

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 488**

51 Int. Cl.:

C07K 14/21 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 08799197 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2197903**

54 Título: **Deleciones en el dominio II de la exotoxina A de pseudomonas que reducen la toxicidad inespecífica**

30 Prioridad:

04.09.2007 US 969929 P

03.01.2008 US 18853 P

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

23.12.2014

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
National Institutes of Health Office of Technology Transfer 6011 Executive Boulevard Suite 325
Rockville, MD 20852-3804, US**

72 Inventor/es:

**PASTAN, IRA H.;
WELDON, JOHN y
FITZGERALD, DAVID**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 525 488 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

Deleciones en el dominio II de la exotoxina A de pseudomonas que reducen la toxicidad inespecífica.

Antecedentes de la invención

En los últimos años se han desarrollado inmunocombinados como un enfoque terapéutico alternativo para el tratamiento de neoplasias malignas. Los inmunocombinados estaban compuestos originalmente de un anticuerpo combinado químicamente a una toxina vegetal o una bacteriana, una forma que se conoce como una inmunotoxina. El anticuerpo se une al antígeno expresado sobre la célula objetivo y la toxina se internaliza lo que provoca la muerte celular al detener la síntesis de proteínas e inducir apoptosis (Brinkmann, U., Mol. Med. Today, 2:439-446 (1996)). Más recientemente, los genes que codifican el anticuerpo y la toxina se han fusionado y la inmunotoxina se expresa como una proteína de fusión.

Una variedad de toxinas de plantas, hongos y bacterias se han adaptado para usar con inmunotoxinas, que incluyen ricina, toxina de la difteria, y exotoxina A de Pseudomonas (PE) (Pastan, I. y otros, Nat Rev Cancer, 6:559-565 (2006); Pastan, I. y otros, Annu Rev Med, 58:221-237 (2007)). Las inmunotoxinas basadas en PE están actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de linfomas y leucemias que expresan CD22, así como también tumores sólidos que expresan mesotelina (Kreitman, R., y otros, J Clin Oncol, 23:6719-6729 (2005); Hassan, R., Clin Cancer Res, 13:5144-5149 (2007)). Típicamente, la PE se ha truncado o mutado para reducir su toxicidad inespecífica mientras que conserva su toxicidad para las células a las que está dirigida por la porción de direccionamiento de la inmunotoxina. Con el paso de los años, se han desarrollado numerosas formas mutadas y truncadas de PE. La que se usa en la mayoría de los ensayos clínicos hasta la fecha es una forma truncada de 38 kD denominada como "PE38."

El documento WO 2008/052322 describe una forma truncada de exotoxina A de Pseudomonas que consiste en los aminoácidos 252 a 608 o una variante de estos.

A pesar de estas décadas de esfuerzos, las actuales inmunotoxinas basadas en PE todavía no son plenamente satisfactorias. Aunque las inmunotoxinas PE38 que han llegado a ensayos clínicos son relativamente bien toleradas a dosis bajas, las toxicidades limitantes de la dosis han restringido su efecto terapéutico. En un ensayo clínico de fase I de una inmunotoxina basada en PE conocida como LMB-2, las toxicidades limitantes de la dosis por encima de 40 µg/kg administrada en días alternos (QOD) X 3 consistió en elevación de las transaminasas, diarrea, miocardiopatía y una reacción alérgica (Kreitman, R.J. y otros, J Clin Oncol, 18:1622-1636 (2000)). En un ensayo clínico de fase I de una inmunotoxina anti-mesotelina, denominada como SS1P, se encontró que los efectos adversos de pleuritis, urticaria, y el síndrome de fuga vascular eran limitantes de la dosis (Hassan, R. y otros, Clin Cancer Res, 13:144-5149 (2007)). En un ensayo de fase I de una tercera inmunotoxina basada en PE, BL22, las toxicidades limitantes de la dosis incluyeron varios casos de síndrome urémico hemolítico y un síndrome de liberación de citocinas con síndrome de fuga vascular sistémica (Kreitman, R.J. y otros, J Clin Oncol, 23:6719-6729 (2005)).

Adicionalmente, las inmunotoxinas basadas en PE actualmente en ensayos clínicos son altamente inmunogénicas. Se ha demostrado que esto no es un problema en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, donde frecuentemente está comprometida la capacidad del sistema inmune para armar una respuesta. Las inmunotoxinas típicamente pueden administrarse varias veces a pacientes con neoplasias malignas hematológicas. Los pacientes con tumores sólidos, sin embargo, usualmente desarrollan anticuerpos neutralizantes a las inmunotoxinas basadas en PE en cuestión de semanas después de la primera administración. Dado que muchos protocolos requieren un período de tres semanas entre las administraciones de inmunotoxinas, el desarrollo de anticuerpos durante este período significa efectivamente que, para tumores sólidos, usualmente sólo puede realizarse una administración de una inmunotoxina basada en PE antes que los anticuerpos del paciente la vuelvan ineficaz. Incluso una sola administración de una inmunotoxina basada en PE puede ser muy útil en reducir la carga tumoral del paciente, en eliminar metástasis más pequeñas, y en aliviar los síntomas, pero la capacidad de administrar múltiples dosis evidentemente sería muy útil.

Un número limitado de enfoques se han desarrollado como un intento de abordar estos problemas. Un enfoque para reducir la toxicidad inespecífica, al reducir el punto isoeléctrico de las regiones marco de los Fv usados como la porción de direccionamiento de las inmunotoxinas, se informó en la Solicitud del PCT conjunta núm. PCT/US01/43602, publicada como Publicación Internacional núm. WO 02/40545. Un enfoque para reducir la inmunogenicidad se describe en la Solicitud del PCT conjunta núm. PCT/US06/028986, publicada como documento WO 2007/016150, que informa el mapeo de los diferentes epítomos de PE y mutaciones de residuos de aminoácidos individuales que pueden combinarse para reducir la inmunogenicidad global de la molécula de PE resultante en comparación con la de PE38. Sin embargo, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la toxicidad limitante de la dosis de la inmunotoxina. Adicionalmente, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la inmunogenicidad de PE y de inmunotoxinas en las que PE actúa como la porción tóxica. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

Breve resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) mutada, aislada que comprende una secuencia de la fórmula: R^1_n -FCS- R^2_n - R^3_n -PE dominio III funcional, en donde: $n = 0$ o 1 independientemente para cada uno de R^1 , R^2 y R^3 ;

$R^1 = 1$ a 10 residuos de aminoácidos;

FCS= una secuencia de escisión de furina de los residuos de aminoácidos, cuya secuencia es escindible por furina y tiene un extremo de aminoácido y un extremo carboxilo, en donde la FCS:

a) se representa por la fórmula P4-P3-P2-P1, en donde P4 es un residuo de aminoácido en el extremo amino, P1 es un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo, P1 es una arginina o un residuo de lisina, y dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por la furina;

b) (i) adicionalmente comprende residuos de aminoácidos representados por P6-P5 en dicho extremo amino, (ii) adicionalmente comprende residuos de aminoácidos representados por P1'-P2' en dicho extremo carboxilo, (iii) en donde además P1 es una arginina o un residuo de lisina, P2' es triptófano, y P4 puede ser arginina, valina o lisina, siempre y cuando si P4 no es arginina, entonces P6 y P2 son residuos básicos, y (iv) dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por furina;

c) se selecciona de las sec. con núms. de ident.:12-20;

d) es la sec. con núm. de ident.:10, o una versión truncada de esta que comprende RQPR (sec. con núm. de ident.:21); o

e) es la sec. con núm. de ident.:11, o una versión truncada de esta que comprende RSKR (sec. con núm. de ident.:26);

$R^2 = 1$ a 10 aminoácidos; y

$R^3 = 1$ o más residuos contiguos de los residuos 365-394 de la sec. con núm. de ident.:1; el dominio III funcional de PE son los residuos 395-613 de la sec. con núm. de ident.:1, opcionalmente que comprende (i) sustituciones en uno o más residuos que corresponden a 609-613 de la sec. con núm. de ident.:1, (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina, o isoleucina por arginina en una posición que corresponde a la posición 490 de la sec. con núm. de ident.:1, (iii) una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina por uno o más residuos que corresponden a los residuos seleccionados de D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, y L597 de la sec. con núm. de ident.:1, cuyos residuos de la sec. con núm. de ident.:1 mantienen inmunogenicidad de un epítipo o subepítipo del dominio III de PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i) - (iii), en donde la PE mutada no incluye los residuos 1 a 273 y 285 a 364 de la sec. con núm. de ident.:1.

En un segundo aspecto la invención proporciona una molécula quimérica que comprende

(a) una citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, dicha citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a un antígeno o receptor sobre una superficie celular, conjugado o fusionado a

(b) una PE mutada de acuerdo con cualquier modalidad del primer aspecto de la invención 5.

En algunas modalidades, la FCS puede representarse mediante la fórmula P4-P3-P2-P1 (sec. con núm. de ident.:36), en donde P4 designa el extremo amino, P1 designa el extremo carboxilo, P1 es un residuo de arginina, y la secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por la furina. En algunas modalidades, la FCS (i) comprende además residuos de aminoácidos representados por P6-P5 en dicho extremo amino, (ii) comprende además residuos de aminoácidos representados por P1'-P2' en dicho extremo carboxilo, (iii) en donde además P1 es un residuo de arginina, P2' es triptófano, y P4 puede ser arginina, valina o lisina, siempre y cuando si P4 no es arginina, entonces P6 y P2 son residuos básicos, y (iv) dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por la furina. En algunas modalidades, la FCS es la sec. con núm. de ident.:10. En algunas modalidades, el dominio III funcional de PE consiste en la secuencia de residuos 395 a 613 de la sec. con núm. de ident.:1. En algunas modalidades, la PE mutada comprende uno o más residuos contiguos de los residuos 365-394 de la sec. con núm. de ident.:1 entre dicha FCS y dicho dominio III de PE. En algunas modalidades, "n" es 0 para R1, R2, y R3. En algunas modalidades, el ligando es un anticuerpo o fragmento de este que conserva la capacidad de reconocimiento del antígeno.

En un tercer aspecto la invención proporciona una molécula quimérica para su uso en la inhibición del crecimiento de una célula objetivo que tiene un exterior, dicha molécula quimérica comprende;

(a) una citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, dicha citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a un antígeno o receptor sobre el exterior de dicha célula, está conjugado o fusionado con

(b) una PE mutada de acuerdo con cualquier modalidad del primer aspecto de la invención.

En algunas modalidades, la FCS puede representarse mediante la fórmula P4-P3-P2-P1 (sec. con núm. de ident.:36), en donde P4 designa el extremo amino, P1 designa el extremo carboxilo, P1 es un residuo de arginina, y dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por la furina. En algunas modalidades, la FCS (i) comprende además residuos de aminoácidos representados por P6-P5 en dicho extremo amino, (ii) comprende además residuos de aminoácidos representados por P1'-P2' en dicho extremo carboxilo, (iii) en donde además P1 es un residuo de arginina, P2' es triptófano, y P4 puede ser arginina, valina o lisina, siempre y cuando si P4 no es arginina, entonces P6 y P2 son residuos básicos, y (iv) dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por la furina. En algunas

modalidades, la FCS es la sec. con núm. de ident.:10. En algunas modalidades, el dominio III funcional de PE consiste en la secuencia de residuos 395-613 de la sec. con núm. de ident.:1. En algunas modalidades, la PE mutada comprende uno o más residuos contiguos de los residuos 365-394 de la sec. con núm. de ident.:1 entre dicha FCS y dicho dominio III de PE. En algunas modalidades, el ligando es un anticuerpo o fragmento de este que conserva la capacidad de reconocimiento del antígeno.

En un cuarto aspecto la invención proporciona un ácido nucleico aislado, dicho ácido nucleico codifica una PE mutada de acuerdo con cualquier modalidad del primer aspecto de la invención.

En algunas modalidades, la FCS puede representarse mediante la fórmula P4-P3-P2-P1 (sec. con núm. de ident.:36), en donde P4 designa el extremo amino, P1 designa el extremo carboxilo, P1 es un residuo de arginina, y dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por la furina. En algunas modalidades, la FCS (i) comprende además residuos de aminoácidos representados por P6 P5 en dicho extremo amino, (ii) comprende además residuos de aminoácidos representados por P1' P2' en dicho extremo carboxilo, (iii) en donde además P1 es un residuo de arginina, P2' es triptófano, y P4 puede ser arginina, valina o lisina, siempre y cuando si P4 no es arginina, entonces P6 y P2 son residuos básicos, y (iv) dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por la furina. En algunas modalidades, la FCS es la sec. con núm. de ident.:10. En algunas modalidades, el dominio III de PE consiste en la secuencia de residuos 395 a 613 de la sec. con núm. de ident.:1. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica además un ligando que se une específicamente a un antígeno o receptor sobre una superficie celular, dicho ligando se fusiona directamente o a través de un enlazador peptídico a dicha PE. En algunas modalidades, el ligando es un anticuerpo o porción de este que conserva la capacidad de unión al antígeno.

Breve descripción de las figuras

Figuras 1A y 1B. La Figura 1A es un esquema de la estructura de la inmunotoxina anti-CD22 conocida como "HA22". HA22 comprende un fragmento Fv unido por disulfuro (VH/VL) de un anticuerpo anti-CD22, conectado de manera recombinante a un truncamiento citotóxico de 38 kD de la exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE", el truncamiento de 38 kD se conoce en la materia como "PE38"). PE38 se crea al suprimir de la secuencia de 613 residuos de aminoácidos de la PE nativa, los residuos 1-252 que corresponden al dominio I, junto con los residuos 365-380 del dominio Ib. La Figura 1B muestra la secuencia de los dominios II (residuos 251-364) y Ib (residuos 365-394) de PE38 (sec. con núm. de ident.:4). La numeración de los residuos se basa en la secuencia de aminoácidos de la PE nativa. Los residuos 365 a 380 de la PE nativa (en la caja) se suprimieron en la generación de PE38. Los sitios de escisión de proteasas lisosomales se indican mediante flechas adyacentes a la designación de su correspondiente banda a partir del análisis de SDS-PAGE. Los sitios de escisión de proteasas lisosomales están entre los residuos 260-261, 265-266, 297-298, 341-342, 342-343, 351-352, 352-353, 353-354, 364-381, 390-391, y 391-392. Además se indica el sitio de escisión de la furina (279-280). La secuencia de 11 residuos, sensible a la furina, en el dominio II de HA22-LR está sombreada.

Figura 2. La Figura 2 es un esquema de la estructura del mutante "JW008" de HA22. JW008 es una forma de HA22 que tiene los mismos truncamientos de PE38 que HA22 LR, pero en la que la secuencia nativa de la secuencia escindible por furina de los residuos 274-284 se ha alterado por sustituciones de dos residuos (sec. con núm. de ident.:11).

Figura 3. La Figura 3 muestra dibujos esquemáticos de HA22 y de una serie de variantes en las que se introdujeron deleciones en los dominios II y Ib del componente PE38 de HA22 para eliminar los sitios de escisión de proteasas lisosomales. Estas cinco proteínas mutantes (M1, M2, M3, M4, y M5) se ilustran mediante una vista ampliada de los dominios II y Ib de PB38 para mostrar la magnitud de las deleciones (líneas de puntos) y la presencia en M3 y M4 de una mutación puntual C287S. La numeración de los residuos se basa en la ubicación de los aminoácidos en la PE nativa. Las proteínas se purificaron posteriormente y se compararon con HA22 mediante el uso de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células Raji. La proteína M5 se denomina además en la presente como "HA22-LR" (sec. con núm. de ident.:10). La IC₅₀ (ng/ml) de cada mutante con respecto a la IC₅₀ de HA22 se presenta como un promedio de al menos tres experimentos separados.

Figura 4. HA22-LR es resistente a la digestión con extractos lisosomales. HA22 y HA22-LR se incubaron con extractos lisosomales de células Raji en condiciones idénticas. Después de la adición del extracto lisosomal, las muestras se retiraron inmediatamente (0), después de 30 min, y después de 1, 2, 4, 8, y 24 h, después se analizaron por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Las flechas indican las bandas de V_L, V_H-PE38 (HA22) y V_H-PE25 (HA22-LR) que componen las inmunotoxinas maduras.

Figura 5. Farmacocinética de HA22-LR. Los ratones Balb/C se inyectaron por vía intravenosa con 10 µg de HA22 (□) o HA22-LR (○) y se extrajeron muestras de sangre en varios intervalos entre 2 y 60 min a partir del momento de la inyección. La concentración de inmunotoxina en el suero a los diferentes intervalos se determinó mediante ELISA y se ajustó a una función de caída exponencial simple. Se indica la vida media correspondiente (t_{1/2}). Cada punto es la concentración de inmunotoxina en el suero de un ratón, y la concentración en cada intervalo de tiempo se determinó a partir de al menos dos ratones diferentes.

Figura 6. HA22-LR tiene una potente actividad antitumoral. Los ratones SCID con xenoinjertos de tumores CA46 se trataron QOD X 3 (los días 6, 8, y 10) por vía intravenosa con PBS (x; línea continua), 0.3 mg/kg de HA22 (o; línea continua), o HA22-LR a 1.0 (▲; línea discontinua), 1.75 (□; línea continua) o 2.5 (*; línea discontinua) mg/kg. Las flechas indican los días en que se administró el tratamiento. El tamaño del tumor se midió en el transcurso de 40 días. Los puntos representan el tamaño tumoral promedio de todos los ratones en el grupo de tratamiento. Las barras de error muestran el intervalo de confianza del 95 % de cada valor promedio.

5
10 Descripción detallada de la invención

Introducción

15 Durante los últimos veinte años la exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") se ha estudiado intensamente para su uso como la porción tóxica de toxinas dirigidas, tales como las inmunotoxinas. La forma más común de la PE usada en las toxinas dirigidas ha sido una forma de 38 kD conocida como PE38, en la que se ha suprimido la totalidad del dominio I de la toxina, junto con los residuos 365-379 del dominio Ib. PE38 contiene la totalidad de los dominios II y III de la toxina. El dominio II de PE tiene una secuencia reconocida y escindida por una enzima conocida como furina, que está presente en las células animales. Las PE que contienen la secuencia de escisión de la furina sufren procesamiento proteolítico en el interior de las células objetivo, lo que activa la actividad citotóxica de la toxina. Algunas formas de PE desarrolladas en el pasado intentaron aumentar la actividad al eliminar la porción del dominio II corriente arriba del sitio de escisión de la furina, con la esperanza de que esto eliminaría la necesidad del procesamiento proteolítico en el interior de las células objetivo.

20
25 Sorprendentemente, ahora hemos descubierto que pueden producirse formas de PE al invertir algunas de las estrategias usadas anteriormente para desarrollar PE para su uso en toxinas dirigidas, y que estas nuevas formas de PE tienen ventajas no proporcionadas por las PE anteriores. Más sorprendentemente aún, estas nuevas formas de PE conservan una excelente actividad citotóxica y tienen mucha menos toxicidad inespecífica cuando se usan *in vivo*. Esta disminución de la toxicidad permite la administración de dosis mucho más altas, con un aumento concomitante en la actividad antitumoral.

