fresco de fosfato 2 mM, en un pH de 7,2, durante la noche para eliminar el péptido de bucle no conjugado. El producto de conjugación de ureasa sometido a diálisis fue liofilizado, disuelto luego en 1 ml de tampón de fosfato 2 mM, pH de 7,2, y aplicado a una columna de Sephadex G75 para una purificación ulterior. Las fracciones del volumen muerto, que contenían el producto de conjugación de bucle y ureasa, fueron reunidas, liofilizadas y guardadas a 4 °C.

Se determinaron la pureza del producto de conjugación y la relación de bucle a ureasa en la preparación mediante análisis de aminoácidos y espectrometría de masas MALDI usando procedimientos estándares.

C. Ejemplo 3 -- Ensayo de actividad de la ureasa y del producto de conjugación de ureasa

Se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática de la ureasa o del producto de conjugación de ureasa en una reacción con enzima acoplada, con glutamato deshidrogenasa (GLDH). Se determinó la cantidad de NADH oxidado midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm (H. Kaltwasser y H. G. Schlegel, *Anal. Biochem.* 16, 132, 1966). Los reactivos utilizados fueron: tampón de fosfato potásico 0,10 M, pH de 7,6; urea 1,80 M preparada en tampón de fosfato; adenosina-5'-difosfato (ADP) 0,025 M (10,7 mg/ml) en tampón; NADH 0,008 M (5 mg/ml) en tampón de fosfato; α-cetoglutarato 0,025 M (3,7 mg/ml) en tampón de fosfato; disolución de glutamato deshidrogenasa (GLDH), exenta de iones amonio, 50 U/ml en tampón de fosfato, recién preparada antes del ensayo. La disolución de ureasa se preparó por disolución en tampón de fosfato para obtener una concentración de 0,1-0,5 U/ml. Esta disolución se preparó justo antes del ensayo.

Se inició el ensayo al añadir a 2,0 ml de tampón de fosfato, 2,40 ml, en una cubeta, 0,10 ml de cada uno de los compuestos siguientes: urea, ADP, NADH, GLDH y α-cetoglutarato. Se ajustó la longitud de onda del espectrofotómetro a 340 nm y la temperatura a 25°. Se colocó la cubeta con los ingredientes añadidos en el espectrofotómetro a 25 °C durante 5 minutos para que se alcanzara el equilibrio térmico y luego se estableció la velocidad del blanco, si la hubiera, a 340 nm.

Para iniciar la reacción enzimática, se añadieron 0,1 ml de la disolución de ureasa a la cubeta. Se registraron durante 15 minutos los cambios de absorbancia a 340 nm. La actividad enzimática se correlacionó con la disminución de absorbancia a 340 nm por minuto.

D. Ejemplo 4 -- Preparación del producto de conjugación de bucle y anticuerpo

Los materiales incluyen: (1) IgG2a anti-hEGFR de rata (Serotec), 200 µg/0,2 ml (es decir, 1 mg/ml); (2) bucle E (N-conector); (3) m-peryodato sódico (Pierce); y (4) agente entrecruzante bifuncional, KMHU (Pierce).

Se llevó a cabo la modificación funcional del bucle E realizando las operaciones siguientes:

- 5 a. Disolver el KMHU en DMSO para preparar una disolución de 10 mg/ml (2,5 mg en 250 µl de DMSO).
- b. Disolver el bucle E en PB (~ 2 mg en 392 µl de PB 10 mM, pH de 7,4, + 4 µl de TCEP; disolución madre 100 mM).
- c. Añadir 1 µl de Tris (2 M) para neutralizar la disolución de bucle E.
- 10 d. Añadir la disolución de bucle E a la disolución de KMHU e incubar a temperatura ambiental durante 2 horas.
- e. Mantener la disolución a 4 °C durante la noche.
- f. A la mañana siguiente, centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos para separar el precipitado insoluble.
- g. Separar el KMHU y el DMSO en una columna C8 para HPLC (acetonitrilo al 0-20%/H₂O con TFA al 0,05%) y recoger todas las fracciones peptídicas (acetonitrilo al 75%).
- 15 h. Liofilizar las fracciones peptídicas y verificar por espectrometría de masas.

