

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 888**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/52** (2006.01)

**C12N 15/57** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 14/32** (2006.01)

**C07K 14/33** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2002 E 10177191 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2518142**

54 Título: **Proaerolisina que contiene secuencias de activación de proteasa y métodos de uso para el tratamiento del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

**24.09.2001 US 314613 P**

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

**12.08.2015**

73 Titular/es:

**UVIC INDUSTRY PARTNERSHIPS INC. (50.0%)  
Box 3075 R-Hut, McKenzie Avenue  
Victoria, British Columbia V8W 3W2, CA y  
JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DENMEADE, SAMUEL R;  
ISAACS, JOHN T y  
BUCKLEY, JAMES THOMAS**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 542 888 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

Proaerolisina que contiene secuencias de activación de proteasa y métodos de uso para el tratamiento del cáncer de próstata

**Campo**

- 5 La presente solicitud se refiere a una novedosa variante de la proteína proaerolisina (PA) y a los métodos para utilizarla en el tratamiento del cáncer de próstata localizado y metastásico.

**Antecedentes**

10 Uno de cada tres cánceres diagnosticados en los hombres estadounidenses es de origen prostático, lo que convierte al cáncer de próstata en la malignidad más diagnosticada en este grupo de población estadounidense (Berges et al. Clin. Cancer Res. 1:473-480,1995). La incidencia del cáncer de próstata en los Estados Unidos no se ha reducido por los cambios en el estilo de vida; de hecho, la tasa de incidencia del cáncer de próstata clínico ha aumentado constantemente desde la década de 1930 (Pinski et al. Cancer Res. 61:6372-6,2001). La incidencia del cáncer de próstata aumenta con la edad más rápidamente que cualquier otro tipo de cáncer; menos del 1% de los casos se diagnostican en hombres menores de 50 años (Furuya et al. Cancer Res. 54:6167-75, 1994). Por tanto, dado que la esperanza de vida de la población masculina aumenta con el paso del tiempo, la incidencia del cáncer de próstata clínico también se incrementará (Furuya et al. Cancer Res. 54:6167-75, 1994).

15 En la actualidad no existe ningún tratamiento que prolongue de forma significativa la supervivencia en los hombres con cáncer de próstata metastásico (Khan y Denmeade. Prostate 45:80-83, 2000). La castración médica con estrógenos orales (ablación androgénica) fue la primera terapia sistémica efectiva para el cáncer y sigue siendo la terapia más útil, en términos generales, para el cáncer de próstata. A pesar de que la terapia de ablación androgénica presenta un sustancial beneficio paliativo, su impacto sobre la supervivencia general es limitado (Berges et al. Clin. Cancer Res. 1:473-480, 1995). Finalmente esta terapia fracasa, porque el cáncer de próstata metastásico en un paciente individual se compone de forma heterogénea de células cancerígenas andrógeno dependientes y andrógeno independientes (Christensen et al. Bioorg. Medicinal Chem. 7:1273-80, 1999). Tras la ablación androgénica, las células andrógeno dependientes de estos tumores dejan de proliferar y activan una vía de suicidio celular denominada muerte celular programada (PCD) o apoptosis. Gracias a la eliminación de este subgrupo de células andrógeno dependientes, la mayoría de los hombres con cáncer de próstata metastásico tienen una respuesta positiva a la terapia de privación de andrógenos. No obstante, finalmente todos los pacientes recaen hasta un estado en el que ya no responden a nuevas terapias anti-andrógenos, con independencia de que su administración sea completa, debido a la presencia de células cancerígenas prostáticas andrógeno independientes en los lugares de la metástasis. Lamentablemente, la enfermedad es uniformemente fatal en este punto, porque no existe ninguna terapia que elimine de forma eficaz las células cancerígenas prostáticas andrógeno independientes (Khan y Denmeade. Prostate 45:80-83, 2000).