30
35 En las nuevas formas de PE, hemos suprimido los residuos restantes del dominio Ib (excepto los necesarios para una buena actividad de ADP-ribosilación), que se pensó que era útil para facilitar la translocación eficaz de la toxina en la célula objetivo después de la activación proteolítica. En segundo lugar, hemos suprimido todo el dominio II excepto la secuencia de escisión de la furina.

40 La eliminación de la mayor parte del dominio II y de todo el dominio Ib proporciona moléculas de PE con un número de ventajas sobre las formas de PE disponibles anteriormente. En primer lugar, tanto el dominio Ib como el dominio II contienen epítomos que se suman a la inmunogenicidad global de la PE. Al eliminar todo el dominio II excepto el sitio de escisión de la furina y la porción del dominio Ib incluido anteriormente incluso en PE truncadas, se eliminan tanto los epítomos lineales como los conformacionales presentes en los dominios, lo que reduce la inmunogenicidad de la PE resultante en comparación con las formas de la toxina que han estado disponibles previamente.

45 En segundo lugar, se reduce el tamaño total de la toxina. Las formas ilustrativas estudiadas en el curso del presente trabajo tenían un peso molecular de 25 kD, y por lo tanto representan una disminución de unos 13 kD a partir del tamaño de la forma más común de PE actualmente en uso, PE38. Las moléculas más pequeñas pueden ser capaces de penetrar más profundamente en los tumores sólidos, y por lo tanto generalmente se ha considerado deseable desarrollar formas más pequeñas de la toxina para su uso contra tumores sólidos. El menor tamaño de las PE de la invención en comparación con las disponibles previamente sugiere que serán útiles tanto en el tratamiento de tumores sólidos, en que el tamaño más pequeño de la toxina puede facilitar la penetración del tumor, como en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, en que el tamaño de la toxina es de menor importancia. Adicionalmente, las PE se usan como las porciones tóxicas de toxinas dirigidas a células objetivo que no son células tumorales. Las toxinas más pequeñas de la invención deben ser igualmente útiles en el contexto de estas células objetivo.

50
55 En tercer lugar, y sorprendentemente, pruebas *in vivo* demostraron que las inmunotoxinas producidas con las toxinas resultantes conservan buena citotoxicidad para la mayoría de las células objetivo, mientras que tienen una toxicidad inespecífica notablemente menor en un modelo animal que la inmunotoxina comparable producida con PE38. De hecho, aunque los ratones portadores de xenoinjertos de tumores de una neoplasia maligna hematológica humana mostraron una respuesta completa cuando se inyectaron con la inmunotoxina múltiples veces a 2.5 mg/kg, ninguno de los ratones murió cuando se inyectaron con la inmunotoxina múltiples veces a 5.0 mg/kg (el equivalente de 100 mg por dosis). En comparación, la LD50 de HA22 en ratones es de aproximadamente 1.3 mg/kg. Estos resultados no sólo muestran que los ratones pueden tolerar dosis de las nuevas inmunotoxinas de más de 3 veces que de una inmunotoxina similar producida con PE38, sino que pueden tolerar dosis de al menos dos veces de la necesaria para inducir una respuesta completa.

60
65 En cuarto lugar, algunas formas anteriores de PE en que se suprimió una porción del dominio II, se eliminó el sitio de

escisión de la furina. Esto eliminó la necesidad de escisión intracelular por furina, pero también hizo más difícil de diseñar una molécula funcional. Típicamente, el anticuerpo se unió al dominio III de PE, y tendió a permanecer asociado con la porción de PE dentro de la célula. En las moléculas quiméricas que usan PE de la presente invención, el anticuerpo u otra porción de direccionamiento pueden unirse corriente arriba del sitio de escisión de la furina y escindirle lejos del dominio III de PE una vez dentro de la célula.

Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se llevaron a cabo con una PE ilustrativa de la invención para comparar sus efectos cuando se integra a una inmunotoxina con los de una inmunotoxina producida con PE38. La inmunotoxina ilustrativa elegida para la comparación es una inmunotoxina conocida como HA22, que emplea un anticuerpo anti-CD22 fusionado a PE38. Se realizaron comparaciones entre una inmunotoxina en que el anticuerpo usado en HA22 se fusionó a una de las nuevas PE como la toxina (por conveniencia, este constructo se denominará como "HA22-LR", donde "LR", se refiere a la resistencia a la degradación lisosomal del componente modificado de PE) y HA22 (en que el mismo anticuerpo se fusiona con PE38). En estudios *in vitro*, la inmunotoxina producida con la nueva PE tenía aproximadamente la misma citotoxicidad que HA22 contra células de varias líneas celulares que expresan CD22. En estudios *in vivo* en un modelo animal, se estimó que la inmunotoxina HA22-LR es menos citotóxica que HA22, la inmunotoxina producida con PE38. Sin embargo, la nueva inmunotoxina además había reducido significativamente la toxicidad inespecífica, y los ratones pudieron tolerarla en dosis mucho más altas que HA22, lo que mejoró así el efecto antitumoral del tratamiento y permitió una mayor ventana terapéutica entre la dosis máxima tolerada y la necesaria para inducir una respuesta completa.

Un número de inmunotoxinas se han producido con el uso de diferentes anticuerpos u otros ligandos como la porción de direccionamiento, pero con el uso de una PE como la porción de toxina. Se ha sabido que, en algunos casos, la porción de direccionamiento puede hacer alguna contribución a la toxicidad inespecífica de una inmunotoxina. Ver, por ejemplo, la Solicitud del PCT conjunta núm. PCT/US01/43602, publicada como Publicación Internacional núm. WO 02/40545, que informa que la toxicidad inespecífica de algunas inmunotoxinas podría reducirse al reducir el punto isoeléctrico de las regiones marco de los Fv usados como la porción de direccionamiento. Además ha quedado claro, sin embargo, que, en las inmunotoxinas y otras moléculas quiméricas que usan PE como la porción de toxina, el principal contribuyente a la toxicidad inespecífica es el componente de PE. Por lo tanto, se espera que la reducción de la toxicidad inespecífica similar a la observada con respecto a la inmunotoxina HA22-LR en los estudios informados en la presente también resultará cuando las PE de la invención se usen como la porción de toxina de moléculas quiméricas que usan como las porciones de direccionamiento a anticuerpos diferentes del anticuerpo usado en HA22 como la porción de direccionamiento u otros ligandos como la porción de direccionamiento.

Se realizaron estudios de la citotoxicidad de una inmunotoxina producida con un anticuerpo diferente, SS1, que reconoce y se une a la mesotelina, un antígeno presente en las células de muchos tipos de cáncer. El anticuerpo SS1 se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,081,518, y una inmunotoxina que comprende SS1 fusionado con PE38 (la inmunotoxina se conoce como "SS1P") se ha probado en un ensayo clínico de Fase I. Se produjo una inmunotoxina mediante el uso del anticuerpo SS1 como la porción de direccionamiento y la forma de PE usada en HA22-LR ("PE-LR") como la porción de toxina y para las dos inmunotoxinas, SN1P y SS 1-PE-LR se probó su citotoxicidad contra un número de líneas celulares que expresan mesotelina. Las dos inmunotoxinas tenían actividad comparable contra varias líneas celulares. La inmunotoxina SS1-PE-LR tuvo una actividad notablemente inferior contra algunas líneas celulares en comparación con SS1P. Esto indica que, como la mayoría de los agentes terapéuticos, no todos los tipos de cáncer de los pacientes u otras células de interés serán susceptibles al tratamiento con una inmunotoxina que usa una PE-LR como la porción de toxina. Si el crecimiento de las células de cualquier tipo de cáncer particular o de otras células objetivo de interés puede inhibirse, esto puede determinarse fácilmente por medios convencionales, tales como tomar una biopsia de las células, poner en contacto a las células con la inmunotoxina que contiene PE-LR, y determinar si la inmunotoxina inhibe el crecimiento de las células cancerosas u otras células objetivo en la medida deseada.

Adicionalmente, se conocen varios medios que aumentan la citotoxicidad de PE al alterar residuos en el dominio III de la secuencia nativa. Estudios realizados en el laboratorio de los presentes inventores hace más de una década determinaron que ciertas secuencias de aminoácidos y las repeticiones de estas secuencias podrían usarse en lugar de la secuencia nativa de los residuos 609 a 613 de PE para aumentar la citotoxicidad de la PE resultante en comparación con la PE producida con la secuencia nativa (la secuencia nativa de los residuos 609-613 y mutaciones específicas que aumentan la citotoxicidad se discuten con más detalle más abajo en la sección titulada "Exotoxina A de *Pseudomonas*"). Más recientemente, el trabajo del laboratorio de los presentes inventores indicó que una sustitución de glicina, alanina, valina u otros residuos por la arginina presente en la posición 490 de la secuencia de la PE nativa aumentaría la citotoxicidad, donde la sustitución de la arginina por alanina es particularmente ventajosa. Ver, por ejemplo la Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos 2007/0189962; Bang y otros, Clin Cancer Res, 11:1545-1550 (2005). Aunque se espera que las PE de la invención que usan la secuencia nativa del dominio III sean útiles por sí mismas, si se desea la citotoxicidad de la PE puede aumentarse con el uso de una o más de estas sustituciones o mutaciones. Cualquier sustitución o mutación particular puede probarse para determinar si conserva una citotoxicidad adecuada para su uso *in vitro* y si tiene una toxicidad inespecífica lo suficientemente baja para su uso *in vivo* mediante el uso de ensayos conocidos en la materia, que incluyen los que se exponen en los Ejemplos.

Adicionalmente, un trabajo previo en el laboratorio de los presentes inventores ha mapeado la presencia de epítomos o

subepítomos en el dominio III. La unión de anticuerpos que reconocen esos epítomos puede reducirse o eliminarse mediante sustituciones de los residuos que normalmente están presentes en ciertas posiciones. Como se expone en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos, la unión de estos anticuerpos puede reducirse al sustituir una alanina, glicina, serina o glutamina por un residuo de aminoácido que corresponde a un residuo de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 1 seleccionado del grupo que consiste en D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, y L597. Dado que la presencia de estos residuos antes de su sustitución mantiene un epítomo o subepítomo en el dominio III, para facilitar la referencia, los residuos en estas posiciones pueden denominarse como que "mantienen" la inmunogenicidad de sus respectivos epítomos o subepítomos, mientras que la sustitución de ellos con alanina o similares reduce la inmunogenicidad del dominio III de PE que resulta del epítomo o subepítomo nativo. Mientras se espera que las PE de la invención con la secuencia nativa del dominio III sean útiles por sí mismas, por lo tanto, si se desea pueden realizarse sustituciones de uno de más de los residuos identificados anteriormente para reducir aún más la inmunogenicidad de las PE de la invención. Cualquier sustitución o mutación particular puede probarse para determinar si conserva una citotoxicidad adecuada para su uso *in vitro* o *in vivo* mediante el uso de ensayos conocidos en la materia, que incluyen los que se exponen en los Ejemplos.

En las formas preferidas, el agente de direccionamiento de las moléculas quiméricas, tales como inmunotoxinas, en las que se usan las PE de la invención, no es el factor de crecimiento transformante α ("TGF α ").

Furina y secuencias escindibles por furina

Como se informa por Duckert y otros Protein Engineering, Design & Selection 17(1):107-112 (2004) (en lo adelante, "Duckert y otros"), la furina es una enzima en una "familia de serina proteasas CA2+ dependientes dibásicas- y monobásicas específicas evolutivamente conservadas denominadas proproteínas convertasa tipo substilisin/kexina." *Id.*, en pág. 107. La furina, conocida además como "enzima de escisión de aminoácidos básicos pareados" o "PACE", es uno de los siete miembros de mamíferos de la familia y está implicada en el procesamiento de varias proteínas endógenas humanas. Ver generalmente, por ejemplo, Thomas G. Nat RevMol Cell Biol, (10):753-66 (2002). Es una proteína asociada a la membrana que se encuentra principalmente en la red trans-Golgi. La secuencia de la furina humana se conoce desde principios de 1990. Ver, por ejemplo, Hatsuzawa, K. y otros, .J. Biol Chem., 267:16094-16099 (1992); Molloy, S. y otros J. Biol. Chem., 267:16396-16402 (1992).

El sitio mínimo de escisión para la furina es, en el código de una sola letra para los residuos de aminoácidos, R-X-X-R (sec. con núm. de ident.:6), donde la escisión ocurre después de la segunda "R". Duckert y otros resumen la información disponible de las secuencias de 38 proteínas que se informan en la literatura por tener sitios de escisión de la furina, que incluyen proteínas de mamíferos, proteínas de bacterias patógenas, y proteínas virales. Se informa que el 31, u 81 %, de los motivos de escisión revisados tenían la secuencia consenso R-X-[R/K]-R (sec. con núm. de ident.:7), de los cuales el 11, o 29 %, tenían R-X-R-R (sec. con núm. de ident.: 8), y el 20, o 52 %, eran R-X-K-R (sec. con núm. de ident.:9). Tres de los motivos de escisión sólo contenían la secuencia de escisión mínima. Duckert y otros además alinearon los motivos e identificaron los residuos que se encuentran en cada posición en cada furina tanto para el motivo de escisión en sí mismo como en los residuos circundantes. La Fig. 1A de Duckert y otros muestra por el tamaño relativo, los residuos más comúnmente encontrados en cada posición. Por convención, los residuos que rodean el sitio de escisión de la furina se enumeran a partir del enlace escindible (que se indica típicamente con el símbolo " \downarrow "). Cuando se cuenta hacia el extremo N-terminal, los residuos del sustrato se designan como P1, P2, y así sucesivamente, mientras que cuando se cuenta hacia el extremo C-terminal, los residuos se designan como P1', P2', y así sucesivamente. Ver, por ejemplo, Rockwell, N. C., y J. W. Thorner, Trends Biochem. Sci., 29:80-87 (2004), Thomas G., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3:753-766 (2002). Por lo tanto, al tener en cuenta la convención, la siguiente secuencia puede usarse para alinear y enumerar los residuos de la secuencia mínima de escisión y los residuos circundantes:

P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5',

en la que la secuencia mínima de escisión de la furina se numera como P4-P1. La alineación de 38 secuencias escindidas por la furina, realizada por Duckert y otros, identifica las variaciones permitidas en dependencia de los residuos presentes en varias posiciones. Por ejemplo, si el residuo en P4 no es una R, eso puede compensarse por tener residuos de arginina o lisina en P2 y P6. *Id.*, en pág. 109.

En la PE nativa, la escisión por furina se produce entre la arginina 279 y la glicina 280 en un lazo rico en arginina localizado en el dominio II de la toxina. La secuencia nativa de escisión de la furina en el dominio II de PE se expone más abajo (con números que indican las posiciones de los residuos en la secuencia nativa de PE de 613 aminoácidos), y se alinea para mostrar su numeración en virtud de la convención mencionada anteriormente:

274- R H R Q P R G W E Q L -284 (sec. con núm. de ident.:10)

P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5'

En estudios en los que se basa la presente invención, se realizaron sustituciones en las posiciones P3 y P2 para formar la secuencia siguiente, con las sustituciones subrayadas:

274- R H R S K R G W E Q L -284 (sec. con núm. de ident.:11).

Esta secuencia mostró una tasa de escisión más rápida que la secuencia nativa, y cuando se usó en una inmunotoxina ilustrativa (denominada como "JW008" para conveniencia de referencia) resultó en aproximadamente la misma citotoxicidad para las células objetivo que la secuencia nativa.

5 Basados en este y en nuestros estudios anteriores, la secuencia de escisión de furina usada para unir la molécula de direccionamiento al dominio III de PE puede ser la secuencia de escisión mínima de furina, R-X-X-R (sec. con núm. de ident.:6), o cualquiera de las otras secuencias de escisión de furina conocidas en la materia o permitidas por la Fig. 1A de Duckert y otros, con la condición de que, si existe un residuo presente en la posición identificada como P2', éste debe ser triptófano o, si no es triptófano, no debe ser valina o alanina. Por ejemplo, en algunas modalidades, la secuencia puede ser RKKR (sec. con núm. de ident.:12), RRRR (sec. con núm. de ident.:13), RKAR (sec. con núm. de ident.:14), SRVARS (sec. con núm. de ident.:15), TSSRKRRFW (sec. con núm. de ident.:16), o ASRRKARSW (sec. con núm. de ident.:17).

15 Como se señaló en Duckert y otros, en la posición P4 puede usarse un residuo menos favorable que R (principalmente valina) si está compensado por residuos de arginina o lisina en las posiciones P2 y P6, de manera que al menos dos de los tres residuos en P2, P4 y P6 sean básicos. Por lo tanto, en algunas modalidades, la secuencia escindible de furina es RRVKKRRFW (sec. con núm. de ident.:18), RNVVRRDW (sec. con núm. de ident.:19), o TRAVRRRSW (sec. con núm. de ident.:20). El residuo en la posición P1 puede ser la arginina presente en la secuencia nativa, o lisina. Por lo tanto, una lisina puede ser sustituida por la arginina en la posición P1 en, por ejemplo, cualquiera de las secuencia que se exponen anteriormente.

25 En algunas modalidades, la secuencia de la secuencia escindible de furina sigue la secuencia de la secuencia de escisión de furina de PE: R-H-R-Q-P-R-G-W-E-Q-L (sec. con núm. de ident.:10) o una versión truncada de la secuencia nativa, siempre que esta contenga la secuencia de escisión mínima de furina y sea escindible por la furina. Por lo tanto, en algunas modalidades, la secuencia escindible de furina puede ser R-Q-P-R (sec. con núm. de ident.:21), R-H-R-Q-P-R-G-W (sec. con núm. de ident.:22), R-H-R-Q-P-R-G-W-E (sec. con núm. de ident.:23), H-R-Q-P-R-G-W-E-Q (sec. con núm. de ident.:24), o R-Q-P-R-G-WE (sec. con núm. de ident.:25). En algunas modalidades, la secuencia es R-H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (sec. con núm. de ident.:11), o una versión truncada de esta secuencia, siempre que esta contenga la secuencia de escisión mínima de la furina y sea escindible por la furina. Así, en algunas modalidades, la secuencia escindible de furina puede ser R-S-K-R (sec. con núm. de ident.:26), R-H-R-S-K-R-G-W (sec. con núm. de ident.:27), H-R-S-K-R-G-W-E (sec. con núm. de ident.:28), R-S-K-R-G-W-E-Q-L (sec. con núm. de ident.:29), H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (sec. con núm. de ident.:30), o R-H-R-S-K-R (sec. con núm. de ident.:31). Cualquier secuencia particular escindible por furina puede probarse fácilmente al integrarla en una inmunotoxina con el anticuerpo usado en HA22 y probar la inmunotoxina resultante *in vitro* en una línea celular CD22+. En modalidades preferidas, las secuencias escindibles por furina no reducen la citotoxicidad de la inmunotoxina resultante por debajo de 10 % de la citotoxicidad de la de HA22 cuando HA22 se prueba en la misma línea celular, y con mayor preferencia no reducen la citotoxicidad de la inmunotoxina resultante por debajo de 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 % o más de la citotoxicidad de HA22 cuando HA22 se prueba en la misma línea celular, donde cada aumento de porcentaje de citotoxicidad se prefiere más que el precedente.