Se oxidó el anticuerpo mediante las operaciones siguientes:

- a. Para cada 2 mg de anticuerpo, pesar 20 mg de peryodato en un vial de color ambarino.
- b. Añadir 2 ml de PBS, pH de 7,2, y 2 ml de disolución madre de anticuerpo al vial (la concentración final de anticuerpo es 0,5 mg/ml) y revolver suavemente hasta que se disuelva el polvo de peryodato.
- 20 c. Incubar a temperatura ambiental durante 30 minutos.
- d. Separar el peryodato mediante 3 diálisis frente a tampón de acetato 100 mM, pH de 5,5.

Se llevó la conjugación a cabo mediante las operaciones siguientes:

- a. Concentrar el anticuerpo oxidado (~ 2 mg en 4 ml) usando unidades filtrantes Millipore Ultrafree (corte de pesos moleculares de 30.000).
- 25 b. Añadir 75 µl de la disolución de bucle E funcionalizado (4 µg/µl de H₂O bidestilado) a la mitad de la disolución de anticuerpo oxidado (que contiene ~ 0,75 mg de anticuerpo en tampón de acetato, pH de 5,5).
- c. Incubar a temperatura ambiental durante 2 horas con sacudimiento.
- d. Purificar la mezcla de anticuerpo usando una columna de proteína G (véase la Figura 4).
- e. Comparar y analizar la muestra (antes y después de la purificación por afinidad).

30 E. Ejemplo 5 -- Análisis Biacore del producto de conjugación de bucle y ureasa y del producto de conjugación de bucle y anticuerpo

Se copuló covalentemente el péptido de bucle E o el péptido de bucle K que contiene cisteína con el chip biosensor Pioneer B1 de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. En resumen, se activó primero la superficie de dextrano del chip sensor con NHS/EDC (15 µl), lo que fue seguido de la adición de PDEA (20 µl). Se inyectó el bucle K o el bucle E (50 µg/ml) en tampón de acetato sódico 10 mM, pH de 4,3, y se dejó que reaccionara para obtener una densidad superficial de aproximadamente 200-400 unidades de respuesta (UR). Luego se bloquearon los grupos activados restantes mediante la inyección (10 µl) de una disolución de desactivación de cisteína 50 mM, NaCl 1 M, formiato 0,1 M, pH de 4,3.

Se llevaron a cabo experimentos cinéticos en un instrumento BIAcore3000 a 25 °C. Cada serie del biosensor consistía en (1) una fase de inyección de muestra de 600 s (bucle-ureasa o bucle-anticuerpo), (2) una fase de disociación de 600 s y (3) una fase de regeneración (guanidina·HCl 6 M) de 2 x 15 s. Se mantuvo un caudal de 5 µl/min a lo largo de todo el ciclo. Se utilizó PBS como tampón. La señal de SPR fue registrada en tiempo real con muestreo cada 0,5 s y fue representada gráficamente como UR frente al tiempo (sensorgrama). Cada sensorgrama obtenido fue corregido en cuanto a cambios en el índice de refracción masivo restando el correspondiente ciclo de inyección de muestra sobre una superficie celular vacía.

F. Ejemplo 6 -- Estudios en animales

Para el ensayo se usaron hembras de ratón atímico nu/nu con xenoinjertos de adenocarcinoma de glándula mamaria humano. Los animales seleccionados tenían generalmente de 5 a 7 semanas de edad, y sus pesos corporales al comienzo del tratamiento variaban de aproximadamente 15 a 28 gramos.