20 Se han propuesto diversos enfoques alternativos para el tratamiento del cáncer de próstata. Uno de ellos consistía en desarrollar métodos para detectar de forma agresiva la enfermedad local mientras todavía está en la próstata, de forma que se pueda tratar potencialmente mediante una terapia local definitiva. A menudo los cánceres localizados se muestran moderadamente diferenciados y tienen un menor volumen. Durante las últimas décadas se han producido mejoras en el tratamiento quirúrgico y radioterapéutico del cáncer de próstata localizado. Estas mejoras han culminado en los últimos años en un descenso del índice de mortalidad del cáncer de próstata por primera vez en 50 años.

25 No obstante, a pesar de que este avance incrementó la tasa de curación, todavía hay un gran número de hombres que no se curan con terapias locales y finalmente fallecen como consecuencia de la enfermedad metastásica. Esta realidad clínica ha llevado al desarrollo de tratamientos no hormonales para el cáncer de próstata metastásico. Los agentes quimioterapéuticos antiproliferativos estándar no han tenido éxito como tratamiento para el cáncer de próstata. Estos tipos de agentes pueden ser poco eficaces contra los cánceres prostáticos andrógeno independientes porque tienen una tasa de proliferación notablemente baja en comparación con otros tipos de tumores y muchos tejidos normales, como la piel, el tracto gastrointestinal y la médula espinal. Por ejemplo, la fracción de crecimiento en 117 puntos metastásicos del cáncer de próstata obtenida de 11 pacientes en los que fracasó la ablación androgénica en una autopsia «en caliente» fue del  $7,1 \pm 0,8\%$ . (Pinski et al. Cancer Res 61:6372-6,2001). Esta baja tasa de proliferación puede explicar la relativa falta de respuesta de las células cancerígenas prostáticas en seres humanos a la quimioterapia antiproliferativa estándar, mientras que las líneas celulares del cáncer de próstata andrógeno independientes altamente proliferativas siguen siendo altamente sensibles a la PCD *in vitro*.

30 Se han propuesto algunas estrategias para el tratamiento de los cánceres de próstata de proliferación lenta. Un enfoque consiste en identificar vías de señalización específicas en las que las células cancerígenas prostáticas, durante la transformación maligna, adquieren una dependencia única para la supervivencia. Una vez identificadas, se pueden desarrollar pequeñas moléculas o inhibidores biológicos de estas vías como agentes terapéuticos. Un ejemplo de este enfoque es el uso de pequeñas moléculas o inhibidores de los anticuerpos monoclonales de las vías del receptor del EGF o Her2/neu. Otro método consiste en inhibir una proteína intracelular omnipresente cuya función es imprescindible para la supervivencia de todo tipo de células. Este enfoque superaría el problema de la

heterogeneidad y la «resistencia», dado que todas las células cancerígenas de un tumor se podrían eliminar con este planteamiento. No obstante, la citotoxicidad no sería específica para un tipo de células y la administración de una toxina tan general conllevaría una toxicidad sistémica significativa. Por tanto, se necesita un método para dirigir las citotoxinas directamente a los sitios del cáncer prostático.

5 Otra estrategia para el tratamiento de los cánceres prostáticos de proliferación lenta consiste en dirigir las citotoxinas que matan a las células, no mediante la inducción de la apoptosis tras la inhibición de las vías metabólicas o de señalización críticas, sino más bien a través de la citólisis no específica vía la ruptura de la membrana plasmática. Se han descrito numerosas toxinas citolíticas (Lesieur et al. Mol. Membr. Biol. 14:45064, 1997). Estas toxinas citolíticas a menudo son de origen bacteriano y, por lo general, son proteínas de beta lámina que se oligomerizan en la membrana plasmática para producir poros bien caracterizados que, una vez formados, provocan una rápida muerte citolítica de las células (Rossjohn et al. J. Struct. Biol. 121:92-100,1998). Estas toxinas también son inespecíficas en su capacidad para matar células y, por tanto, no pueden ser administradas como terapia sin una toxicidad significativa. Así pues, existe la necesidad de encontrar agentes para tratar el cáncer de próstata, que sean predominantemente citotóxicos para las células cancerígenas prostáticas.