40 Si alguna secuencia particular es escindible por furina o no, puede determinarse mediante métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, si una secuencia es escindible por furina o no, puede probarse al incubar la secuencia con furina en amortiguador de furina (0.2 M de NaOAc (pH 5.5), 5 mM de CaCl₂) a una relación molar enzima:sustrato de 1:10 a 25 °C durante 16 horas. Estas condiciones se han establecido previamente como óptimas para la escisión de PE por la furina. Preferentemente, la furina usada es furina humana. La furina humana truncada recombinante está comercialmente disponible, por ejemplo, de New England Biolabs (Beverly, MA). Ver además, Bravo y otros, J Biol Chem, 269(14):25830-25837 (1994).

50 Para mayor claridad, se señala que las PE actualmente en uso, tales como PE38 y PE40, comprenden la secuencia de escisión nativa de furina, y que la secuencia de escisión de furina se conecta al dominio III de PE. A diferencia de las PE de la invención, sin embargo, la secuencia de escisión de furina de PE38 y PE40 no está conectada directamente al dominio III de estas PE; más bien, están conectadas al dominio III a través de (a) 79 residuos del dominio II en el lado carboxilo del sitio de escisión de furina (residuos 285 a 364 del dominio II, por conveniencia, estos residuos se denominarán como los "residuos carboxilo del dominio II"), más (b) ya sea los residuos 365-394 de la sec. con núm. de ident.:1, en el caso de PE40, o los residuos 381-394 de la sec. con núm. de ident.:1, en el caso de PE38. Como se discute adicionalmente en la presente, aunque el límite estructural del dominio III de PE se considera que comienza en el residuo 405, los análisis funcionales han mostrado que el dominio III requiere un segmento del dominio Ib para conservar la actividad de ADP-ribosilación. En consecuencia, el dominio III funcional se define como los residuos 395-613 de PE, y por lo tanto se prefiere que las toxinas de la invención comprendan los residuos 395-613 de PE, con ciertas variaciones permitidas descritas más abajo. Para facilitar la referencia, en la presente las referencias a deleciones del dominio Ib o a la inclusión opcional de algunos residuos contiguos del dominio Ib se refieren a la porción del dominio Ib que consiste de los residuos 365-394, aunque estructuralmente, se entiende que el dominio Ib comprende los residuos 365-399.

65 La delección de los residuos 365-394 y de los residuos que constituyen el dominio II, distintos de los de la secuencia de

escisión de furina, es deseable, ya que las delecciones eliminan cualquier epítipo inmunogénico presente en estas porciones de la molécula de PE. En algunas modalidades, sin embargo, el profesional puede desear conservar algunos o todos los residuos de 381-394, que normalmente se encuentran en PE38, o conservar 1-10 residuos en los extremos amino o carboxilo, o ambos, de la secuencia de escisión de furina, con 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 y 1 residuos entre sucesivamente los más preferidos. Típicamente, los residuos a cada lado de la secuencia de escisión de furina son los residuos que normalmente están presentes en la posición correspondiente de PE (sec. con núm. de ident.:1). Por ejemplo, como se señaló anteriormente, la secuencia de escisión de PE por la furina se considera que termina en el residuo 284. Si el profesional desea extender la secuencia en el lado carboxilo con tres residuos, normalmente los residuos elegidos serían los presentes en las posiciones 285-287 de la sec. con núm. de ident.:1. Por lo tanto, mientras que en las modalidades preferidas, el término "secuencia de escisión de furina" se refiere a una secuencia de 4 a 11 residuos de aminoácidos, escindible por furina (como en la secuencia nativa de PE escindible por furina, que se expone anteriormente como la sec. con núm. de ident.:10), en algunas modalidades, se hace referencia a una secuencia tal, que comprende además 1-10 residuos de aminoácidos ubicados en los extremos amino o carboxilo, o ambos.

Como se señaló anteriormente, en las PE actualmente en uso como las porciones tóxicas, tales como PE38 y PE40, la secuencia de escisión de furina se une al dominio III mediante la secuencia del carboxilo (residuos 285-364) del dominio II y mediante ya sea los residuos 365-394 (en PE40) o mediante los residuos 381-394 (en PE38). En contraste, en las PE de la invención, una secuencia de escisión de furina (tal como la sec. con núm. de ident.:10, o variantes truncadas o modificadas de esta) está unida en su extremo carboxilo al dominio III, sin interponer entre los dos, algunos o todos los residuos carboxilo del dominio II, y preferentemente sin tener entre los dos, algunos o todos los residuos 365-394.

Las PE de la invención pueden representarse mediante la fórmula definida en el primer aspecto de la invención.

En algunas modalidades, al menos uno de R^1 , R^2 y R^3 , n no es igual a 0. Como se ha señalado, en algunas modalidades preferidas, todos los residuos 365-394, se suprimen; por lo tanto, en estas modalidades, en el término R^3_n , $n=0$. Similarmente, en algunas modalidades, no hay residuos en el lado amino de la FCS; en estas modalidades, en el término R^1_n , $n=0$. Similarmente, en algunas modalidades, no hay residuos en el lado carboxilo de la FCS entre la FCS y los dominios Ib o III de PE; en estas modalidades, en el término R^2_n , $n=0$. En modalidades particularmente preferidas, el n en R^1_n , y R^3_n , es igual a cero.

Definiciones

Unidades, prefijos, y símbolos se denotan en su forma del Sistema Internacional de Unidades (SI) aceptadas. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de cualquier otra forma, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación del grupo amino al grupo carboxi.

La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, la que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas. La secuencia de la PE nativa (sec. con núm. de ident.:1) se conoce bien en la materia y se expone, por ejemplo, en la sec. con núm. de ident.:1 de la Patente de los Estados Unidos núm. 5,602,095. El método de acción y la estructura de PE, así como también las modificaciones que resultan en un número de variantes de PE, se discuten en detalle en una sección dedicada a este propósito.

Las mutaciones de PE se describen típicamente en la materia como referencia al residuo de aminoácido presente en una posición particular en la secuencia de 613 aminoácidos de la PE nativa (sec. con núm. de ident.:1). Esta convención se sigue en esta descripción. Si el residuo de aminoácido presente en una posición particular, se ha reemplazado por otro residuo, en contraposición, por ejemplo, a simplemente suprimirse como parte de un truncamiento de la secuencia nativa, se indica al exponer el residuo presente en la secuencia nativa de PE, y el número de la posición, seguido por el residuo de aminoácido con el que se ha sustituido el residuo nativo en la mutación particular en discusión. Por lo tanto, por ejemplo, el término "R490A" indicaría que la "R" (arginina, en el código estándar de una sola letra) en la posición 490 de la secuencia de la PE nativa (sec. con núm. de ident.:1) se ha reemplazado por una "A" (alanina, en el código estándar de una letra) en la PE mutada en discusión. Similarmente, "K590Q" indicaría que la lisina normalmente presente en la posición 590 de PE se ha reemplazado con una glutamina. El código estándar de una letra para aminoácidos comunes se expone más abajo.

El término "dominio III funcional de PE" se refiere a los residuos 395-613 de la PE nativa (la secuencia nativa es la sec. con núm. de ident.:1). Aunque los límites estructurales del dominio III se han establecido en los residuos 405-613, los análisis funcionales han mostrado que el dominio III requiere un segmento del dominio Ib para conservar la actividad de ADP-ribosilación (Hwang, J. y otros, Cell, 48:129-136 (1987); Siegall, C.B. y otros, J Biol Chem, 264:14256-14261 (1989)). El dominio III funcional de PE se define por lo tanto por los residuos 395-613 de PE (Kihara, A. y Pastan, I., Bioconjug Chem, 5:532-538 (1994)).

Se conoce que una variedad de agentes, tales como citocinas, se unen a receptores específicos en la superficie celular y pueden usarse para dirigir las toxinas a células que portan tales receptores. Por ejemplo, 1L-13 se ha usado como un agente para dirigir las toxinas, que incluyen formas de PE a las células que sobre-expresan el receptor de 1L-13. Los

anticuerpos se unen a antígenos específicos y son otro tipo de agente usado para dirigir las toxinas a las células objetivo deseadas.

5 El término "ligando" se usa en la presente para referirse genéricamente a moléculas que se unen específicamente a un receptor o antígeno en una superficie celular. En las formas preferidas, el término abarca tanto citocinas como anticuerpos o fragmentos de estos que conservan la capacidad de reconocimiento y unión por el antígeno. En la forma más preferida, el término se refiere a anticuerpos o fragmentos de estos que conservan la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno.

10 El término "toxina dirigida" se refiere a una toxina que es dirigida a las células deseadas mediante un ligando que se une a receptores o antígenos específicos presentes en la superficie de tales células. El término de inmunotoxinas se refiere a un subconjunto de toxinas dirigidas en que la toxina es dirigida a las células deseadas mediante un anticuerpo o fragmento de este.

15 El factor de crecimiento transformante α , o "TGF α " es un factor de crecimiento bien conocido que en su forma madura es una proteína de 50 aminoácidos, de 5.5 kD. Ver, por ejemplo, Brown, "The epidermal growth factor/transforming growth factor- α family and their receptors". Eur J Gastroenterol Hepatol 7:914-922 (1995); Soler C., y Carpenter G., Thomson A.W., ed. "The epidermal growth factor (EGF) family". The Cytokine Handbook, 3ra ed., San Diego, CA, (páginas 194-197 (1998)). El TGF α humano recombinante está comercialmente disponible de, por ejemplo, Sigma-Aldrich (catálogo núm. T7924, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO).

20 Por conveniencia de referencia, como se usa en la presente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos (que además pueden denominarse como "intactos"), fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno, ya sea producidos mediante modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo*, mediante el uso de metodologías de ADN recombinante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y miméticos de anticuerpos, a menos que se requiera de cualquier otra manera por el contexto. El anticuerpo puede ser una IgM, IgG (por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄), IgD, IgA o IgE.

25 El término "fragmentos de anticuerpos" se refiere a moléculas que comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión al antígeno o variable de los anticuerpos intactos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; anticuerpos de hélice estabilizada (ver, por ejemplo, Arndt y otros, J Mol Biol, 312:221-228 (2001)); diacuerpos (ver más abajo); moléculas de anticuerpo de una sola cadena ("scFvs," ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,888,773); anticuerpos estabilizados con disulfuro ("dsFvs", ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,747,654 y 6,558,672), y anticuerpos de dominio ("dAbs," ver, por ejemplo, Holt y otros, Trends Biotech, 21(11):484-490 (2003), Ghahroudi y otros FEBS Lett., 414:521-526 (1997), Lauwereys y otros, EMBO J, 17:3512-3520 (1998), Reiter y otros, J. Mol. Biol., 290:685-698 (1999), y Davies y Riechmann, Biotechnology, 13:475-479 (2001)).

30 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, dichos fragmentos comprenden un dominio pesado variable ("V_H" o "VH") conectado a un dominio ligero variable ("V_L" o "VL") en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos y su producción se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097: WO 93/11161; y Hollinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

35 Las referencias a "V_H" o un "VH" se refieren a una región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluyen una Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a "V_L" o una "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, que incluyen una Fv, scF, dsFv o Fab

40 La frase "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a un anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas se han unido para formar una cadena. Típicamente, se inserta un péptido enlazador entre las dos cadenas para permitir el plegamiento apropiado y la creación de un sitio de unión activo.

45 El término "péptido enlazador" incluye la referencia a un péptido dentro de un fragmento de unión del anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fv), que sirve para unir indirectamente el dominio variable de la cadena pesada al dominio variable de la cadena ligera.

50 El término "anticuerpo parental" se refiere a cualquier anticuerpo de interés que ha de mutarse o variarse para obtener anticuerpos o fragmentos de estos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo parental, pero con mayor afinidad.

55 El término "punto caliente" se refiere a una porción de una secuencia de nucleótidos de una CDR o de una región marco de un dominio variable que es un sitio con una variación natural particularmente elevada. Aunque las propias CDR se consideran regiones hipervariables, se ha aprendido que las mutaciones no están distribuidas uniformemente a través de las CDR. Determinados sitios, o puntos calientes, se han identificado como estos lugares que experimentan

- mutaciones concentradas. Los puntos calientes se caracterizan por un número de características estructurales y secuencias. Estos "motivos de puntos calientes" pueden usarse para identificar puntos calientes. Dos motivos de secuencias consenso que están especialmente bien caracterizados son la secuencia tetranucleotídica RGYW (sec. con núm. de ident.:33) y la secuencia de serina AGY (sec. con núm. de ident.:34), donde R es A o G, Y es C o T, y W es A o T.
- Una "porción de direccionamiento" es la porción de un inmunoconjugado destinada a dirigir el inmunoconjugado a una célula de interés. Típicamente, la porción de direccionamiento es un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo que conserva la capacidad de reconocimiento del antígeno, tal como un scFv, un dsFv, un Fab, o un F(ab')₂.
- Típicamente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y una ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones se conocen además como "dominios"). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, denominadas además "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Se ha definido la extensión de la región marco y las CDR. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir las regiones marco combinadas de las cadenas constituyentes ligera y pesada, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.
- Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente como CDR1, CDR2, y CDR3, se enumeran secuencialmente empezando del extremo N-terminal, y además se identifican típicamente por la cadena en la que se localiza la CDR particular. Por lo tanto, una CDR3 V_H se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en que se encuentra, mientras que una CDR1 V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en que se encuentra.
- La frase "enlace disulfuro" o "enlace disulfuro cisteína-cisteína" se refiere a una interacción covalente entre dos cisteínas en que los átomos de azufre de las cisteínas se oxidan para formar un enlace disulfuro. La energía de enlace media de un enlace disulfuro es aproximadamente 60 kcal/mol en comparación con 1-2 kcal/mol para un enlace de hidrógeno.
- La frase "Fv estabilizado con disulfuro" o "dsFv" se refiere a la región variable de una inmunoglobulina en la que hay un enlace disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada. En el contexto de esta invención, las cisteínas que forman el enlace disulfuro están dentro de las regiones marco de las cadenas del anticuerpo y sirven para estabilizar la conformación del anticuerpo. Típicamente, el anticuerpo se diseña para introducir cisteínas en la región marco en posiciones donde la sustitución no interfiera con la unión al antígeno.
- Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede generarse por métodos recombinantes tales como selección de genotecas de anticuerpos recombinantes en fago o vectores similares, ver, por ejemplo, Huse y otros, Science, 246:1275-1281 (1989); Ward, y otros, Nature, 341:544-546 (1989); y Vaughan, y otros, Nature Biotech., 14:309-314 (1996), o mediante inmunización de un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno.
- Una "porción tóxica" es la porción de una inmunotoxina que genera la inmunotoxina citotóxica para las células de interés.
- Una "porción terapéutica" es la porción de un inmunoconjugado destinada a actuar como un agente terapéutico.
- El término "agente terapéutico" incluye cualquier número de compuestos conocidos actualmente o desarrollados posteriormente para actuar como antineoplásicos, antiinflamatorios, citocinas, antiinfecciosos, activadores o inhibidores enzimáticos, modificadores alostéricos, antibióticos u otros agentes administrados para inducir un efecto terapéutico deseado en un paciente. El agente terapéutico puede ser además una toxina o un radioisótopo, donde el efecto terapéutico deseado es, por ejemplo, la muerte de una célula cancerosa.
- Un "marcador detectable" se refiere a, con respecto a un inmunoconjugado, una porción del inmunoconjugado que tiene una propiedad que produce que su presencia sea detectable. Por ejemplo, el inmunoconjugado puede estar marcado con un isótopo radioactivo que permite detectar células en las que está presente el inmunoconjugado en ensayos inmunohistoquímicos.
- El término "porción efectora" se refiere a la porción de un inmunoconjugado destinada a tener un efecto sobre una célula dirigida por la porción de direccionamiento o para identificar la presencia del inmunoconjugado. Por lo tanto, la porción efectora puede ser, por ejemplo, una porción terapéutica, una toxina, un radiomarcador o un marcador fluorescente.
- El término "inmunoconjugado" incluye la referencia a una unión covalente de una molécula efectora a un anticuerpo. La molécula efectora puede ser una toxina.
- Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad eficaz para" o "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye la referencia a una dosificación de un agente terapéutico suficiente para producir un resultado deseado, tal como inhibir la síntesis de proteínas de una célula en al menos 50 %, o matar la célula.

5 El término "toxina" incluye la referencia a abrina, ricina, exotoxina A de *Pseudomonas* (PE), toxina de la difteria (DT), toxina botulínica, o toxinas modificadas de estas. Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que normalmente provocan la muerte por toxicidad hepática. Sin embargo, PE y DT típicamente se modifican para su uso como una inmunotoxina al eliminar el componente de direccionamiento nativo de la toxina (por ejemplo, el dominio la de PE o la cadena B de DT) y reemplazarlo con una porción de direccionamiento diferente, tal como un anticuerpo.

El término "poner en contacto" incluye la referencia a la colocación en asociación física directa.

10 Un "plásmido de expresión" comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de interés, que está unida operativamente a un promotor.

15 Como se usa en la presente, "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente e incluyen una referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como también a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los términos se aplican además a polímeros que contienen sustituciones conservativas de aminoácidos de manera que la proteína permanece funcional.

20 El término "residuo" o "residuo de aminoácido" o "aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido (colectivamente "péptido"). El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural y, a menos que se limite de cualquier otra manera, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los aminoácidos de origen natural.

25 Los aminoácidos y análogos referidos en la presente se describen mediante denominaciones abreviadas de la siguiente manera en la Tabla A:

Tabla A: Nomenclatura de aminoácidos

Nombre	3-letras	1-letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Homoserina	Hse	-
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	MET	M
Metionina sulfóxido	Met (O)	-
Metionina metilsulfonio	Met (S-Me)	-
Norleucina	Nle	-
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W

Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

5

Una "sustitución conservativa", cuando se describe una proteína, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera sustancialmente la actividad de la proteína. Por lo tanto "variaciones modificadas de manera conservativa" de una secuencia de aminoácidos particular se refiere a sustituciones de aminoácidos de esos aminoácidos que no son críticos para la actividad de la proteína o a la sustitución de aminoácidos con otros aminoácidos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácido, básico, cargado positivamente o negativamente, polar o no polar, etc.) de manera que las sustituciones de incluso los aminoácidos críticos no alteran sustancialmente la actividad. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen en la materia. Cada uno de los siguientes seis grupos en la Tabla B contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

10

15

TABLA B

20

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); y
6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).
Ver además, Creighton, <i>Proteins: Structures and Molecular Properties</i> , W.H.
Freeman and Company, Nueva York (2o. Ed., 1992).

25

30

35

El término "sustancialmente similar" en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos 90 %, preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina por la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, interrupciones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que el residuo de aminoácido o de base de ácido nucleico idéntico ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

40

45

Los términos "adherir", "conjugar", "unir", "enlazar" o "vincular" se refieren a producir dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua. En el contexto de la presente invención, los términos incluyen la referencia a unir una porción de anticuerpo a una PE de la invención. La unión puede ser por medios químicos o recombinantes. Los medios químicos se refieren a una reacción entre la porción del anticuerpo y la molécula de PE de manera que se forma un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula.