- 5 Se usaron células MCF para generar los xenoinjertos. Se cultivaron las células en medios MEM complementados con 5000 U/ml de penicilina/estreptomicina, L-glutamina 200 mM, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, vitaminas y FBS al 10%. Se mantuvo la incubadora celular con CO₂ al 5%, 37,5 °C y 80% de humedad. Se recolectaron las células con una disolución de tripsina al 0,25% (peso/volumen)-EDTA al 0,03% (peso/volumen). Se inyectaron subcutáneamente alrededor de 1×10^6 células en 100 µl, en la ijada derecha de cada ratón.
- 10 Se dejó que continuara el crecimiento tumoral durante aproximadamente 6-8 días, permitiendo que el tamaño del tumor alcanzara al menos 2 - 4 mm de diámetro. Las dosis se administraron mediante inyección intratumoral. El volumen de las dosis fue 50 µl para cada animal. Se inyectó la dosis dada de producto de ensayo en "modo abanico" a cada tumor sólido. Se obtuvieron los volúmenes tumorales mediante mediciones externas con un calibre. Se obtuvieron los pesos corporales al inicio de la prueba y en el momento del sacrificio.
- 15 Los resultados, como se muestra a continuación en la Tabla 3, muestran que los tumores no fueron perceptibles 24 horas después del tratamiento.

Tabla 3Tratamiento exitoso de tumores en ratones

Ratón	1	2	3	4	5	6
Células MCF inyectadas	$0,8 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$
Tamaño tumoral antes del tratamiento	22,5 mm ³	33,5 mm ³	15,6 mm ³	31,1 mm ³	32,5 mm ³	8,2 mm ³
Cantidad de ureasa inyectada	50 U/50 µl	50 U/50 µl	50 U/50 µl	50 U/50 µl	40 U/50 µl	10 U/50 µl
Tamaño tumoral después de la inyección (24 horas)	Imperceptible	Imperceptible	Imperceptible	Imperceptible	Imperceptible	Imperceptible

Lista de secuencias

<110> Helix Biopharma Corp.

5 <120> Método y composición para inhibir el crecimiento de células cancerosas

<130> 08-898277WO

<140> n/a

10 <141> 2003-07-16

<150> US 60/397.244

<151> 2002-07-18

<160> 7

15 <170> FastSEQ para Windows, versión 4.0

<210> 1

20 <211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido que forma bucle E

<400> 1

Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val
1				5				10					15		
Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Ala
			20				25					30			
Leu	Glu	Lys													
		35													

<210> 2

30 <211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Péptido que forma bucle K

<400> 2

Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
1				5				10					15		
Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala
			20				25					30			
Leu	Lys	Glu													
		35													

<210> 3

40 <211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Péptido que forma bucle

<400> 3

ES 2 443 416 T3

Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ser Ala Leu Glu Cys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys
35

<210> 4
<211> 35
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido que forma bucle

10 <400> 4
Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15
Ser Ala Leu Lys Cys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Glu Ala
20 25 30
Leu Lys Lys
35

15 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Péptido que forma bucle K