## 15 **Resumen**

La invención se define en las reivindicaciones.

En el presente se divulga una variante de moléculas de proaerolisina (PA) y los métodos para utilizarla en el tratamiento del cáncer de próstata localizado y metastático, como el cáncer de próstata de proliferación lenta.

20 En un ejemplo, una variante de molécula de PA incluye un sitio de clivaje de proteasa específico de la próstata, como el sitio de clivaje específico del antígeno específico prostático (PSA), el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) o la calicreína glandular humana 2 (HK2) que sustituye funcionalmente al sitio de clivaje de furina de la PA natural. De este modo, la administración de la variante de moléculas de PA divulgada a un sujeto con cáncer de próstata provoca la activación de las variantes de moléculas de PA en presencia de proteasa específica prostática y la lisis de las células, como las células cancerígenas prostáticas. En algunos ejemplos, la variante de moléculas de PA incluye también un dominio de unión específico del tejido prostático, para dirigirse mejor a las células cancerígenas.

Se divulgan métodos para el tratamiento del cáncer de próstata localizado y metastático utilizando la variante de moléculas de PA divulgadas. Por otra parte, se divulgan métodos para estimular el sistema inmunitario de un sujeto, con el fin de mejorar el tratamiento del cáncer de próstata localizado y metastático.

## 30 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 presenta un esquema de los dominios de proaerolisina (no ilustrados a escala) y muestra el resultado de la activación por furina.

35 La Fig. 2 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de hemólisis en el que el PSA-PA1 es preincubado con plasma humano o plasma humano al que se le ha añadido PSA enzimáticamente activo (10 000 ng/ml).

La Fig. 3 representa un gráfico que compara la toxicidad *in vitro* de varias variantes de proaerolisina que incluyen un sitio de clivaje de PSA en lugar del sitio de furina natural para la proaerolisina de tipo salvaje.

La Fig. 4 es un gráfico de barras que compara *in vivo* la especificidad de PSA-PA1 en los tumores que producen PSA (LNCaP) y los que no producen PSA (SN12C).

40 Las Figs. 5A-5M son ilustraciones esquemáticas (no representadas a escala) que muestran cómo una secuencia de proaerolisina puede ser alterada para generar diversas variantes de moléculas de PA diferentes. El símbolo «\*» representa una o más mutaciones puntuales y/o una o más deleciones que reducen la función del dominio de unión a PA (es decir, la capacidad para concentrarse en una membrana celular).

## **Lista de secuencias**

45 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos recogidas en la lista de secuencias adjunta se muestran empleando abreviaturas de letras estándar para las bases de nucleótidos y un código de tres letras para los aminoácidos. Solamente se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, aunque se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada.

50 Las SEC. ID. Nº: 1 y 2 muestran la secuencia de ADNc y proteína de la proaerolisina de tipo salvaje, respectivamente.

Las SEC. ID. Nº: 3 y 4 muestran la secuencia de ADNc y proteína de PSA-PA1, respectivamente, donde el sitio de furina de la proaerolisina ha sido sustituido por un sitio de clivaje de PSA.

Las SEC. ID. Nº: 5 y 15-21 son sitios de clivaje de PSA que se encuentran en las proteínas humanas semenogelina I y II.

Las SEC. ID. Nº: 6 y 7 muestran la secuencia de ADNc y proteína de PSA-1K, respectivamente, donde el sitio de furina de la proaerolisina ha sido sustituido por un sitio de clivaje de PSA.

Las SEC. ID. Nº: 8, 11 y 14-21 son sitios de clivaje de PSA alternativos.

5 Las SEC. ID. Nº: 9 y 10 muestran la secuencia de ADNc y proteína de PSA-PA2, respectivamente, donde el sitio de furina de la proaerolisina ha sido sustituido por un sitio de clivaje de PSA.