50

Como se usa en la presente, "recombinante" incluye la referencia a una proteína producida con el uso de células que no tienen, en su estado nativo, una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante porque se han alterado genéticamente mediante la introducción de la secuencia de ácido nucleico aislada adecuada. El término incluye además la referencia a una célula, o ácido nucleico, o vector, que se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la alteración de un ácido nucleico nativo a una forma no nativa de esa célula, o que la célula se deriva de una célula así modificada. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, expresa mutantes de genes que se encuentran dentro de la forma nativa, o expresa los genes nativos que de cualquier otra forma se expresan anormalmente, se expresan por debajo o no se expresan en absoluto.

55

60

Como se usa en la presente, "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" incluye la referencia a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono- o bicatenaria, y a menos que se limite de cualquier otra manera, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan con ácidos nucleicos de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de cualquier otra manera, una secuencia de ácido nucleico

65

particular incluye la secuencia complementaria de ésta así como también las variantes conservativas, es decir los ácidos nucleicos presentes en posiciones vacilantes de codones y variantes que, cuando se traducen en una proteína, resultan en una sustitución conservativa de un aminoácido.

5 Como se usa en la presente, "codificar" con respecto a un ácido nucleico especificado, incluye la referencia a ácidos nucleicos que comprenden la información para su traducción en la proteína especificada. La información se especifica mediante el uso de codones. Típicamente, la secuencia de aminoácidos se codifica por el ácido nucleico mediante el uso del código genético "universal". Sin embargo, las variantes del código universal, tal como la que está presente en algunas mitocondrias de plantas, animales, y hongos, en la bacteria *Mycoplasma capricolum* (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82:2306-2309 (1985)), o el ciliado *Macronucleus*, pueden usarse cuando el ácido nucleico se expresa mediante el uso de la maquinaria de traducción de estos organismos.

10 La frase "fusión en el marco" se refiere a unir dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de manera que la secuencia de ácido nucleico unida se traduce en una proteína de cadena única que comprende las cadenas polipeptídicas originales.

15 Como se usa en la presente, "expresado" incluye la referencia a la traducción de un ácido nucleico a una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o secretarse a la matriz o medio extracelular.

20 Por "célula huésped" se entiende una célula que puede soportar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huéspedes pueden ser células procariotas tal como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibio, o mamífero.

25 La frase "genoteca de presentación en fagos" se refiere a una población de bacteriófagos, cada uno de los cuales contiene un ADNc foráneo fusionado de manera recombinante en el marco a una proteína de la superficie. El fago muestra la proteína foránea codificada por el ADNc en su superficie. Después de la replicación en un huésped bacteriano, típicamente *E. coli*, los fagos que contienen el ADNc de interés foráneo se seleccionan por la expresión de la proteína foránea en la superficie del fago.

30 Los términos "idéntico" o por ciento de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida con el uso de uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

35 La frase "sustancialmente idénticos", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 60 %, con mayor preferencia 65 %, aún con mayor preferencia 70 %, aún con mayor preferencia 75 %, aún con mayor preferencia 80 %, y con la máxima preferencia 90-95 % de identidad de nucleótidos o residuos de aminoácidos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida con el uso de uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial existe sobre una región de las secuencias que es de al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, con mayor preferencia sobre una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y con la máxima preferencia las secuencias son sustancialmente idénticas en al menos aproximadamente 150 residuos. En una modalidad más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las regiones codificantes.

40 Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, si es necesario se designan coordenadas posteriores, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba(s) con relación a la secuencia de referencia, basado en los parámetros de programa designados.

45 El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch, J Mol. Biol., 48:443 (1970), por la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (ver generalmente, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y otros eds., Current Protocols, una asociación entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

50 Ejemplos de algoritmos que son apropiados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y otros, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990) y Altschuel y otros Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1977), respectivamente. El programa informático para

realizar análisis con BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) (disponible en Internet en "http://www.ncbi.seguido por "nlm.nih.gov/"). Este algoritmo incluye primero identificar los pares de secuencia con puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que coincide o satisface algunas puntuaciones T umbrales de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul y otros, arriba). Estas coincidencias de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, hasta alcanzar un punto en el cual la puntuación de alineamiento acumulado no aumente más. Los registros acumulativos se calculan por medio del uso de, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes: siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular el registro acumulativo. Las extensiones de los aciertos de las palabras vecinas en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en una cantidad X desde su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para las secuencias nucleotídicas) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915 (1989)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de la secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. Estados Unidos, 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con que dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos coincidan al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación entre el ácido nucleico del ensayo y uno de referencia es menor de aproximadamente 0.1, con más preferencia si es menor de aproximadamente 0.01 y con mayor preferencia si es menor de aproximadamente 0.001.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más abajo. Por lo tanto, típicamente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe más abajo.

El término "*in vivo*" incluye la referencia al interior del cuerpo del organismo del que se obtuvo la célula. "*Ex vivo*" e "*in vitro*" significan fuera del cuerpo del organismo del que se obtuvo la célula.

Las frases "célula maligna" o "neoplasia maligna" se refieren a tumores o células tumorales que son invasivas y/o capaces de experimentar metástasis, es decir, una célula cancerosa.

Como se usa en la presente, "células de mamífero" incluye la referencia a células derivadas de mamíferos que incluyen seres humanos, ratas, ratones, conejillos de Indias, chimpancés, o macacos. Las células pueden cultivarse *in vivo* o *in vitro*.

El término "selectivamente reactivo" se refiere, con respecto a un antígeno, a la asociación preferencial de un anticuerpo, en su totalidad o en parte, con una célula o tejido que porta ese antígeno y no a células o tejidos que carecen de ese antígeno. Por supuesto, se reconoce que puede producirse un cierto grado de interacción inespecífica entre una molécula y una célula o tejido no objetivos. Sin embargo, la reactividad selectiva, puede distinguirse por estar mediada a través de un reconocimiento específico del antígeno. Aunque los anticuerpos selectivamente reactivos se unen al antígeno, pueden hacerlo con baja afinidad. Por otra parte, la unión específica resulta en una asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo y las células que portan el antígeno que entre el anticuerpo unido y las células que carecen del antígeno. La unión específica resulta típicamente en un aumento mayor que 2 veces, preferentemente mayor que 5 veces, con mayor preferencia mayor que 10 veces y con la máxima preferencia mayor que 100 veces en la cantidad de anticuerpo unido (por unidad de tiempo) a una célula o tejido que porta un antígeno objetivo en comparación con una célula o tejido que carece del antígeno objetivo. La unión específica a una proteína bajo tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína particular. Una variedad de formatos de inmunoensayos son apropiados para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Ver Harlow & Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de los formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar la inmunoreactividad específica.

El término "condiciones inmunológicamente reactivas" incluye la referencia a las condiciones que permiten que un

anticuerpo generado para un epítipo particular se une a ese epítipo en un grado detectablemente mayor que, y/o en exclusión sustancial de, la unión a sustancialmente todos los otros epítipos. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión del anticuerpo y típicamente son las usadas en los protocolos de inmunoensayos o aquellas condiciones que se encuentran *in vivo*. Ver Harlow & Lane, *arriba*, para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayos. Preferentemente, las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los métodos de la presente invención son "condiciones fisiológicas", que incluyen referencia a condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas dentro de un mamífero vivo o una célula de mamífero. Aunque se reconoce que algunos órganos están sometidos a condiciones extremas, el ambiente dentro del organismo y el intracelular normalmente se encuentra alrededor de pH 7 (es decir, de pH 6.0 a pH 8.0, más típicamente de pH 6.5 a 7.5), contiene agua como el disolvente predominante, y existe a una temperatura por encima de 0°C y por debajo de 50°C. La osmolaridad está dentro del intervalo que soporta la viabilidad y la proliferación celular.

Exotoxina A de *pseudomonas*

La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, la que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas. La secuencia de la PE nativa (sec. con núm. de ident.:1) es bien conocida y se expone, por ejemplo, en la sec. con núm. de ident.:1 de la patente de los Estados Unidos núm. 5,602,095. El método de acción es la inactivación de la ADP ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2).

La PE se ha estudiado por más de 20 años para su uso como un agente terapéutico. La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan concertadamente para provocar citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) media la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la traslocación en el citosol y dominio III (aminoácidos 400-613) media la ADP ribosilación del factor 2 de elongación. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) permanece sin definir, aunque se conoce que una gran parte de este, los aminoácidos 365-380, puede suprimirse sin pérdida de la citotoxicidad. Ver Siegall y otros, *J Biol Chem*, 264:14256-14261 (1989).

Los términos "exotoxina de *Pseudomonas*" y "PE" como se usan en la presente se refieren típicamente a una PE que se ha modificado a partir de la proteína nativa para reducir la unión y la captación a través de LRP1/CD91 (el receptor de la superficie celular que se une a la toxina en toda su extensión), para eliminar los problemas de plegamiento, o para reducir la toxicidad inespecífica. Muchas de dichas modificaciones son conocidas en la materia e incluyen, pero sin limitarse a, la eliminación del dominio Ia, varias deleciones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de un sólo aminoácido y la adición de una o más secuencias en el carboxilo terminal tales como KDEL (sec. con núm. de ident.:2) y REDL (sec. con núm. de ident.:3). Ver Siegall y otros, *arriba*. Los fragmentos citotóxicos de la PE incluyen los que son citotóxicos con o sin procesamiento proteolítico u otro posterior en la célula objetivo (por ejemplo, como una proteína o pre-proteína).

Ciertos fragmentos citotóxicos de la PE son conocidos en la materia y frecuentemente se refieren por el peso molecular del fragmento, que designa para el experto en la materia la composición particular del fragmento de PE. Por ejemplo, PE40 fue uno de los primeros fragmentos que se estudió y se usó como la porción tóxica de las inmunotoxinas. El término designa una forma truncada de la PE en la que el dominio I, el dominio responsable de la unión inespecífica. Ver, por ejemplo, Pai y otros, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 88:3358-3362 (1991); y Kondo y otros, *J. Biol. Chem.*, 263:9470-9475 (1988). La eliminación de la unión inespecífica, sin embargo, puede lograrse también al mutar ciertos residuos del dominio Ia. La patente de los Estados Unidos 5,512,658, por ejemplo, describe que una PE mutada en la que el dominio Ia está presente pero en la que los residuos básicos del dominio Ia en las posiciones 57, 246, 247, y 249 están reemplazados con residuos ácidos (ácido glutámico, o "E") exhibe citotoxicidad inespecífica muy disminuida. Esta forma mutante de PE se refiere a veces como "PE4E."

El término "PE38" se refiere a un fragmento citotóxico de PE compuesto de los aminoácidos 253-364 y 381-613 de la PE y que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kD. Contiene los dominios de ribosilación ADP y de translocación de PE, pero no la porción de unión a células (Hwang J. y otros, *Cell*, 48:129-136 (1987)). PE38 es una proteína que se activa a su forma citotóxica tras el procesamiento dentro de una célula (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 5,608,039, y Pastan y otros, *Biochim. Biophys. Acta*, 1333:C1-C6 (1997)). La secuencia de PE38 es bien conocida en la materia, pero el profesional también puede determinarla fácilmente al sustraer los residuos indicados de la secuencia conocida de la PE. Los expertos estarán al tanto de que, debido a la degeneración del código genético, la secuencia de aminoácidos de PE38, de sus variantes, tales como PE38KDEL o PE38QQR, y de los otros derivados de la PE que se discuten en la presente puede codificarse por una gran variedad de secuencias de ácidos nucleicos, cualquiera de las cuales puede expresarse para resultar en el polipéptido deseado.

"PE35" es un fragmento carboxilo terminal de 35 kD de la PE en el que se han suprimido los residuos de aminoácidos 1-279 y la molécula comienza con una metionina en la posición 280, seguida de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de la PE nativa. PE35 y PE40 se describen en las patentes de los Estados Unidos 5,602,095 y 4,892,827.

Los estudios determinaron además que las mutaciones de los residuos terminales de PE, REDLK (sec. con núm. de ident.:5, residuos 609-613) podrían variarse en maneras que aumentarían la citotoxicidad del mutante resultante. Por ejemplo, las inmunotoxinas producidas con PE mutadas que terminan en las secuencias KDEL (sec. con núm. de

ident.:2), REEL (sec. con núm. de ident.:32) o RDEL (sec. con núm. de ident.:3) fueron mucho más citotóxicas para las células objetivo que inmunotoxinas similares producidas con PE38 que contienen la secuencia terminal nativa. Ver, Kreitman y Pastan, *Biochem J*, 307(Pt 1):29-37 (1995). Repeticiones de estas secuencias también se pueden utilizar. Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5,854,044; 5,821,238; y 5,602,095 y la publicación internacional WO 99/51643. Aunque las PE que terminan en KDEL (sec. con núm. de ident.:2) son útiles para propósitos *in vitro*, han probado tener toxicidad inespecífica en animales y se prefieren menos para el uso *in vivo*.

En una modalidad preferida, el fragmento citotóxico de PE conserva al menos aproximadamente 10 %, preferentemente al menos aproximadamente 40 %, con mayor preferencia aproximadamente 50 %, aún con mayor preferencia 75 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 %, y aún con mayor preferencia 95 % de la citotoxicidad de PE38. En modalidades particularmente preferidas, el fragmento citotóxico tiene al menos la citotoxicidad de PE38, y preferentemente tiene más.

A. Variantes de PE conservativamente modificadas

Se entiende que la secuencia de la PE nativa y las variantes discutidas anteriormente pueden tener sustituciones conservativas y conservar la capacidad citotóxica y, de manera deseable, tener antigenicidad reducida en comparación con la secuencia nativa de PE. En modalidades preferidas, las variantes modificadas de PE o fragmentos citotóxicos de esta tienen al menos 80 % de similitud de secuencia, preferentemente al menos 85 % de similitud de secuencia, con mayor preferencia al menos 90 % de similitud de secuencia, y con la máxima preferencia al menos 95 % de similitud de secuencia a nivel de aminoácidos, con la PE de interés, tal como PE38.

El término "variantes conservativamente modificadas" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes conservativamente modificadas se refiere a aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o si el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias de ácido nucleico prácticamente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina mediante un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente descripción que codifica un polipéptido además describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Alguien con experiencia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, y TGG, que son ordinariamente los únicos codones para metionina y triptófano, respectivamente) se pueden modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, alguien con experiencia reconocerá que las sustituciones individuales, supresiones o adiciones a una secuencia de ácido nucleico, péptido polipéptido, o secuencia de proteína que altera, añade o suprime un único aminoácido o un pequeño por ciento de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora" donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

B. Ensayo para la citotoxicidad o antigenicidad de la PE

Las exotoxinas de *Pseudomonas* empleadas en la invención pueden ensayarse para el nivel deseado de citotoxicidad mediante ensayos bien conocidos para aquellos con experiencia en la materia. Por lo tanto, los fragmentos citotóxicos de PE y las variantes conservativamente modificadas de tales fragmentos pueden ensayarse fácilmente para la citotoxicidad. Un gran número de moléculas de PE candidatas pueden ensayarse simultáneamente para la citotoxicidad mediante métodos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, subgrupos de moléculas candidatas pueden ensayarse para la citotoxicidad. Los subgrupos de las moléculas candidatas que reaccionan positivamente pueden subdividirse continuamente y reensayarse hasta identificar el(los) fragmento(s) citotóxico(s) deseado(s). Dichos métodos permiten el tamizaje rápido de gran número de fragmentos citotóxicos o variantes conservativas de PE. La antigenicidad puede ensayarse mediante, por ejemplo, los métodos que se enseñan en los Ejemplos en la presente.

C. Conjugación a una molécula de direccionamiento

En modalidades no recombinantes de la invención, una molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo, se une a una molécula de PE de la presente invención mediante el uso de cualquier número de medios conocidos para aquellos con experiencia en la materia. Los medios de unión covalente y no covalente pueden usarse con moléculas de PE de la presente invención. El procedimiento para unir una molécula de PE a un anticuerpo u otra molécula de direccionamiento ("TM") variará de acuerdo con la estructura química de la TM. Los polipéptidos contienen típicamente una variedad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH), amino libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo, por ejemplo, para resultar en la unión de la molécula de PE.

Alternativamente, el anticuerpo u otra TM se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquier número de moléculas enlazadoras, tales como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

Producción de inmunoconjugados

Los inmunoconjugados de la invención incluyen moléculas en las que existe una unión covalente de una molécula de PE a un anticuerpo u otro agente de direccionamiento. La elección de un agente de direccionamiento en particular depende de la célula objetivo particular. Con las moléculas de PE que se proporcionan en la presente, alguien con experiencia puede construir fácilmente una variedad de clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en la secuencia pero que codifican la misma secuencia de PE y de anticuerpo. Por lo tanto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican conjugados de anticuerpos y PE y proteínas de fusión de estos.

A. Métodos recombinantes

Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método adecuado que incluye, por ejemplo, la clonación de secuencias adecuadas o mediante la síntesis química directa por métodos tales como el método del fosfotriéster de Narang y otros, *Meth. Enzymol.*, 68:90-99 (1979); el método del fosfodiéster de Brown y otros, *Meth. Enzymol.*, 68:109-151 (1979); el método de dietilfosforamidita de Beaucage y otros, *Tetra. Lett.*, 22:1859-1862 (1981); el método del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage & Caruthers, *Tetra. Letts.*, 22(20):1859-1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado como se describe en, por ejemplo, Needham-VanDevanter y otros, *Nucl. Acids Res.*, 12:6159-6168 (1984); y, el método de soporte sólido de la patente de los Estados Unidos núm. 4,458,066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Esta se puede convertir en ADN de doble cadena por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con un ADN polimerasa por medio del uso de la cadena sencilla como un patrón. Una persona experta reconocerá que mientras que la síntesis química de ADN se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas por ligadura de secuencias más cortas.

En una modalidad preferida, las secuencias de ácidos nucleicos de esta invención se preparan mediante técnicas de clonación. Los ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación adecuadas, e instrucciones suficientes para dirigir a las personas de experiencia a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Sambrook y otros, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (2o. End.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Berger and Kimmel (eds.), *GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES*, Academic Press, Inc., San Diego CA (1987), o Ausubel y otros (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY (1987). La información sobre el producto de los fabricantes de reactivos biológicos y equipo experimental también proporcionan información útil. Dichos fabricantes incluyen la compañía química SIGMA (Saint Louis, MO), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen, San Diego, CA, y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por los expertos.

Los ácidos nucleicos que codifican la PE nativa pueden modificarse además para formar los inmunoconjugados de la presente invención. La modificación por mutagénesis dirigida al sitio es bien conocida en la materia. Los ácidos nucleicos que codifican la PE pueden amplificarse mediante métodos *in vitro*. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia auto-sostenido (3SR). Una amplia variedad de métodos de clonación, células huésped, y metodologías de amplificación *in vitro* es bien conocida para las personas con experiencia.

En una modalidad preferida, los inmunoconjugados se preparan mediante la inserción del ADNc que codifica un anticuerpo u otra TM de elección en un vector que comprende el ADNc que codifica una PE deseada de la invención. La inserción se hace de manera que el agente de direccionamiento (para facilitar la discusión, la discusión en la presente asumirá que el agente de direccionamiento es un Fv, aunque otros agentes de direccionamiento podrían sustituirse con igual efecto) y la PE se leen en marco, es decir en un polipéptido continuo que contiene una región Fv funcional y una región PE funcional. En una modalidad particularmente preferida, el ADNc que codifica una PE de la invención se liga a un scFv de manera que la toxina se localiza en el carboxilo terminal del scFv. En otras modalidades preferidas, el ADNc que codifica una PE de la invención se liga a un scFv de manera que la toxina se localiza en el amino terminal del scFv.