<400> 5
Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu
1 5

25 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido que forma bucle E

<400> 6
Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys
1 5

35 <210> 7
<211> 840
<212> PRT
<213> *Canavalia ensiformis*

40 <400> 7

ES 2 443 416 T3

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

ES 2 443 416 T3

				85					90					95		
His	Asp	Pro	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Gly	Glu	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Phe	
			100					105					110			
Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Val	Pro	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Ala	Glu	Thr	Lys	
		115					120					125				
Glu	Asp	Asn	Arg	Ile	Pro	Gly	Glu	Ile	Leu	Cys	Glu	Asp	Glu	Cys	Leu	
		130				135					140					
Thr	Leu	Asn	Ile	Gly	Arg	Lys	Ala	Val	Ile	Leu	Lys	Val	Thr	Ser	Lys	
145					150					155					160	
Gly	Asp	Arg	Pro	Ile	Gln	Val	Gly	Ser	His	Tyr	His	Phe	Ile	Glu	Val	
				165					170					175		
Asn	Pro	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Arg	Arg	Lys	Ala	Tyr	Gly	Met	Arg	Leu	
			180					185					190			
Asn	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Arg	Phe	Glu	Pro	Gly	Asp	Cys	Lys	
		195					200					205				
Ser	Val	Thr	Leu	Val	Ser	Ile	Glu	Gly	Asn	Lys	Val	Ile	Arg	Gly	Gly	
		210				215					220					
Asn	Ala	Ile	Ala	Asp	Gly	Pro	Val	Asn	Glu	Thr	Asn	Leu	Glu	Ala	Ala	
225					230					235					240	
Met	His	Ala	Val	Arg	Ser	Lys	Gly	Phe	Gly	His	Glu	Glu	Glu	Lys	Asp	
				245					250					255		
Ala	Ser	Glu	Gly	Phe	Thr	Lys	Glu	Asp	Pro	Asn	Cys	Pro	Phe	Asn	Thr	
			260					265					270			
Phe	Ile	His	Arg	Lys	Glu	Tyr	Ala	Asn	Lys	Tyr	Gly	Pro	Thr	Thr	Gly	
		275					280					285				
Asp	Lys	Ile	Arg	Leu	Gly	Asp	Thr	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ile	Glu	Lys	
		290				295					300					
Asp	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Gly	Asp	Glu	Cys	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	
305					310					315					320	
Ile	Arg	Asp	Gly	Met	Gly	Gln	Ser	Cys	Gly	His	Pro	Pro	Ala	Ile	Ser	
				325					330					335		
Leu	Asp	Thr	Val	Ile	Thr	Asn	Ala	Val	Ile	Ile	Asp	Tyr	Thr	Gly	Ile	
			340					345					350			
Ile	Lys	Ala	Asp	Ile	Gly	Ile	Lys	Asp	Gly	Leu	Ile	Ala	Ser	Ile	Gly	
		355					360					365				
Lys	Ala	Gly	Asn	Pro	Asp	Ile	Met	Asn	Gly	Val	Phe	Ser	Asn	Met	Ile	
		370				375					380					
Ile	Gly	Ala	Asn	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Gly	Glu	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	
385					390					395					400	
Ala	Gly	Ala	Ile	Asp	Cys	His	Val	His	Tyr	Ile	Cys	Pro	Gln	Leu	Val	
				405					410					415		
Tyr	Glu	Ala	Ile	Ser	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Leu	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	
			420					425								

ES 2 443 416 T3

			580				585				590				
His	His	Leu	Asp	Arg	Glu	Ile	Pro	Glu	Asp	Leu	Ala	Phe	Ala	His	Ser
		595					600					605			
Arg	Ile	Arg	Lys	Lys	Thr	Ile	Ala	Ala	Glu	Asp	Val	Leu	Asn	Asp	Ile
	610					615					620				
Gly	Ala	Ile	Ser	Ile	Ile	Ser	Ser	Asp	Ser	Gln	Ala	Met	Gly	Arg	Val
625					630					635					640
Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Arg	Thr	Trp	Gln	Thr	Ala	Asp	Lys	Met	Lys	Ala
				645					650						655
Gln	Thr	Gly	Pro	Leu	Lys	Cys	Asp	Ser	Ser	Asp	Asn	Asp	Asn	Phe	Arg
			660					665							670
Ile	Arg	Arg	Tyr	Ile	Ala	Lys	Tyr	Thr	Ile	Asn	Pro	Ala	Ile	Ala	Asn
			675				680					685			
Gly	Phe	Ser	Gln	Tyr	Val	Gly	Ser	Val	Glu	Val	Gly	Lys	Leu	Ala	Asp
	690					695					700				
Leu	Val	Met	Trp	Lys	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Thr	Lys	Pro	Glu	Met	Val
705					710					715					720
Ile	Lys	Gly	Gly	Met	Val	Ala	Trp	Ala	Asp	Ile	Gly	Asp	Pro	Asn	Ala
				725					730						735
Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Val	Lys	Met	Arg	Pro	Met	Tyr	Gly	Thr
			740					745							750
Leu	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	Ile	Ala	Phe	Val	Ser	Lys	Ala
		755					760					765			
Ala	Leu	Asp	Gln	Arg	Val	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Leu	Asn	Lys	Arg	Val
	770					775					780				
Glu	Ala	Val	Ser	Asn	Val	Arg	Lys	Leu	Thr	Lys	Leu	Asp	Met	Lys	Leu
785					790					795					800
Asn	Asp	Ala	Leu	Pro	Glu	Ile	Thr	Val	Asp	Pro	Glu	Ser	Tyr	Thr	Val
				805					810						815
Lys	Ala	Asp	Gly	Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ala	Thr	Thr	Val	Pro
			820					825							
Leu	Ser	Arg	Asn	Tyr	Phe	Leu	Phe								
		835					840								