Las SEC. ID. Nº: 12 y 13 muestran la secuencia de ADNc y proteína de PSA-PA3, respectivamente, donde el sitio de furina de la proaerolisina ha sido sustituido por un sitio de clivaje de PSA.

La SEC. ID. Nº: 22 es la secuencia de una proteína de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) nativa.

10 La SEC. ID. Nº: 23 es la secuencia de una proteína de LHRH modificada.

La SEC. ID. Nº: 24 es la secuencia de una proteína de una variante del péptido de PA, donde el sitio de furina de PA ha sido sustituido por un sitio de clivaje de PSA y donde el dominio de unión a PA nativo ha sido sometido a delección y sustituido por la SEC. ID. Nº: 23.

15 La SEC. ID. Nº: 25 es la secuencia de una proteína de una variante del péptido de PA, donde el sitio de furina de PA se mantiene y el dominio de unión nativo a PA ha sido sometido a delección y sustituido por la SEC. ID. Nº: 23.

### Descripción detallada de varias realizaciones

#### Abreviaturas y términos

20 Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los versados andrógeno dependientes en la técnica y en la práctica de la misma. Para los fines del presente y de las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen las referencias al plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a «una variante de molécula de PA» incluye una pluralidad de estas moléculas y la referencia a «el anticuerpo» incluye la referencia a uno o más anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos por aquellos versados en la técnica, y así sucesivamente.

25 A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos del presente tienen el mismo significado que el que entenderá normalmente una persona con conocimientos en la técnica a la que pertenece la presente divulgación.

30 **Aerolisina:** Una toxina formadora de canales producida como una protoxina inactiva denominada proaerolisina (PA) (la PA de tipo salvaje se muestra en las SEC. ID. Nº: 1 y 2). La proteína de PA contiene muchas funcionalidades discretas que incluyen un dominio de unión (aproximadamente los aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. Nº: 2), un dominio de toxina (aproximadamente los aminoácidos 84-426 de la SEC. ID. Nº: 2), y un dominio de péptido inhibidor del extremo C-terminal (aproximadamente los aminoácidos 427-470 de la SEC. ID. Nº: 2) que contiene un sitio de activación de la proteasa (aminoácidos 427-432 de la SEC. ID. Nº: 2).

35 El dominio de unión reconoce y se une a los anclajes de la membrana de glicofosfatidilinositol (GPI), como los que se encuentran en Thy-1 de los linfocitos T, el producto del gen PIGA que se encuentra en las membranas de los eritrocitos y el antígeno de célula madre prostática (PSCA). La mayoría de las células de los mamíferos expresan proteínas ancladas a GPI en sus superficies. La activación del sitio de la proteólisis dentro de la proaerolisina es una secuencia de seis aminoácidos que es reconocida como un sustrato proteolítico por la familia de las proteasas de la furina. La PA es activada tras la hidrólisis de un segmento inhibidor C-terminal por parte de la furina (FIG. 1). La aerolisina activada se une a las proteínas ancladas a GPI de la membrana celular y forma un heptámero que se inserta en la membrana produciendo canales bien definidos de aproximadamente 17 Å. La formación de canales provoca la muerte celular rápida por necrosis. La aerolisina de tipo salvaje es tóxica para las células de los mamíferos, incluyendo los eritrocitos, por ejemplo a un nanomolar o menos.

**Animal:** Organismos vertebrados multicelulares vivos. Una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves.

45 **Anticuerpo:** Moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se unen específicamente a (inmunorreaccionan con) un antígeno.