Una vez que los ácidos nucleicos que codifican una PE, anticuerpo, o un inmunoconjugado de la presente invención se aíslan y clonan, se puede expresar la proteína deseada en una célula modificada genéticamente de manera recombinante tales como células de bacterias, plantas, levaduras, insectos y mamíferos. Se espera que aquellos con experiencia en la materia sean conocedores de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas que incluyen *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levaduras, y varias células eucariotas superiores tales

como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y de mieloma. No se intentará describir en detalle los varios métodos conocidos para la expresión de proteínas en procariotas o eucariotas. Brevemente, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican las proteínas aisladas de la invención se logrará típicamente al unir operativamente el ADN o ADNc a un promotor (que es constitutivo o inducible), seguido de la incorporación en un casete de expresión. Los casetes pueden ser adecuados para la replicación e integración ya sea en procariotas o eucariotas. Los casetes de expresión típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación, y promotores útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Para obtener elevados niveles de expresión de un gen clonado, se prefiere construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción, y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli* esto incluye un promotor tal como los promotores T7, trp, lac, o lambda, un sitio de unión al ribosoma y preferentemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y preferentemente un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias de empalme donantes yceptoras. Los casetes que incorporan los ácidos nucleicos de la invención pueden transferirse a la célula huésped elegida mediante métodos bien conocidos tales como transformación con cloruro cálcico o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato cálcico, electroporación o lipofección para células de mamífero. Las células transformadas por los casetes pueden seleccionarse por resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los casetes, tales como los genes amp, gpt, neo e hyg.

Alguien con experiencia reconocerá que pueden hacerse modificaciones a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención (es decir, PE o un inmunoconjugado formado a partir de una PE de la invención) sin disminuir su actividad biológica. Algunas modificaciones pueden hacerse para facilitar la clonación, expresión, o incorporación de la molécula de direccionamiento en una proteína de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas para aquellos con experiencia en la materia e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina adicionada en el amino terminal para proporcionar un sitio de iniciación, aminoácidos adicionales colocados en cualquier terminal para crear sitios de restricción localizados convenientemente, o aminoácidos adicionales (tales como poli His) para ayudar en las etapas de purificación.

Además de los métodos recombinantes, los inmunoconjugados y las PE de la presente invención pueden construirse además en su totalidad o en parte mediante el uso de la síntesis de péptidos estándar. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de la presente invención de menos que aproximadamente 50 aminoácidos en longitud puede lograrse al unir el aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen por Barany & Merrifield, THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY. VOL. 2: SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS, PARTE A, págs. 3-284; Merrifield y otros, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156 (1963), y Stewart y otros, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2DA ED., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Las proteínas de mayor longitud pueden sintetizarse mediante la condensación de los terminales amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Los métodos de formación de enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo carboxilo terminal (por ejemplo, mediante el uso del reactivo de acoplamiento N, N'-diciclohexilcarbodiimida) son conocidos para aquellos con experiencia.

B. Purificación

Una vez expresados, los inmunoconjugados y las PE recombinantes de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la materia, que incluyen precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, y similares (ver, generalmente, R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Se prefieren las composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95 % de homogeneidad, y las de 98 a 99 % o más de homogeneidad son las de máxima preferencia para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o a la homogeneidad según se desee, si van a usarse de manera terapéutica, los polipéptidos deben estar sustancialmente libres de endotoxina.

Los métodos para la expresión de anticuerpos de cadena sencilla y/o la renaturalización a una forma activa adecuada, que incluye anticuerpos de cadena sencilla, a partir de bacterias tales como *E. coli* se han descrito y son bien conocidos y son aplicables a los anticuerpos de esta invención. Ver, Buchner y otros, Anal. Biochem., 205:263-270 (1992); Pluckthun, Biotechnology, 9:545 (1991); Huse y otros, Science, 246:1275 (1989) y Ward y otros, Nature, 341:544 (1989).

Frecuentemente, proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otra bacteria se aíslan a partir de cuerpos de inclusión y requieren solubilización mediante el uso de desnaturalizantes fuertes, y posterior renaturalización. Durante la etapa de solubilización, como es bien conocido en la materia, debe estar presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un amortiguador ilustrativo con un agente reductor es: 0.1 M de Tris pH 8, 6 M de guanidina, 2 mM de EDTA, 0.3 M de DTE (ditiocritrol). La reoxidación de los enlaces disulfuro puede producirse en presencia de reactivos tiol de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena y otros, Biochemistry, 9: 5015-5021 (1970), y especialmente como se describe por Buchner y otros, *arriba*.

La renaturalización se logra típicamente mediante la dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida en un amortiguador de renaturalización. Un amortiguador ilustrativo es 0.1 M de Tris, pH 8.0, 0.5 M de L-arginina, 8 mM de glutatión oxidado, y 2 mM de EDTA.

5 Como una modificación al protocolo de purificación de anticuerpos de dos cadenas, las regiones de cadena pesada y ligera se solubilizan y se reducen por separado y después se combinan en la solución de renaturalización. Un rendimiento preferido se obtiene cuando estas dos proteínas se mezclan en una relación molar de tal manera que no sobrepasa un exceso molar de 5 veces de una proteína sobre la otra. Se prefiere adicionar glutatión oxidado en exceso u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular a la solución de renaturalización después de completar el intercambio redox.

10 Composiciones farmacéuticas y administración

Las composiciones de inmunoconjugados de esta invención (es decir, PE unida a un anticuerpo u otro agente de direccionamiento) son particularmente útiles para la administración parenteral, tal como la administración intravenosa o la administración en una cavidad corporal.

15 Las composiciones para la administración comprenderán comúnmente una solución del anticuerpo y/o inmunoconjugado disuelto en un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente un portador acuoso. Puede usarse una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, solución salina amortiguada y similares. Estas soluciones son estériles y, generalmente, libres de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes amortiguadores y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de la proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente sobre la base de los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del paciente.

25 Por lo tanto, una composición típica que comprende una inmunotoxina de la presente invención para la administración intravenosa sería aproximadamente 0.1 a 10 mg por paciente por día. Dosis de 0.1 a aproximadamente 100 mg por paciente por día pueden usarse. Los métodos presentes para preparar composiciones administrables se conocen o son evidentes a aquellos con experiencia en la en la técnica y se describen con más detalles en publicaciones como REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 19^{no} ED., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1995).

30 Las composiciones que comprenden las inmunotoxinas de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la severidad de la enfermedad y el estado general de salud del paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es aquella que proporciona ya sea alivio subjetivo de un(os) síntoma(s) o una mejoría objetivamente identificable notada por el clínico u otro observador calificado.

35 Administraciones únicas o múltiples de las composiciones se administran en dependencia de la dosificación y la frecuencia según lo requiera y tolere el paciente. En cualquier caso, la composición deberá proporcionar una cantidad suficiente de las proteínas de esta invención para tratar eficazmente al paciente. Preferentemente, la dosificación se administra una vez pero puede aplicarse periódicamente hasta lograr un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifiquen la interrupción de la terapia. Generalmente, la dosis es suficiente para tratar o mejorar síntomas o signos de enfermedad sin producir toxicidad inaceptable al paciente.

40 Las formulaciones parenterales de liberación controlada de composiciones que comprenden los inmunoconjugados de la presente invención pueden producirse como implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas particulados. Para una visión general de los sistemas de suministro de proteínas ver, Banga, A.J., THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas el agente terapéutico se dispersa por toda la partícula. Partículas, microesferas y microcápsulas más pequeñas que aproximadamente 1 micra se conocen generalmente como nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 micras de manera que sólo las nanopartículas se administran intravenosamente. Las micropartículas son típicamente alrededor de 100 micras de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Ver, por ejemplo, Kreuter J., COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, págs. 219-342 (1994); y Tice & Tabibi, TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, págs. 315-339 (1992).

45 Se pueden usar polímeros para la liberación controlada por iones de composiciones de inmunoconjugados de la presente invención. Varias matrices poliméricas degradables y no degradables para el uso en el suministro controlado de fármacos son conocidas en la materia (Langer R., Accounts Chem. Res., 26:537-542 (1993)). Por ejemplo, el copolímero de bloque, polaxámero 407 existe como un líquido viscoso pero móvil a temperaturas bajas pero forma un

gel semisólido a la temperatura corporal. Ha demostrado ser un vehículo eficaz para la formulación y el suministro sostenido de interleucina-2 y ureasa recombinantes (Johnston y otros, Pharm. Res., 9:425-434 (1992); y Pec y otros, J. Parent. Sci. Tech., 44(2):58-65 (1990)). Alternativamente, la hidroxiapatita se ha usado como un microportador para la liberación controlada de proteínas (Ijntema y otros, Int. J. Pharm., 112:215-224 (1994)). En otro aspecto, los liposomas se usan para la liberación controlada, así como para dirigir el fármaco del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri y otros, LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas. Ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos núms. 5,055,303, 5,188,837, 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, 4,957,735 y 5,019,369, 5,055,303; 5,514,670; 5,413,797; 5,268,164; 5,004,697; 4,902,505; 5,506,206, 5,271,961; 5,254,342 y 5,534,496.

Entre los varios usos de las inmunotoxinas de la presente invención se incluyen una variedad de condiciones de enfermedad provocadas por células humanas específicas que pueden eliminarse mediante la acción tóxica de la proteína de fusión.

Usos *in vitro*

Además se describen en la presente estuches para eliminar células objetivo *in vitro* o *ex vivo* mediante el uso de las PE de la invención. Por ejemplo, las inmunotoxinas que comprenden una PE de la invención pueden usarse para purgar las células objetivo de una población de células en un cultivo. Por lo tanto, por ejemplo, las células cultivadas a partir de un paciente que tiene un cáncer que expresa CD22 puede purgarse de células cancerosas al poner en contacto el cultivo con inmunotoxinas que usan anticuerpos anti-CD22 como una porción de direccionamiento.

En algunos casos, las células objetivo pueden estar contenidas dentro de una muestra biológica. Una "muestra biológica" como se usa en la presente es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene células objetivo y células que no son objetivo. Dichas muestras incluyen, pero sin limitarse a, tejido de biopsia, sangre, y células de la sangre (por ejemplo, glóbulos blancos). Una muestra biológica se obtiene típicamente a partir de un eucariota multicelular, preferentemente un mamífero tal como rata, ratón, vaca, perro, conejillo de indias, o conejo, y con mayor preferencia un primate, tal como un macaco, chimpancé, o ser humano. Con la máxima preferencia, la muestra es de un ser humano.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este Ejemplo expone los materiales y métodos usados en algunos de los estudios en los que se basa la presente invención.

Preparación lisosomal de células Raji

Células Raji de linfoma de Burkitt ($1-3 \times 10^8$) se recolectaron, se lavaron dos veces en PBS frío, una vez en amortiguador de homogenización (250 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA) y se resuspendieron en 2 ml de amortiguador de homogenización. Las células en suspensión se lisaron mediante cavitación con nitrógeno con una bomba de ruptura de células de 45 ml (Parr Instrument Company, Moline, IL) se enfriaron a 4°C y se presurizaron con gas nitrógeno a 150-200 psi durante 10 min. Las células rotas se centrifugaron a 800 x g durante 10 min. El sobrenadante postnuclear (capa intermedia) se eliminó y se dispuso en capas encima de 8.5 ml de solución PERCOLL® al 27 % se acomodó sobre una capa de 1.2 ml de amortiguador de homogenización 10X en un tubo de centrifuga Ultraclear Beckman de 16 x 76 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) y se centrifugó a 4°C en un rotor Beckman tipo 50 Ti durante 1h a 36,000 x g. Las fracciones del gradiente de PERCOLL® se recolectaron y después se ensayaron individualmente para la actividad β -hexosaminidasa como se describe (Schaub, B.E. y otros, Curr Protoc Cell Biol, 15:8.1-8.12 (2005)). Las fracciones con actividades máximas se agruparon, se transfirieron a tubos de policarbonato de paredes gruesas de 13 x 51 mm, y se centrifugaron a 4 °C mediante el uso de un rotor S100 AT4-542 durante 30 min a 200,000 x g para eliminar el PERCOLL®. El sobrenadante se recolectó y se usó para digerir las inmunotoxinas.

Digestión de B3(dsFv)-PE38 con proteasas lisosomales y secuenciación del N-terminal de los fragmentos

Las proteasas lisosomales purificadas catepsina B, catepsina D, y catepsina S (EMD Biosciences, San Diego, CA), o la fracción lisosomal de células Raji se usaron para digerir la inmunotoxina B3(dsFv)-PE38. B3(dsFv)-PE38 (0.2 mg/ml) se incubó ya sea con 5 μ g/ml de las proteasas lisosomales catepsinas purificadas (catepsinas B, D, y S) o con 30 % (v/v) de la fracción lisosomal de células Raji a 37 °C en amortiguador que contiene 0.1 M de MES (pH 5.5), 150 mM de NaCl, 2 mM de DTT, 2 mM de EDTA, y 0.5 % de Tritón X-100. A intervalos de tiempo entre 0 y 60h después del inicio de la incubación, se retiraron alícuotas en amortiguador de muestra tris-glicina para SDS-PAGE y se incubaron a 85 °C durante 5 min. La mitad de cada muestra se analizó en un gel de acrilamida tris-glicina para proteínas Novex 4-20 % (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y se visualizó mediante el uso de la tinción de proteínas con azul Coomassie Microwave (Protiga Inc., Frederick, MD). La muestra restante se fraccionó por electroforesis en gel de la misma manera y después se electrotransfirió a membrana de PVDF (ProBlott; Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) en un amortiguador CAPC a 10 mM (pH 11) mediante el uso de una unidad de transferencia semiseca. Después de la transferencia la membrana se enjuagó brevemente con agua, se tiñó con azul Coomassie R-250 al 0.1 % en ácido

acético al 0.5 %/metanol al 40 % durante 2 min, y después se destiñó en metanol al 50 % en agua. Las bandas de proteínas se escindieron de la membrana y se analizaron mediante el uso de un secuenciador de proteínas automatizado Procise 494 cLC (Applied Biosystems, Inc.).

5 Mutaciones en HA22

Las mutaciones en HA22 se generaron mediante mutagénesis dirigida al sitio con Quikchange (Stratagene, La Jolla, CA) con iniciadores de mutagénesis de Lofstrand Labs Limited (Gaithersburg, MD).

10 Purificación de inmunotoxinas- Las inmunotoxinas se purificaron como se describe (Pastan, I. y otros, *Methods Mol Biol*, 248 : 503-518 (2004)), excepto que el glutatión oxidado, no reducido, se adicionó al amortiguador de renaturalización.

Líneas celulares

15 Se obtuvieron líneas celulares de linfoma de Burkitt humanas CD22-positivas (CA46, Daudi, Raji, y Ramos) de la Colección americana de cultivos tipo (Manassas, VA). La línea celular KOPN-8 ALL se obtuvo del Dr. Alan Wayne en el Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, MD). La línea celular WSU-CLL [que en realidad puede ser un derivado de la línea celular REH ALL (Drexler, H.G. y otros, *Leukemia*, 16:1868-1870 (2002))] se obtuvo del Dr. A. Al-Katib (Universidad Estatal de Wayne, Detroit, MI). Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C con 5 % de CO₂ en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 100 U de penicilina, y 100 µg de estreptomina (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Ensayos de citotoxicidad

25 La supervivencia celular de las líneas celulares tratadas con inmunotoxinas se midió mediante el ensayo WST-8 mediante el uso del estuche de conteo de células Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) esencialmente como se describe en el manual técnico. Brevemente, 10 000 células/pocillo se incubaron con la toxina en una placa de 96 pocillos (Pastan, I. y otros, *Methods Mol Biol*, 248:503-518 (2004)) durante 48-72h, luego de las cuales se adicionó el reactivo CCK-8 a los pocillos. Las placas se incubaron hasta que los pocillos con absorbancia máxima a 450 nm alcanzaron valores de ~1 de DO. Se usó ciclohexamida (10 µg/ml de concentración final) como un control para 100 % de muerte celular. Los valores se normalizaron entre los controles ciclohexamida y PBS/HSA (0.2 %) y se ajustaron a una ecuación sigmoide estándar de 4 parámetros con una pendiente variable mediante el uso del programa GraphPad PRISM® (v 2.00) (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) para obtener la concentración de inmunotoxina a la que hubo 50 % de muerte celular (IC₅₀). Las células de pacientes con CLL y HCL se ensayaron como se describió anteriormente (Kreitman, R.J. y otros, *Clin. Cancer Res.*, 6:1476-1487 (2000)). Brevemente, las células de leucemia se incubaron con inmunotoxinas recombinantes durante 3 días, después se trataron con ³H-leucina para evaluar la inhibición de la síntesis de proteínas o con WST-1 para evaluar la muerte celular.

40 Análisis Estadístico

Los valores de IC₅₀ de pares de ensayos de citotoxicidad apareados que analizan el efecto de HA22 y HA22-LR sobre la supervivencia de las líneas celulares Raji (n=10), Ramos (n=3), Daudi (n=3), CA46 (n=5), KOPN8 (n=3), y WSU-CLL (n=4) se compararon mediante el uso de una prueba t pareada, de dos colas.

45 Toxicidad inespecífica en ratón

50 Ratones hembras desnudos (5-6 semanas, 18-22 g) se inyectaron por vía intravenosa con una dosis única de 2.0 mg/kg de HA22 o HA22-LR en el intervalo de 2.5-20 mg/kg en 0.2 ml de PBS que contenía 0.2 % de HSA. Los ratones se observaron durante 10 días. Todos los procedimientos que involucran ratones se realizaron de acuerdo con las guías del Instituto Nacional de Salud según lo aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Nacional del Cáncer.

55 *Farmacocinética* - Nueve ratones Balb/c hembras se inyectaron en la vena de la cola con 10 µg de HA22 o HA22-LR en 0.2 ml de PBS con 0.2 % de HSA. Se tomaron muestras de sangre de tres ratones separados a intervalos de tiempo de 2, 5, 10, 20, 30, y 60 min a partir del momento de la inyección, y a cada ratón se le extrajo sangre dos veces. Se le extrajo sangre a grupos de tres ratones a intervalos de tiempo de 2 y 60 min, 5 y 30 min, o 10 y 20 min. El suero de las muestras de sangre se cosechó y se analizó por ELISA (Bang S. y otros, *Clin Cancer Res*, 11: 1545-1550 (2005)) en comparación con una curva estándar de la inmunotoxina pura correspondiente para determinar la concentración de inmunotoxina en el suero de ratón.