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende
una enzima ureasa;
5 un componente de direccionamiento conjugado con dicha ureasa, en donde dicho componente de direccionamiento es un anticuerpo anti-antígeno tumoral o un fragmento del mismo, componente de direccionamiento que es eficaz en cuanto a potenciar el suministro de la enzima a las células de un tumor sólido, cuando la composición se administra a un sujeto; y
un vehículo farmacéutico.
- 10 2. La composición para uso según la reivindicación 1, que comprende una proteína de fusión del componente de direccionamiento y la enzima ureasa.
3. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde dicho producto de conjugación comprende además un conector que conjuga dicha enzima ureasa con dicho componente de direccionamiento.
4. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde dicha ureasa es una ureasa vegetal o bacteriana.

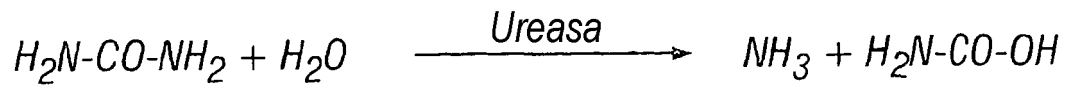


FIG. 1A



FIG. 1B

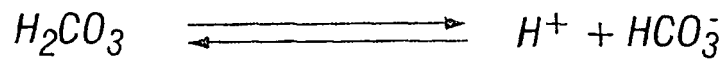


FIG. 1C

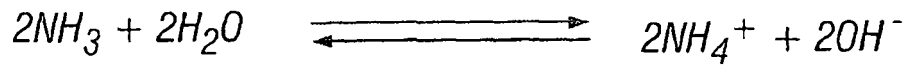


FIG. 1D