60 *Actividad antitumoral de xenoinjerto de ratón*- Cuarenta ratones hembras con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) se inyectaron por vía subcutánea con 10⁷ células CA46 en el día 0 como se describió anteriormente (Kreitman, R.J. y otros *Int J Cancer*, 81:148-155 (1999)). El volumen del tumor se midió regularmente por calibre durante las siguientes 6 semanas. Cuando el tamaño promedio alcanzó ~120 mm³, 6 días después de la implantación, los ratones se dividieron en cinco grupos de ocho y se inyectaron QOD X 3 con 0.2 ml de PBS que contenía 0.2 % de HSA y HA22

(0.3 mg/kg) o HA22-LR (1.0, 1.75, o 2.5 mg/kg), o se dejaron sin tratar (PBS/0.2 % de HSA solo). Los ratones se sacrificaron si sus tumores excedieron los 1000 mm³ o al final del experimento de 10 semanas.

Ejemplo 2

5 Este Ejemplo expone los resultados de los estudios de la escisión de PE por proteasas lisosomales. Las inmunotoxinas se internalizan en las células a través de la endocitosis mediada por objetivo, y deben llegar al citosol para ejercer su efecto tóxico. Dado que los lisosomas son la principal vía de degradación de macromoléculas exógenas, internalizadas, las inmunotoxinas deben evitar la degradación lisosomal en su trayecto al citosol (Fitzgerald, D., Semin Cancer Biol, 7:87-95 (1996)). Por lo tanto, se realizaron estudios para determinar si podría producirse una inmunotoxina al identificar y eliminar los sitios de escisión de proteasas lisosomales en la inmunotoxina.

Digestión de inmunotoxinas con proteasas lisosomales

15 Para determinar la ubicación de los sitios de escisión de proteasas lisosomales dentro de las inmunotoxinas, se requirió una gran cantidad de inmunotoxina altamente purificada. Una gran reserva de la inmunotoxina B3(dsFv)-PE38, que contiene el mismo fragmento PE38 que HA22 pero con un Fv diferente como la porción de direccionamiento, estuvo disponible (Reiter, Y. y otros, Cancer Res, 54:2714-2718 (1994)). B3(dsFv)-PE38 se incubó ya sea con extractos lisosomales preparados a partir de células Raji o con las proteasas lisosomales catepsina B, catepsina D, o catepsina S purificadas. Se retiraron alícuotas de la reacción a tiempos entre 0 y 60h, y los fragmentos se separaron y se visualizaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras.

25 Cada gel mostró las dos bandas esperadas a tiempo 0 que corresponden a los polipéptidos VL-PE38 y VH unidos por disulfuro, que migran a aproximadamente 50 kDa y 12 kDa, respectivamente. La digestión de B3(dsFv)-PE38 con extracto lisosomal mostró cinco fragmentos de escisión de 38 kDa (Lis-1), 30 kDa (Lis-2), 27 kDa (Lis-3), 25 kDa (Lis-4), y 23 kDa (Lis-5). La digestión con catepsina B mostró tres fragmentos de 38 kDa (B-1), 30 kDa (B-2), y 25 kDa (B-3). La digestión con catepsina D mostró al menos cinco fragmentos: 36 kDa (D-1), 30 kDa (D-2), 15 kDa (D-3), 14 kDa (D-4), y 13 kDa (D-5). La digestión con catepsina S mostró cuatro fragmentos: 38 kDa (S-1), 30 kDa (S-2), 25 kDa (S-3), y 13 kDa (S-4). Las cuatro digestiones contienen varios fragmentos que migran con pesos moleculares similares, lo que sugiere que los sitios de escisión pueden ser similares.

35 Para localizar los sitios de escisión, los fragmentos se separaron por SDS-PAGE, se inmovilizaron por electrotransferencia, y se secuenciaron mediante el uso de degradación de Edman. Las secuencias N-terminales se compararon con la secuencia de B3(dsFv)-PE38 para determinar las ubicaciones de los sitios de escisión. Las secuencias de varios fragmentos corresponden al N-terminal de B3(dsFv)-PE38 VL-PE38 (Lis-4, Lis-5, D-5, y S-4). Los fragmentos restantes están localizados en los dominios II o Ib de PE38. No se encontraron sitios de escisión en Fv o el dominio III de la PE.

Eliminación de las regiones susceptibles a las proteasas

40 Dado que existen numerosas proteasas lisosomales con especificidad amplia y frecuentemente traslapada, y los sitios observados se agrupan en un segmento limitado de PE38, los sitios de escisión se eliminaron al hacer deleciones para eliminar los sitios.

45 Aunque se usó B3(dsFv)-PE38 para estudiar los sitios de escisión, a esta ya no se le da seguimiento para uso terapéutico. Otra inmunotoxina basada en PE38, HA22, se usó para estudiar los efectos de las deleciones de los sitios. HA22 es una variante más activa de afinidad optimizada, de la inmunotoxina BL22 anti-CD22 (Salvatore, G. y otros, Clin Cancer Res, 8:995-1002 (2002)), y está actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de neoplasias de células B (leucemia linfocítica crónica [CLL], leucemia de células vellosas [HCL], y leucemia linfoblástica aguda [ALL]). Una serie de deleciones que eliminan grandes segmentos de los dominios II y Ib de PE38 se introdujeron en HA22. Las proteínas mutantes se expresaron, se purificaron, y se compararon con HA22 *in vitro* mediante el uso de ensayos de citotoxicidad en células Raji.

55 La Figura 3 indica la porción de la secuencia de la PE nativa que permanece en HA22 y en formas mutadas adicionales de PE (denotadas como M1-M5) creadas en el curso de los presentes estudios, y las actividades de M1-M5 con relación a HA22 en células Raji. La eliminación de los residuos 251 a 273 (M1) o 365 a 394 (M2) no afecta sustancialmente la actividad de la inmunotoxina. De la misma manera, la delección de los residuos 251 a 273 y 350 a 394, junto con el cambio de una cisteína libre en la posición 287 a serina (M3), produce una inmunotoxina completamente activa. La mutación C287S combinada con la delección de los residuos 350 a 394 y 251 a 280 (M4), la que elimina la escisión por furina en Arg279, produce una inmunotoxina que es aproximadamente 5 veces menos activa que HA22. Inesperadamente, un mutante con grandes deleciones que eliminan la mayoría de los residuos y todos los sitios de escisión de los dominios II y Ib (M5) era todavía muy activo. El mutante M5 conserva sólo una secuencia de 11 residuos (274-284) en el dominio II que contiene el sitio de reconocimiento y escisión por furina en Arg279.

65 El mutante M5 de HA22 se redesignó como "HA22-LR" para indicar que es "resistente al lisosoma". Para verificar que HA22-LR es resistente a la degradación lisosomal, se trató con extractos lisosomales y se examinó por SDS-PAGE en

un período de 24h. Aunque HA22 se hidroliza en gran parte en fragmentos más pequeños a los 30 min y se fragmenta completamente después de 4h, la proteólisis de HA22-LR fue mucho más lenta, con hidrólisis apenas detectable a las 2h y una fracción intacta considerable que aún es detectable después de 24h.

5 Ejemplo 3

Este Ejemplo expone los resultados de los estudios de la actividad de HA22-LR en líneas celulares CD22-positivas.

10 Se investigó la actividad de HA22-LR en líneas celulares tumorales CD22-positivas adicionales y se comparó con HA22 mediante el uso de una prueba t de pareada, dos colas, entre los valores de IC₅₀ resultantes (Tabla 1). HA22-LR tuvo actividad indistinguible de HA22 en las líneas celulares de linfoma de Ramos (n=3), CA46 (n=5), y Daudi (n=3), pero tuvo diferencias significativas contra la línea celular WSU-CLL (212 % de actividad, p=0.01, n=4), la línea celular KOPN-8 ALL (22 % de actividad, p=0.01, n=3), y la línea celular Raji (49 %, p=0.0002, n=10). Aunque existe alguna variabilidad en la actividad de HA22-LR y HA22 generalmente tuvieron actividades similares en líneas celulares CD22-positivas.

20 **Tabla 1 Actividad de HA22 y HA22-LR en seis líneas celulares CD22-positivas**

IC ₅₀ ± SE (ng/ml)			
línea celular	HA22	HA22-LR	Actividad Relativa
CA46 (n=5)	0.30 ± 0.08	0.26 ± 0.06	1.15
Daudi (n=3)	0.27 ± 0.04	0.24 ± 0.04	1.12
Ramos (n=3)	1.62 ± 0.28	1.78 ± 0.15	0.91
Raji* (n=10)	0.36 ± 0.04	0.73 ± 0.09	0.49
KOPN-8* (n=3)	0.10 ± 0.02	0.45 ± 0.05	0.22
WSU-CLL* (n=4)	2.50 ± 0.53	1.18 ± 0.34	2.12

35 *Indica una diferencia significativa (p < 0.05 en una prueba t pareada, de dos colas) entre los valores de IC₅₀ de HA22 y HA22-LR.

Ejemplo 4

40 Este Ejemplo expone los resultados de los estudios de la actividad de HA22-LR en células malignas CD22-positivas recién obtenidas de pacientes.

45 Para determinar si la nueva inmunotoxina también mataría células obtenidas directamente de pacientes, se probó en células de 5 pacientes con CLL y 3 con HCL. Como se muestra en la Tabla 2, se observó actividad para todas las poblaciones celulares de los pacientes probadas con HA22-LR. En CLL, las células malignas de los 5 pacientes fueron más sensibles a HA22-LR que a HA22, por una mediana de más de 17 veces (p = 0.009, Wilcoxon). Las IC₅₀ para la inhibición de la síntesis de proteínas estuvieron en el intervalo de <1 a 5.6 ng/ml. HA22-LR inhibió la síntesis de proteínas al 55 % a 1 ng/ml en células del paciente CLL #2 (IC₅₀ <1 ng/ml). Los ensayos de muerte celular en células de pacientes con CLL mostraron también más sensibilidad a HA22-LR que a HA22. Aunque las IC₅₀ de HA22 en células de pacientes con CLL variaron ampliamente de 8 a >1000 ng/ml, las IC₅₀ de HA22-LR variaron en menos de 10 veces. En HCL, HA22-LR fue generalmente menos activa que HA22 con respecto a la inhibición de la síntesis de proteínas. Los ensayos de muerte celular en dos de las tres poblaciones celulares de pacientes con HCL mostraron hallazgos similares. En resumen HA22-LR fue muy citotóxica para las células CLL y HCL CD22-positivas, pero entre las células CLL, que mostraron sensibilidad variable hacia HA22, la citotoxicidad de HA22-LR fue significativamente más potente y más uniforme.

Tabla 2. Citotoxicidad de HA22 y HA22-LR para células de leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia de células vellosas (HCL) recién obtenidas de pacientes

IC₅₀ ± SD (ng/ml)				
Tipo y Paciente núm.	HA22	HA22-LR	Actividad Relativa	Tipo de ensayo
CLL #1	>1000	4.7 ± 0.54	> 210	Síntesis de proteína
CLL #1	55 ± 12.8	3.4 ± 0.53	16.2	Muerte celular
CLL #2	16.8 ± 1.05	< 1	> 16.8	Síntesis de proteína
CLL #2	10.1 ± 0.48	1.32 ± 0.164	7.65	Muerte celular
CLL #3	8.1 ± 2.1	3.9 ± 0.50	2.07	Síntesis de proteína
CLL #4	290 ± 167	5.6 ± 1.10	51.8	Síntesis de proteína
CLL #5	8.0 ± 1.51	3.7 ± 0.27	2.16	Síntesis de proteína
HCL #1	5.2 ± 0.37	5.9 ± 1.03	0.88	Síntesis de proteína
HCL #2	0.177 ± 0.0062	1.25 ± 0.24	0.14	Síntesis de proteína
HCL #2	0.165 ± 0.0098	2.0 ± 0.39	0.08	Muerte celular
HCL #3	1.76 ± 0.51	< 1	> 1.76	Síntesis de proteína
HCL #3	2.1 ± 0.51	1.51 ± 0.29	1.39	Muerte celular

Ejemplo 5

Este Ejemplo expone los resultados de los estudios de toxicidad y farmacocinética de HA22-LR en ratones.

Estudios de toxicidad

Ratones desnudos se inyectaron por vía intravenosa con una dosis única de HA22-LR en el intervalo de 2.5 a 20 mg/kg y se observaron durante 10 días. No se observaron muertes en el nivel de dosis de 20 mg/kg (Tabla 3). No se evaluaron dosis más altas. En marcado contraste, y en consonancia con datos anteriores (Bang, S. y otros, Clin Cancer Res, 11:1545-1550 (2005)), una dosis de 2.0 mg/kg de HA22 produjo la muerte en el 100 % (5/5) de los ratones. La LD₅₀ en dosis única i.v. de HA22-LR es mayor que 20 mg/kg, lo que indica una disminución en la toxicidad inespecífica de más de 10 veces con relación a HA22.

Farmacocinéticas

Ratones Balb/c se inyectaron con 10 µg de HA22 o HA22-LR y se les extrajo sangre a intervalos entre 2 y 60 min. La concentración de inmunotoxina en suero de ratón se midió por ELISA. Los datos se ajustaron a una función de caída exponencial simple (Fig. 5). La vida media ($t_{1/2}$) de HA22 fue 14.6 min ($k=0.047$), mientras que la vida media de HA22-LR fue 7.8 min ($k=0.089$).

Tabla 3. Toxicidad no específica de HA22-LR

Inmunotoxina	Dosis (mg/kg)	Muerte/Total de ratones
HA22	2.0	5/5
HA22-LR	2.5	0/12
	5.0	0/4
	10	0/10
	20	0/10

Ejemplo 6

Este Ejemplo expone los resultados de los estudios *in vivo* de HA22-LR en xenoinjertos en ratones.

5 Sobre la base de la comparabilidad de la actividad *in vitro* de HA22 y HA22-LR y la baja toxicidad para los animales de HA22-LR, se probó la eficacia de HA22-LR en un modelo de xenoinjerto de tumores en ratón. Ratones SCID con xenoinjertos de tumores CA46 que promedian $\sim 120 \text{ mm}^3$ se trataron por vía intravenosa QOD X 3 con PBS, 0.3 mg/kg de HA22, o HA22-LR a dosis de 1.0, 1.75, o 2.5 mg/kg. El tamaño del tumor se midió regularmente durante 40 días (Fig. 6) y se observó visualmente durante 10 semanas.

10 Los tumores de ratones tratados con PBS crecieron rápidamente a un tamaño promedio mayor que 1000 mm^3 en el día 26. Los ratones tratados en los días 6, 8 y 10 con 0.3 mg/kg de HA22, la dosis máxima que puede darse a ratones QOD X 3 sin toxicidad, provocó regresiones que llevaron el tamaño promedio del tumor a un mínimo de $\sim 52 \text{ mm}^3$ en el día 12. En el día 21 todos los tumores habían reanudado el crecimiento rápido.

15 La respuesta del tumor a la dosis de 1.0 mg/kg de HA22-LR fue similar a la respuesta a 0.3 mg/kg de HA22, pero 1.75 mg/kg de HA22-LR fue mucho más eficaz. En el día 14, 5/8 ratones tratados con 1.75 mg/kg de HA22-LR tenían tumores indetectables que permanecieron imperceptibles durante la duración del estudio. Los otros tumores se encogieron inicialmente pero crecieron a un tamaño promedio de 54 mm^3 en el día 40. La dosis de 2.5 mg/kg de HA22-LR demostró una actividad antitumoral notable. En 7/8 ratones los tumores desaparecieron completamente en el día 14 y no regresaron en 10 semanas. Un tumor disminuyó a 10 mm^3 en el día 14, pero creció a 30 mm^3 en el día 40. Se concluyó que la baja toxicidad para los animales de HA22-LR permite dar de manera segura dosis más grandes de inmunotoxina, lo que mejora dramáticamente la actividad antitumoral de la inmunotoxina.

Ejemplo 7

Este Ejemplo discute los resultados de los estudios que usan como la porción de direccionamiento un anticuerpo que se une a un antígeno llamado mesotelina presente en la superficie de muchos tipos de cáncer.

30 Una inmunotoxina que usa el anticuerpo, conocido como "SS1" (ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos núm. 7.081,5118), como la porción de direccionamiento, y PE38 como la porción de toxina, se ha probado en un ensayo clínico fase I en pacientes con mesotelioma o cáncer de ovario que fracasaron en las terapias estándar (Hassan, R. y otros, Clin Cancer Res, 13:5144-5149 (2007)). Para comparar el efecto del uso de la PE resistente al lisosoma de la invención, la PE usada en la inmunotoxina HA22-LR que se discute en los Ejemplos precedentes se fusionó al anticuerpo SS1 para formar la inmunotoxina SS1-PE-LR y se probó en líneas celulares que expresan mesotelina contra una inmunotoxina similar de SS1 fusionada a PE38.

40 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Como puede verse, para dos de las líneas celulares, la citotoxicidad fue comparable, mientras que para una línea celular, la inmunotoxina con PE-LR fue 3.72 veces más citotóxica para las células que la inmunotoxina producida con PE38. En una línea celular, la inmunotoxina SS1-PE-LR tuvo casi la mitad de la citotoxicidad de la inmunotoxina PE38, lo que indica que sería muy útil si ésta, al igual que la inmunotoxina HA22-LR, pudiera darse a dosis mucho más altas sin toxicidad. La inmunotoxina SS1-PE-LR tuvo valores de IC₅₀ en el intervalo de ng/ml de un solo dígito en 5 de las 6 líneas celulares probadas. Para una línea celular, la inmunotoxina SS1-PE-LR fue mucho menos citotóxica para las células que la inmunotoxina basada en PE38. Estos resultados muestran que las inmunotoxinas que usan PE-LR como la porción tóxica son propensas a ser agentes terapéuticos útiles pero, al igual que la mayoría de los agentes terapéuticos, no serán necesariamente útiles contra células de todos los tipos de cáncer u otras afecciones. El profesional puede determinar fácilmente si cualquier molécula química en particular que usa una PE de la invención como la porción de toxina será eficaz en células objetivo, tales como las del cáncer de un paciente, al tomar una biopsia de las células objetivo a las que se va a dirigir la molécula química y probar la molécula química en las células de la biopsia para determinar si son susceptibles a inhibir su crecimiento por la molécula química, con una IC₅₀ en el intervalo de ng/mL de un solo dígito lo que indica que la inhibición del crecimiento es aceptable.

Tabla 4. Citotoxicidad de las inmunotoxinas SS1-PE y SS1-PE-LR para las células de las líneas celulares que expresan mesotelina.

línea celular	Porción objetivo	IC50 (ng/ml)		Actividad Relativa
		Inmunotoxina con PE38	Inmunotoxina con PE-LR	
L55	SS1	4.77 ± 0.87	3.87 ± 0.41	1.23
A1847	SS1	4.06 ± 0.35	4.24 ± 0.28*	0.96
A431/K5	SS1	0.20 ± 0.02	1.19 ± 0.19	0.17
OVCAR-8	SS1	2.32 ± 0.58	4.29 ± 0.67*	0.54
HAY	SS1	4.54 ± 0.59	1.22 ± 0.15	3.72
KB31SS15.15	± ≥200X Disminución	0.57 ≥ 1000*		

* - Muerte celular incompleta.

Ejemplo 8

Este Ejemplo discute los resultados de los estudios que se exponen en la presente.

La delección de los sitios susceptibles a proteasas en la PE produjo una forma más pequeña de PE que, en una inmunotoxina ilustrativa, HA22-LR, mantuvo excelente actividad citotóxica en líneas celulares CD22-positivas y en células aisladas directamente de pacientes con HCL y CLL. Además, HA22-LR fue considerablemente menos tóxica para ratones, lo que demuestra una reducción mayor de 10 veces en la toxicidad inespecífica. Estudios anteriores en ratones han demostrado que HA22 tiene una LD₅₀ de dosis única de 1.33 mg/kg (Bang, S. y otros, Clin Cancer Res, 11:1545-1550 (2005)). Los estudios en los que se basa la presente invención mostraron que una dosis intravenosa única de 2.0 mg/kg de HA22 mató 5/5 ratones, pero las dosis de HA22-LR de hasta 20 mg/kg no mataron a ninguno de los ratones inyectados. Esta gran disminución de la toxicidad para los animales permitió la administración de dosis de tratamiento mucho más altas, lo que condujo a una actividad antitumoral muy mejorada.

La toxicidad inespecífica de las inmunotoxinas en ratones es principalmente el resultado de daños en el hígado (Kreitman, R.J. y otros, Blood, 83:426-434 (1994); Onda, M. y otros, J Immunol, 165:7150-7156 (2000); Onda, M. y otros, J Immunol, 163:6072-6077 (1999); Onda, M. y otros, Cancer Res, 61:5070-5077 (2001)), y la toxicidad, en los pacientes también se debe en parte a la toxicidad hepática (Kreitman, R.J. y otros, J Clin Oncol, 23:6719-6729 (2005); Hassan, R. y otros, Clin Cancer Res, 13:5144-5149 (2007); Kreitman, R.J. y otros, N Engl J Med., 345:241-247 (2001); Kreitman, R.J. y otros, J Clin Oncol, 18:1622-1636 (2000)). La toxicidad hepática en ratón para LMB-2 (una inmunotoxina dirigida al receptor de interleucina-2), y por extensión para todas la inmunotoxinas PE38, se asocia con la acumulación de la inmunotoxina en las células de Kupffer en el hígado, que conduce a la liberación localizada de TNF-α y a hepatotoxicidad severa (Onda, M. y otros, J Immunol, 165:7150-7156 (2000)). La baja toxicidad inespecífica de HA22-LR indica, que carece de elementos en HA22, presumiblemente los segmentos eliminados de los dominios II y Ib, responsables de la captación por las células de Kupffer y/o la estimulación de la liberación de TNF-α. Los segmentos eliminados, sin embargo, no son esenciales para la toxicidad dirigida anti-CD22, dado que HA22-LR conserva la actividad antitumoral similar a HA22.

Otro factor que puede contribuir a la diferencia en la toxicidad inespecífica es la diferencia en las vidas medias de HA22 y HA22-LR (Fig. 5), la que en sí se debe probablemente a la filtración y eliminación más eficientes de HA22-LR (51.0 kDa) que de HA22 (63.3 kDa) por los glomérulos en el riñón (Brenner, B.M. y otros, Am J Physiol, 234:F455-F460 (1978)). La diferencia de 2 veces en la vida media sola, sin embargo, es insuficiente para explicar la diferencia de >10 veces en la toxicidad inespecífica. Esfuerzos anteriores para reducir la toxicidad inespecífica de las inmunotoxinas han demostrado que disminuir el punto isoeléctrico (pI) del Fv en las inmunotoxinas LMB-2, B3(dsFv)-PE38, o SS1P

disminuye su toxicidad inespecífica aproximadamente 2 a 3 veces en ratones (Onda, M. y otros, *J Immunol*, 163:6072-6077 (1999); Onda, M. y otros, *Cancer Res*, 61:5070-5077 (2001)). Esta observación no explica la diferencia entre HA22 y HA22-LR, dado que los dos constructos tienen un Fv idéntico y el pl de HA22-LR está ligeramente aumentado con relación al pl de HA22 (pI_{HA22}=5.26 y pI_{HA22-LR}=5.63). Además, la diferencia de 2 a 3 veces en la toxicidad observada para esta estrategia es además mucho más pequeña que la diferencia de >10 veces entre HA22 y HA22-LR.

Para producir la inmunotoxina HA22-LR, los sitios de escisión de proteasas lisosomales dentro de PE38 se determinaron y se suprimieron. La inmunotoxina B3(dsFv)-PE38 fue digerida con extractos lisosomales y Catepsinas B, D, y S, que han sido implicados en el procesamiento de antígenos (Plüger, E.B. y otros, *Eur J Immunol*, 32:467-476 (2002); Zhang, T. y otros, *Immunology*, 100:13-20 (2000); Deussing, J. y otros, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:4516-4521 (1998); Nakagawa, T.Y. y otros, *Immunity*, 10:207-217 (1999); Shi, G.P. y otros, *Immunity*, 10:197-206 (1999)). Se encontró que la escisión de inmunotoxinas basadas en PE por proteasas lisosomales se concentra dentro de los dominios II y Ib del fragmento de toxina PE38. El trabajo anterior con PE nativa ha demostrado que el dominio Ib es muy susceptible a la proteólisis limitada con quimotripsina, serina proteinasa estafilocócica, pepsina A, y subtilisina (Bourdenet, S. y otros, *Eur J Biochem*, 192:379-385 (1990)), lo que confirma que el dominio Ib es fácilmente accesible a las proteasas. Los resultados en la presente muestran que el dominio II en PE38 es también accesible a las proteasas mientras que el dominio III se escinde con menor facilidad, probablemente debido a una estructura estable, más compacta.

La información del análisis de escisión se usó para producir una serie de deleciones en la inmunotoxina HA22 que, en el constructo denominado "M5" eliminaron la mayor parte de los dominios II y Ib, dejando sólo un tramo corto de 11 aminoácidos del dominio II (Fig. 3). Este fragmento de 11 residuos se compone de la secuencia de aminoácidos RHRQPRGWQL (sec. con núm. de ident.:11) y contiene un sitio de escisión de la proteasa furina que es importante para el procesamiento y la activación intracelular de la toxina nativa (Ogata, M. y otros, *J Biol Chem*, 265:20678-20685 (1990); Jinno, Y. y otros, *J Biol Chem*, 264: 15953-15959 (1989)). Este constructo redesignado HA22-LR para hacer énfasis en su resistencia mejorada a las proteasas lisosomales, está compuesto de un dsFv anti-CD22 unido a un fragmento de PE de 25 kDa (PE25) que contiene el fragmento de 11 residuos del dominio II y todo el dominio III. Cuando se probó en varias líneas celulares que expresan CD22, la actividad de HA22-LR fue similar a la de la inmunotoxina HA22 de la que se derivó.

La investigación anterior ha demostrado que el dominio Ib no es esencial para la actividad de inmunotoxinas PE (Siegall, C.B. y otros, *J Biol Chem*, 264:14256-14261 (1989); Kihara, A. and Pastan, I., *Bioconjug Chem*, 5:532-538 (1994); Debinski, W. y otros, *Mol Cell Biol*, 11:1751-1753 (1991); Kuan, C.T. y Pastan, I., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:974-978 (1996); Prior, T.I. y otros, *Biochemistry*, 31:3555-3559 (1992)). El dominio II, sin embargo, ha sido propuesto para desempeñar un papel clave en la translocación de la membrana durante la intoxicación por PE (Hwang, J. y otros, *Cell*, 48:129-136 (1987); Prior, T.I. y otros, *Biochemistry*, 31:3555-3559 (1992); Taupiac, M.P. y otros, *Mol Microbiol*, 31:1385-1393 (1999); Wedekind, J.E. y otros, *J Mol Biol*, 314:823-837 (2001); Méré, J. y otros, *J Biol Chem*, 280:21194-21201 (2005)). Los resultados que se informan en la presente indican que un componente principal de la actividad de translocación del dominio II puede estar localizado en un tramo corto de residuos alrededor del sitio de escisión de furina. Los datos que muestran una disminución de 5 veces en la actividad del mutante M4, que elimina el sitio de escisión de furina, y el trabajo anterior (Jinno, Y. y otros, *J Biol Chem*, 264:15953-15959 (1989)) indican que la escisión por furina desempeña un papel importante en la citotoxicidad de PE. Una posibilidad adicional es que la resistencia de HA22-LR a la degradación lisosomal puede compensar cualquier pérdida de la actividad de translocación al permitir a HA22-LR sobrevivir por más tiempo dentro de la célula. Los objetivos de las inmunotoxinas en la superficie celular y el tipo celular objetivo pueden influir además en su tráfico intracelular y acceso al citosol.

HA22-LR tuvo citotoxicidad similar o ligeramente menor en comparación con HA22 en células con elevada expresión de CD22, que incluyen líneas celulares CD22-positivas y células HCL frescas. Sin embargo, su citotoxicidad en células CLL fue más potente y más uniforme que la de HA22. Esto puede deberse a la resistencia de HA22-LR a la degradación lisosomal que conduce a una supervivencia intracelular más larga con relación a HA22. Es poco probable que esto fuera simplemente debido a que HA22-LR sobrevive por más tiempo que HA22 en el medio durante la incubación de 3 días usada en los estudios, dado que otros experimentos han demostrado que HA22 tiene excelente estabilidad en suero y en medio de cultivo celular. Es posible que la digestión con proteasas lisosomales sea un mecanismo principal de resistencia a inmunotoxinas para células CLL, y que la molécula HA22-LR supere esta resistencia. La digestión con proteasas lisosomales estaría presente además en células con elevada expresión de CD22, pero puede ser limitante del tratamiento sólo en CLL, donde la expresión de CD22 es baja y el número relativamente pequeño de moléculas internalizadas limita la actividad de la inmunotoxina. Además, la actividad de HA22-LR en CLL es muy similar a la observada para HA22 en HCL, lo que sugiere que HA22-LR debería desarrollarse más aún como tratamiento potencial para esta enfermedad.

Además de las toxicidades inespecíficas, otro factor importante que limita la utilidad de las inmunotoxinas es el desarrollo de anticuerpos que reaccionan con la toxina y neutralizan su actividad. Otro trabajo del laboratorio de los presentes inventores describió recientemente una inmunotoxina mutante, HA22-8X, que es significativamente menos inmunogénica en ratones, debido a que muchos, pero no todos, los epítomos de células B se han eliminado. Afortunadamente, la mayoría de los epítomos de células B restantes en HA22-8X se localizan en las regiones del

dominio II suprimidas en HA22-LR. La combinación de las mutaciones en estas dos moléculas producirá una inmunotoxina que es incluso menos inmunogénica.

5 HA22-LR tiene varias ventajas sobre HA22 que se espera que sean aplicables a otras inmunotoxinas PE, pero parecen especialmente prometedoras para el tratamiento de CLL. La toxicidad inespecífica de HA22-LR en ratones es más de 10 veces menor que la de HA22. Por lo tanto el uso de HA22-LR debería ayudar a evitar los efectos secundarios relacionados con el tratamiento y permitir a los pacientes recibir dosis más altas para un mejor resultado terapéutico en humanos. Además, las deleciones usadas para generar HA22-LR eliminan epítomos conocidos de anticuerpos y deberían ayudar a limitar la generación de anticuerpos neutralizantes, lo que permite dar más ciclos de tratamiento a los
10 pacientes. Con relación a HA22, HA22-LR también tiene actividad más uniforme, muy mejorada contra células CLL derivadas de pacientes, y generalmente actividad similar en líneas celulares y células de pacientes con HCL CD22-positivas. Por estas razones, HA22-LR representa un avance importante en el desarrollo de inmunotoxinas.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pastan, Ira H. Weldon, John FitzGerald, David El Gobierno de los Estados Unidos de América, representado por el Secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos

20 <120> Deleciones en el Dominio II de exotoxina A de Pseudomonas que elimina los epítomos inmunogénicos

<130> 015280-545100PC

25 <140> WO PCT/US08/75296

< 141> 2008-09-04

<150> US 60/969,929

< 151> 2007-09-04

30 <150> US 61/018,853

< 151> 2007-01-03

<160> 34

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

35 <210> 1

< 211> 613

< 212> PRT

< 213> Pseudomonas aeruginosa

40 <220>

< 223> exotoxinaa A de Pseudomonas (PE) nativa

<400> 1

45 Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15
Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30
Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45
Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60
Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80
Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95
Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110
Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125
Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140
Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160
Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175

ES 2 525 488 T3

5 Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
 180 185 190
 Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
 195 200 205
 Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
 210 215 220
 Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
 225 230 235 240
 Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
 245 250 255
 Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
 260 265 270
 15 Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
 275 280 285
 Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
 290 295 300
 20 Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
 325 330 335
 Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
 340 345 350
 25 Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
 370 375 380
 Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
 385 390 395 400
 30 Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
 405 410 415
 Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
 420 425 430
 35 Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
 435 440 445
 Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
 450 455 460
 Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 465 470 475 480
 40 Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
 485 490 495
 Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 500 505 510
 Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
 515 520 525
 45 Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
 530 535 540
 Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
 545 550 555 560
 Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
 565 570 575
 50 Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
 580 585 590
 Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 595 600 605
 55 Arg Glu Asp Leu Lys
 610

<210> 2

<211> 4

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia adicional carboxilo terminal de PE sintética

65

ES 2 525 488 T3

<400> 2
 Lys Asp Glu Leu
 1

5
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Secuencia adicional carboxilo terminal de PE sintética

<400> 3
 Arg Glu Asp Leu
 1

15
 <210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> dominios II (residuos 251-364) y Ib (residuos 365-394) de la forma truncada de PE de 38 kD (PE38) sintética

<400> 4

25

30
 Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His
 1 5 10 15
 Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
 20 25 30
 Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr
 35 40 45
 Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn
 50 55 60
 Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg
 65 70 75 80
 Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu
 85 90 95
 Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala
 100 105 110
 Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr
 115 120 125

45
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia carboxilo terminal de PE nativa sintética (residuos 609-613)

50
 <400> 5

 Arg Glu Asp Leu Lys
 1 5

55
 <210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> sitio de escisión de furina mínima sintética

5 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (2) ... (3)
 < 223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 6
 Arg Xaa Xaa Arg
 1

10 <210> 7
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> sitio de escisión de furina sintética, secuencia consenso del motivo de escisión

15 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (2) ... (2)
 < 223> Xaa = cualquier aminoácido

20 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (3) ... (3)
 < 223> Xaa = Arg o Lys

<400> 7
 Arg Xaa Xaa Arg
 1

25 <210> 8
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

30 <220>
 < 223> sitio de escisión de furina sintética

<220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (2) ... (2)
 < 223> Xaa = cualquier aminoácido

35 <400> 8
 Arg Xaa Arg Arg
 1

40 <210> 9
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> sitio de escisión de furina sintética

<220>
 < 221> MOD_RES

< 222> (2) ... (2)
 < 223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 9
 Arg Xaa Lys Arg
 1

5
 <210> 10
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

10
 <220>
 < 223> Secuencia de escisión de furina (FCS) nativa sintética en el dominio II de PE

<400> 10
 Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
 1 5 10

15
 <210> 11
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética con sustituciones en las posiciones P3 y P2

<400> 11
 Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
 1 5 10

20
 <210> 12
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

25
 <220>
 < 223> secuencias de escisión de furina sintética (FCS)

<400> 12
 Arg Lys Lys Arg
 1

30
 <210> 13
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencias de escisión de furina sintética (FCS)

35
 <400> 13
 Arg Arg Arg Arg
 1

40
 <210> 14
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencias de escisión de furina sintética (FCS)

<400> 14
 Arg Lys Ala Arg
 1

5
 <210> 15
 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

10
 <220>
 < 223> secuencias de escisión de furina sintética (FCS)

<400> 15
 Ser Arg Val Ala Arg Ser
 1 5

15
 <210> 16
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencias de escisión de furina sintética (FCS)

<400> 16
 Thr Ser Ser Arg Lys Arg Arg Phe Trp
 1 5

20
 <210> 17
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

25
 <220>
 < 223> secuencias de escisión de furina sintética (FCS)

<400> 17
 Ala Ser Arg Arg Lys Ala Arg Ser Trp
 1 5

30
 <210> 18
 < 211> 8
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

35
 <400> 18
 Arg Arg Val Lys Lys Arg Phe Trp
 1 5

<210> 19
 < 211> 8
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

40

<220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

<400> 19
 Arg Asn Val Val Arg Arg Asp Trp
 1 5

5
 <210> 20
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

10
 <220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

<400> 20
 Thr Arg Ala Val Arg Arg Arg Ser Trp
 1 5

15
 <210> 21
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

20
 <400> 21
 Arg Gln Pro Arg
 1

<210> 22
 < 211> 8
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

25
 <220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

<400> 22
 Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
 1 5

30
 <210> 23
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

35
 <400> 23
 Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
 1 5

<210> 24
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

40

<220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

<400> 24
 His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln
 1 5

5
 <210> 25
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

10
 <220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

<400> 25
 Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
 1 5

15
 <210> 26
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

20
 <400> 26
 Arg Ser Lys Arg
 1

<210> 27
 < 211> 8
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

25
 <220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

<400> 27
 Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp
 1 5

30
 <210> 28
 < 211> 8
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencia de escisión de furina sintética

35
 <400> 28
 His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu
 1 5

40
 <210> 29
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

ES 2 525 488 T3

- <220>
< 223> secuencia de escisión de furina sintética
- <400> 29
Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5
- 5
<210> 30
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial
- 10
<220>
< 223> secuencia de escisión de furina sintética
- <400> 30
His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10
- 15
<210> 31
< 211> 6
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial
- <220>
< 223> secuencia de escisión de furina sintética
- 20
<400> 31
Arg His Arg Ser Lys Arg
1 5
- <210> 32
< 211> 4
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial
- 25
<220>
< 223> residuos de PE terminales mutados sintéticos (residuos 609-613)
- <400> 32
Arg Glu Glu Leu
1
- 30
<210> 33
< 211> 4
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial
- <220>
< 223> secuencia consenso tetranucleotídica sintética del "motivo de punto caliente"
- 35
<400> 33
rgyw 4

<210> 34
< 211> 3
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

5 <220>
< 223> secuencia serina consenso sintética del "motivo de punto caliente"

<400> 34
agy 3

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) aislada, mutada que comprende una secuencia de la fórmula: R^1_n -FCS- R^2_n - R^3_n -PE dominio III funcional, en donde:
- 10 $n = 0$ o 1 independientemente para cada uno de R^1 , R^2 y R^3 ;
 $R^1 = 1$ a 10 residuos de aminoácidos;
 FCS = una secuencia de escisión de furina de residuos de aminoácidos, la secuencia es escindible por furina y tiene un extremo aminoácido y un extremo carboxilo, en donde la FCS:
- 15 a) es representada por la fórmula P4-P3-P2-P1, en donde P4 es un residuo de aminoácido en el extremo amino, P1 es un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo, P1 es una arginina o un residuo de lisina, y dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por furina;
 b) (i) adicionalmente comprende residuos de aminoácidos representados por P6-P5 en dicho extremo amino, (ii) adicionalmente comprende residuos de aminoácidos representados por P1'-P2' en dicho extremo carboxilo, (iii) en donde además P1 es una arginina o un residuo de lisina, P2' es triptófano, y P4 puede ser arginina, valina o lisina, siempre y cuando si P4 no es arginina, entonces P6 y P2 son residuos básicos, y (iv) dicha secuencia es escindible en el extremo carboxilo de P1 por furina;
 20 c) se selecciona de las sec. con núms. de ident.: 12-20;
 d) es la sec. con núm. de ident.: 10, o una versión truncada de esta que comprende RQPR (sec. con núm. de ident.: 21); or
 e) es la sec. con núm. de ident.: 11, o una versión truncada de esta que comprende RSKR (sec. con núm. de ident.: 26);
- 25 $R^2 = 1$ a 10 aminoácidos; y
 $R^3 = 1$ o más residuos contiguos de los residuos 365-394 de sec. con núm. de ident.: 1;
 el dominio III de PE funcional son los residuos 395-613 de la sec. con núm. de ident.: 1, que comprende opcionalmente (i) sustituciones en uno o más residuos que corresponden a 609-613 de la sec. con núm. de ident.: 1, (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina, o isoleucina por arginina en una posición que corresponde a la posición 490 de la sec. con núm. de ident.: 1, (iii) una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina por uno o más residuos que corresponden a los residuos seleccionados de D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, y L597 de la sec. con núm. de ident.: 1, donde los residuos de la sec. con núm. de ident.: 1 mantienen inmunogenicidad de un epítipo o subepítipo del dominio III de PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i) - (iii), en donde el PE mutado no incluye los residuos 1 a 273 y 285 a 364 de la sec. con núm. de ident.: 1.
- 30 2. El PE mutado de la reivindicación 1, en donde $n=0$ para R^3 .
- 35 3. El PE mutado de la reivindicación 1, en donde FCS se conjuga o fusiona directamente al dominio III funcional de PE.
- 40 4. El PE mutado de la reivindicación 1, en donde el dominio III funcional de PE consiste en la secuencia de residuos 395-613 de la sec. con núm. de ident.: 1.
- 45 5. El PE mutado de la reivindicación 1, en donde el dominio III funcional de PE comprende (i) sustituciones sustituciones en uno o más residuos que corresponden a 609-613 de la sec. con núm. de ident.: 1, (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina, o isoleucina por arginina en una posición que corresponde a la posición 490 de la sec. con núm. de ident.: 1, (iii) una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina por uno o más residuos que corresponden a los residuos seleccionados de D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, y L597 de la sec. con núm. de ident.: 1, donde los residuos de la sec. con núm. de ident.: 1 mantienen inmunogenicidad de un epítipo o subepítipo del dominio III de PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i)-(iii).
- 50 6. Una molécula quimérica que comprende
- 55 (a) una citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, cuya citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a un antígeno o receptor sobre una superficie celular, conjugado o fusionado a
 (b) una PE mutada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5, en donde la molécula quimérica no incluye los residuos 1 a 273 y 285 a 364 de la sec. con núm. de ident.: 1.
- 60 7. La molécula quimérica de la reivindicación 6, en donde además (a) es un anticuerpo o fragmento de este que conserva la capacidad de reconocimiento del antígeno.