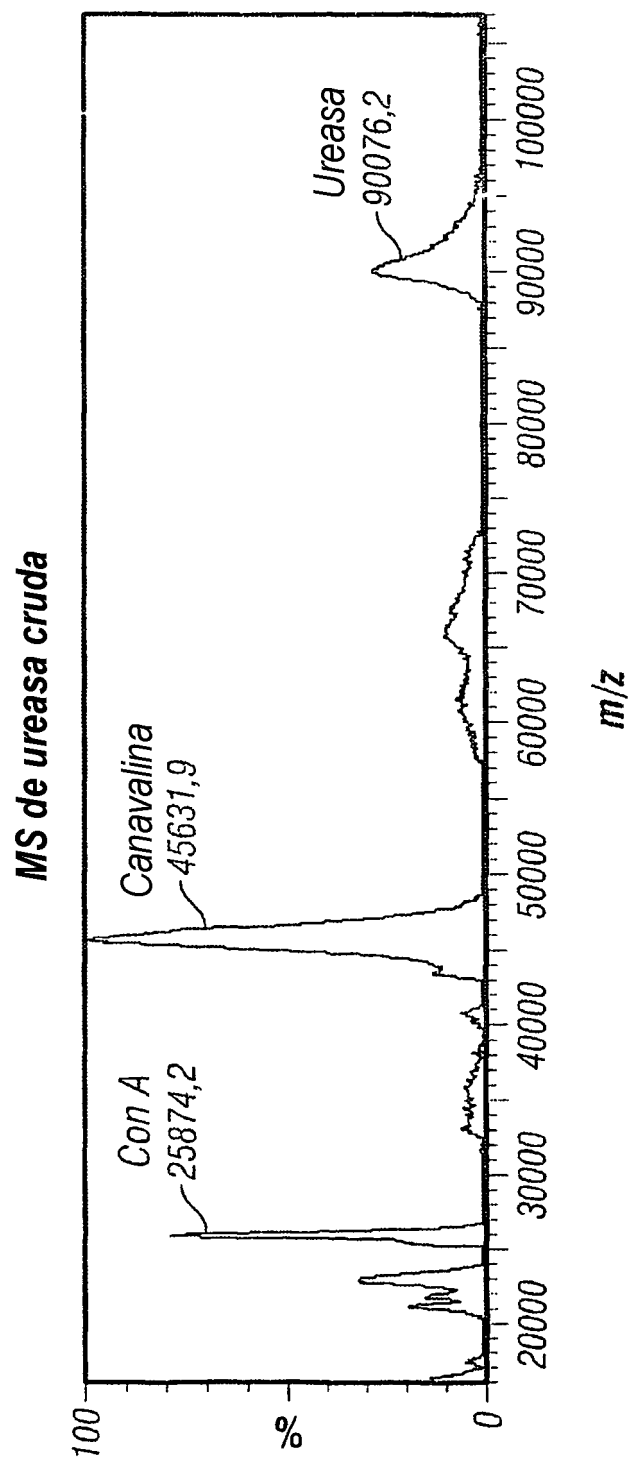


FIG. 2

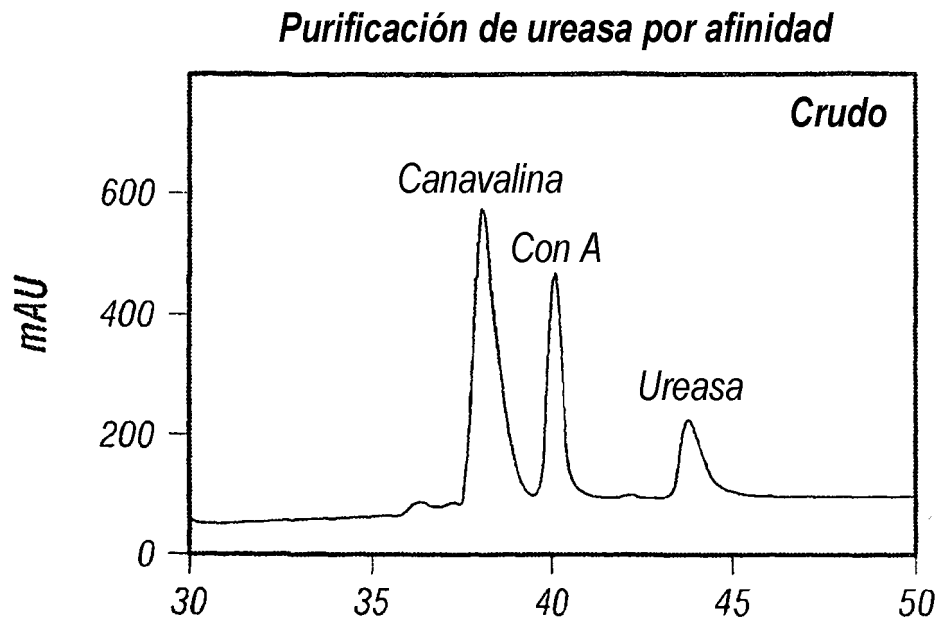


FIG. 3A

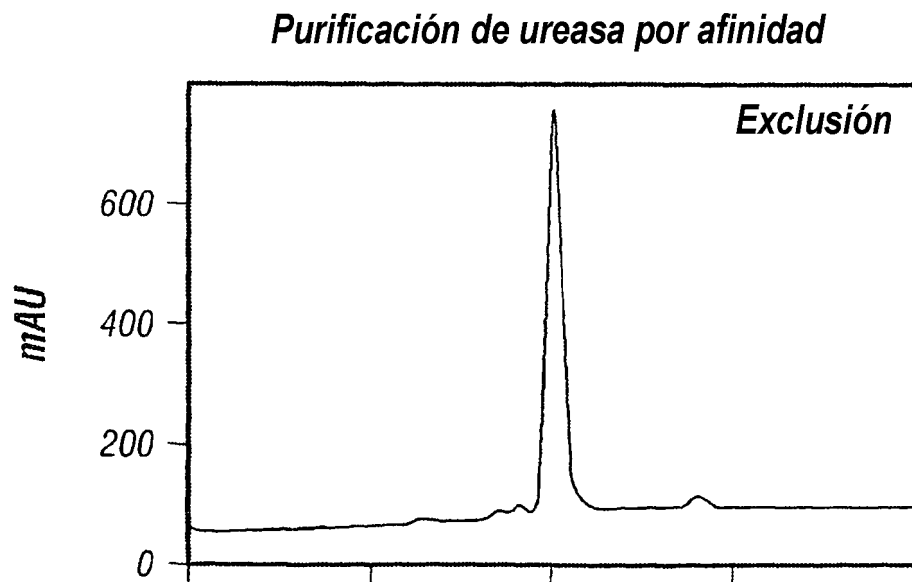


FIG. 3B

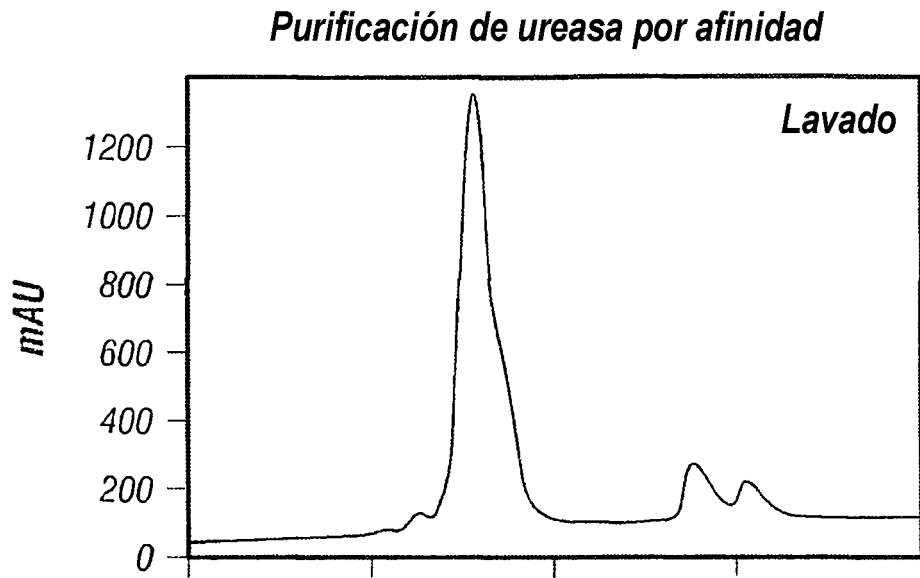


FIG. 3C

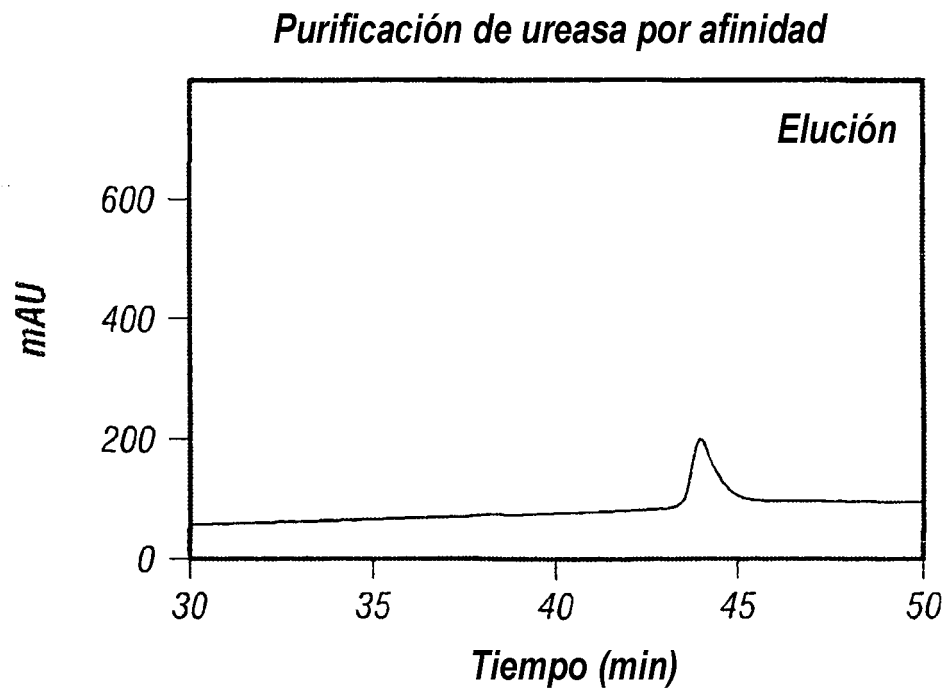


FIG. 3D

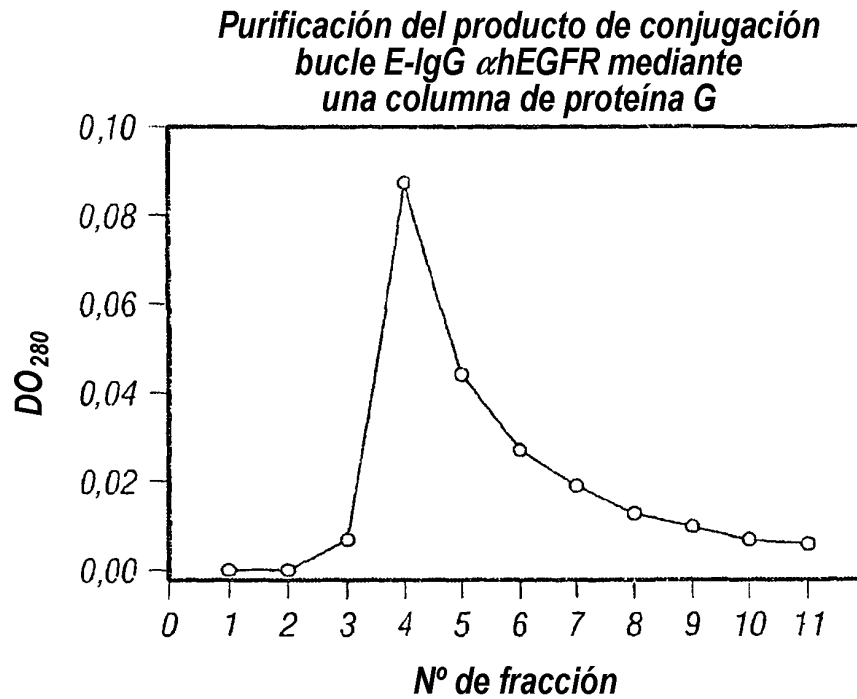


FIG. 4

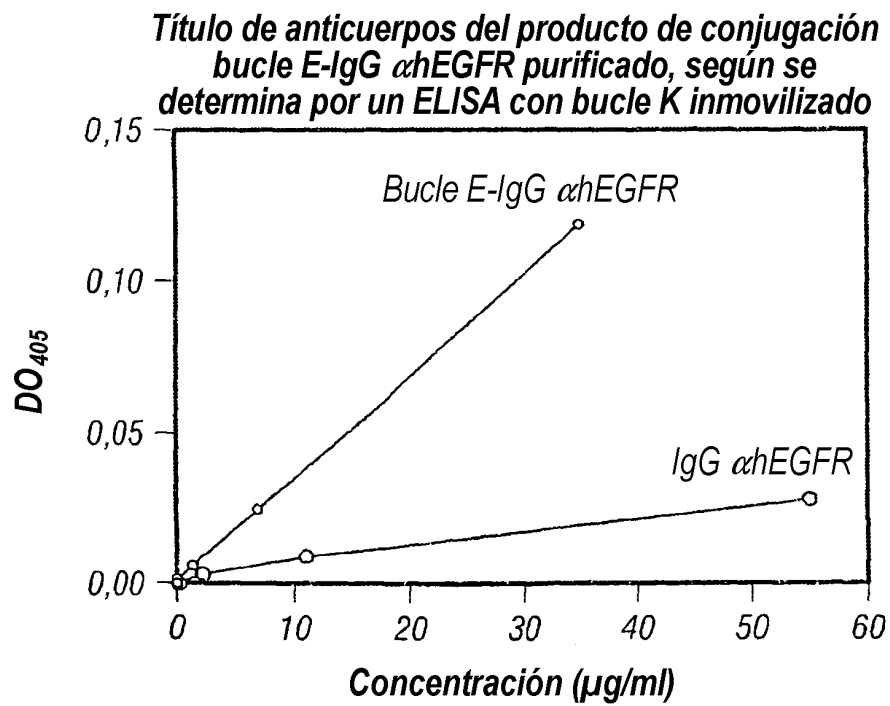


FIG. 5