8. La molécula quimérica de la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este se une a un antígeno objetivo seleccionado de mesotelina o CD22.
- 5 9. Una molécula quimérica para su uso en la inhibición del crecimiento de una célula objetivo que tiene un exterior, dicha molécula quimérica comprende:
- 10 (a) una citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, cuya citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a un antígeno o receptor en el exterior de dicha célula, conjugado o fusionado a
(b) una PE mutada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5, en donde la molécula quimérica no incluye los residuos 1 a 273 y 285 a 364 de la sec. con núm. de ident.: 1.
10. La molécula quimérica de la reivindicación 9, en donde además (a) es un anticuerpo o fragmento de este que conserva la capacidad de reconocimiento del antígeno.
- 15 11. La molécula quimérica de la reivindicación 10, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este se une a un antígeno objetivo seleccionado de mesotelina o CD22.
- 20 12. Un ácido nucleico aislado, dicho ácido nucleico que codifica la PE mutada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5.
- 25 13. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 12, en donde además dicho ácido nucleico codifica una citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno o receptor sobre una superficie celular, cuya citocina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo está fusionado directamente o a través de un enlazador peptídico a dicha PE mutada.
- 30 14. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 13, en donde dicho ácido nucleico codifica un anticuerpo o fragmento de este que conserva la capacidad de unión al antígeno.
15. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 14, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este se une a un antígeno objetivo seleccionado de mesotelina o CD22.

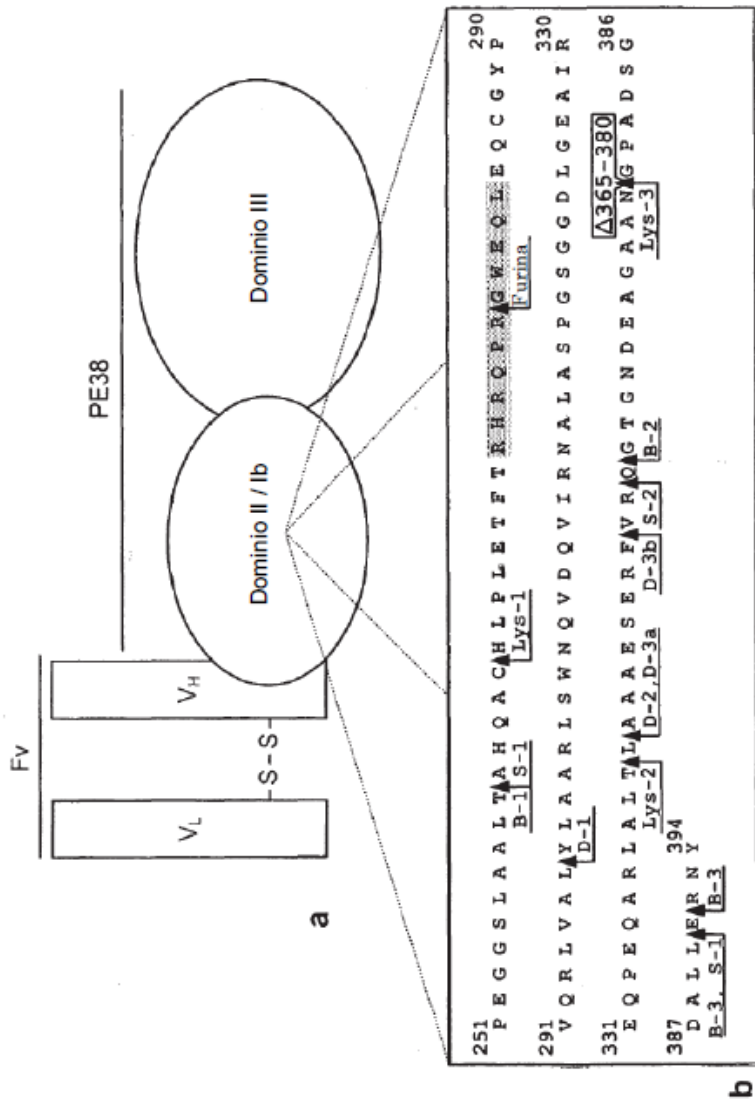


FIG. 1

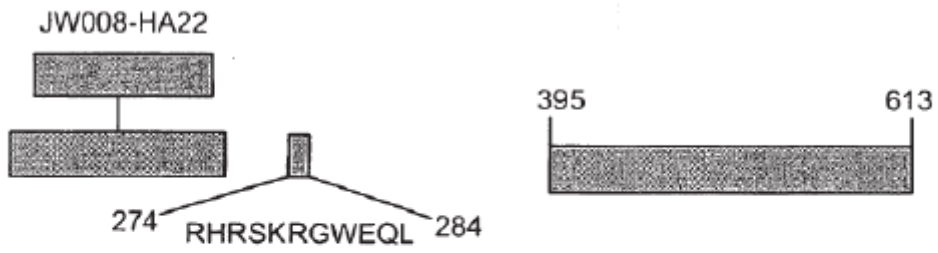


FIG. 2

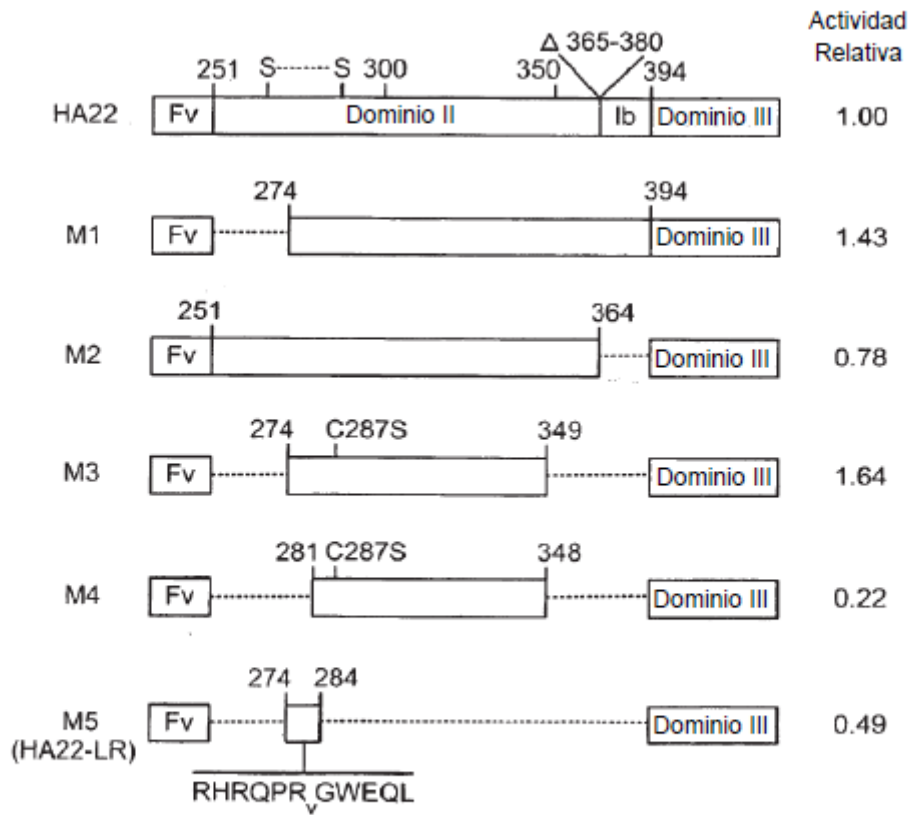


FIG. 3

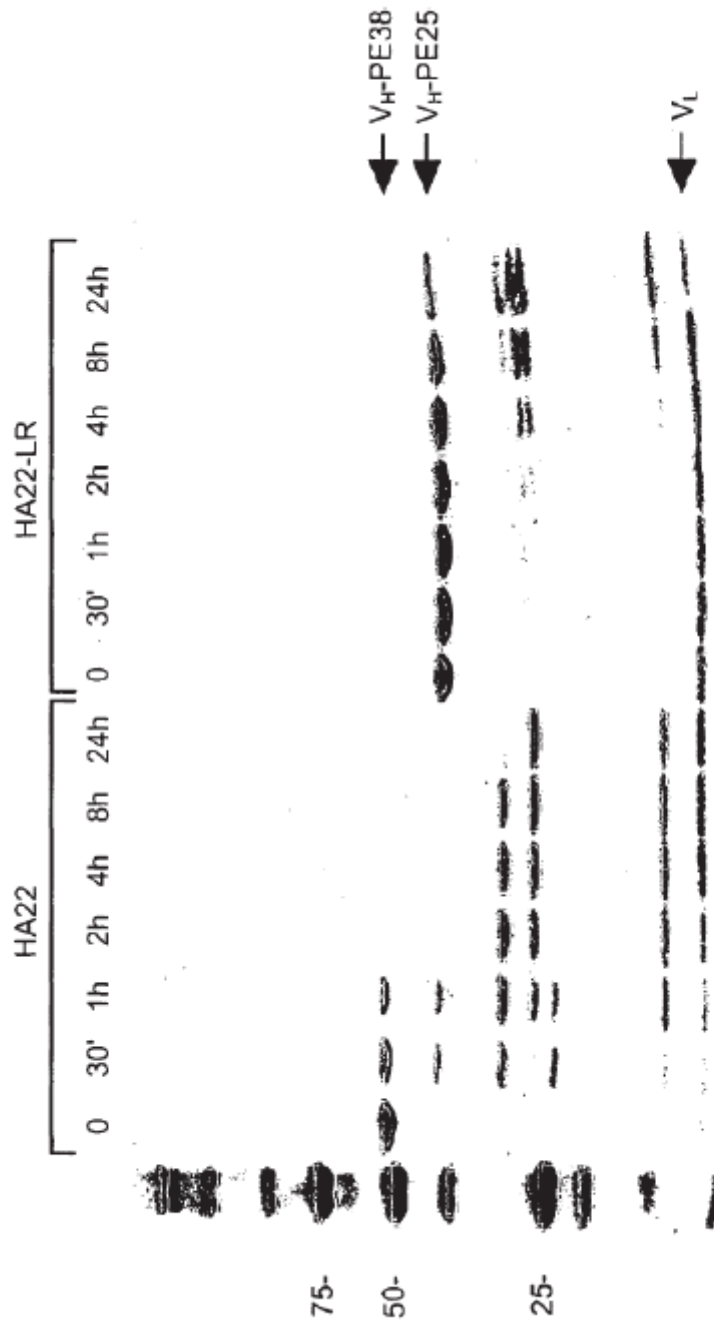


FIG. 4

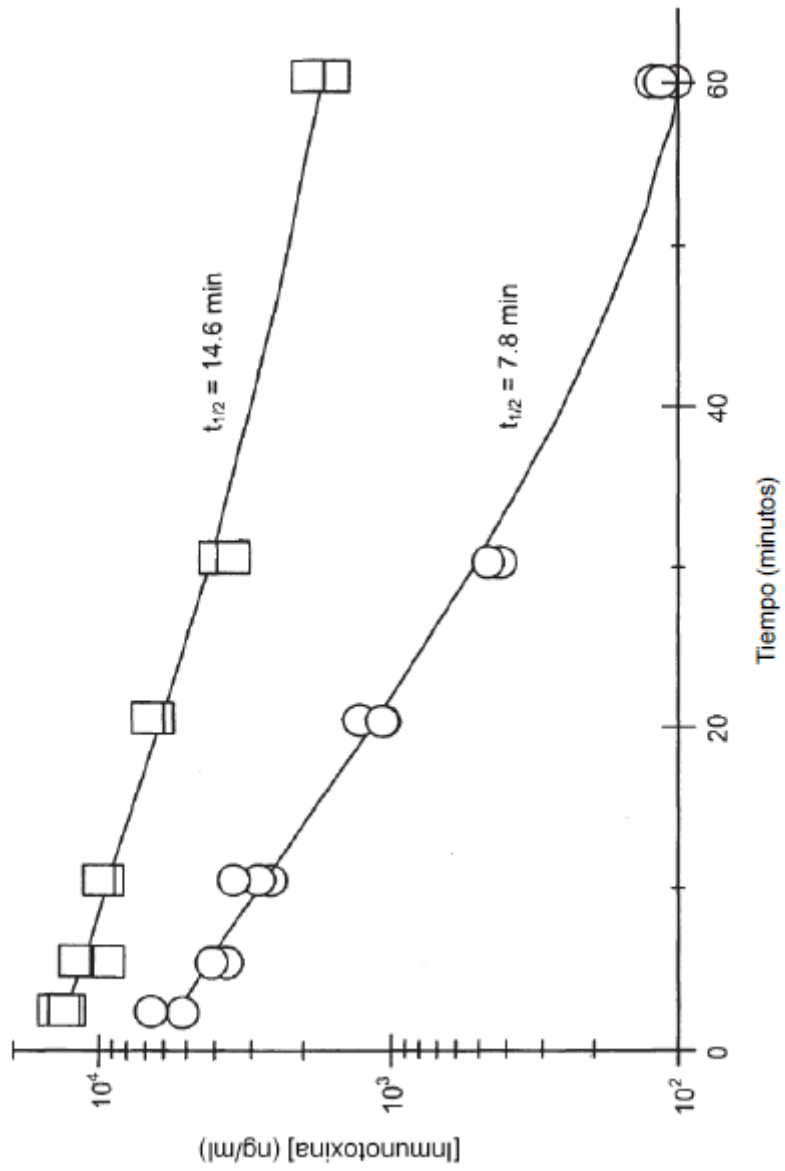


FIG. 5

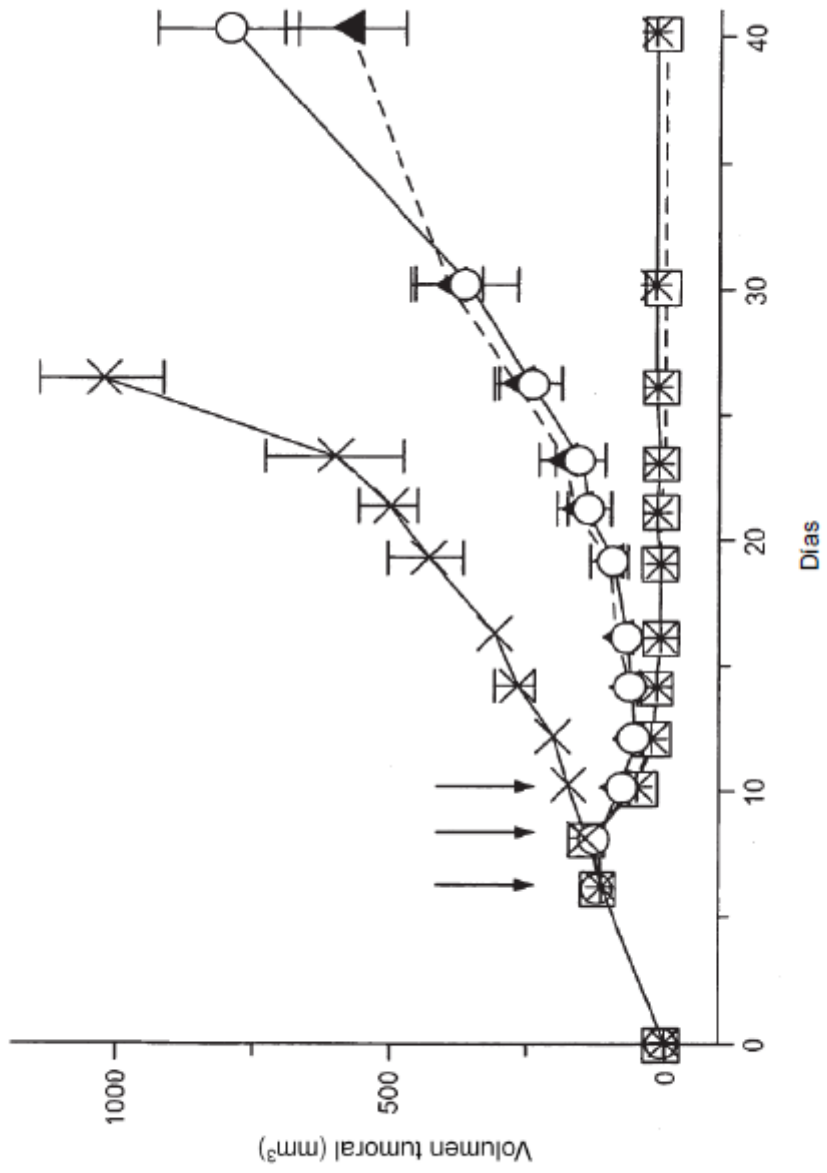


FIG. 6