50 Un anticuerpo naturalmente presente (p. ej., IgG) incluye cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces de disulfuro. Sin embargo, la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar con fragmentos de un anticuerpo naturalmente presente. De este modo, estos fragmentos de unión a antígeno también se designarán por el término anticuerpo. Algunos ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término anticuerpo son: i) un fragmento Fab que se compone de los dominios VL, VH, CL y CH1; ii) un fragmento Fd que se compone de los dominios VH y CH1; iii) un fragmento Fv que se compone de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, iv) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544-6, 1989) que se compone de un dominio VH; v) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y vi) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que se compone de dos fragmentos Fab unidos por un

puente de disulfuro en la región bisagra. Por otra parte, a pesar de que los dos dominios del fragmento Fv están codificados por genes separados, se puede hacer un conector sintético que permita hacerlos en una cadena de proteína única (conocida como cadena única Fv (scFv); Bird et al. Science 242:423-6, 1988; y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-83, 1988) a través de métodos recombinantes. Estos anticuerpos de cadena única también están incluidos. En una realización, un anticuerpo incluye anticuerpos camélidos (véase, por ejemplo, Tanha et al., J. Biol. Chem. 276:24774-80, 2001).

En un ejemplo, los fragmentos del anticuerpo son capaces de establecer enlaces cruzados con su antígeno diana, por ejemplo fragmentos bivalentes como los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, un fragmento del anticuerpo que no establece por sí mismo enlaces cruzados con su antígeno diana (p. ej., un fragmento Fab) se puede utilizar conjuntamente con un anticuerpo secundario que sirve para establecer enlaces cruzados con el fragmento del anticuerpo, estableciendo de este modo enlaces cruzados con el antígeno diana. Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales y los fragmentos pueden ser analizados para detectar su utilidad de la misma manera que se describe para los anticuerpos completos. También está previsto que un anticuerpo incluya moléculas biespecíficas y quiméricas que se unen específicamente al antígeno diana.

«Que se une específicamente» se refiere a la capacidad de los anticuerpos individuales para inmunorreaccionar específicamente con un antígeno. La unión es una reacción de unión no aleatoria entre una molécula de un anticuerpo y un determinante antigénico de la molécula de superficie de la célula T. La especificidad de unión deseada se determina típicamente a partir del punto de referencia de la capacidad del anticuerpo para unirse de forma diferenciada a la molécula de superficie de la célula T y a un antígeno no relacionado y, por tanto, para distinguir entre dos antígenos diferentes, en particular cuando ambos antígenos tienen epitopos únicos. Un anticuerpo que se une específicamente a un determinado epítipo se denomina «anticuerpo específico».

**Cáncer:** Neoplasia maligna que ha sufrido una anaplasia característica con pérdida de diferenciación, aumento de la tasa de crecimiento, invasión de tejido circundante y capaz de metástasis.

**ADNc (ADN complementario):** Una parte de ADN que carece de segmentos internos sin codificación (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc se puede sintetizar en el laboratorio por transcripción inversa del ARN mensajero extraído de las células.

**Síntesis química:** Un medio artificial por el que se puede hacer una proteína o péptido. Una proteína o péptido sintético es aquel que está hecho por medios artificiales.

**Quimioterapia:** En el tratamiento del cáncer, la quimioterapia se refiere a la administración de un compuesto o una combinación de compuestos con el objeto de matar o ralentizar la reproducción de células que se multiplican rápidamente. Los agentes quimioterapéuticos incluyen aquellos conocidos por los versados en la técnica, incluyendo, a título meramente enunciativo, 5-fluorouracilo (5-FU), azatioprina, ciclofosfamida, antimetabolitos (como fludarabina), antineoplásicos (como etopósido, doxorubicina, metotrexato y vincristina), carboplatina, cisplatino y taxanos, como el taxol y taxotere. Estos agentes se pueden administrar a un sujeto conjuntamente con las variantes de las moléculas de PA divulgadas. Alternativa o adicionalmente, se pueden administrar agentes quimioterapéuticos antes y/o después de la administración al sujeto de las variantes de las moléculas de PA divulgadas. En un ejemplo, los agentes quimioterapéuticos se administran conjuntamente con la terapia hormonal y de radiación, además de las variantes de las moléculas de PA divulgadas, para el tratamiento de un carcinoma de próstata localizado.

**Sustitución conservadora:** Sustituciones de uno o más aminoácidos (por ejemplo 2, 5 o 10 residuos) para los residuos de aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares. Típicamente, las sustituciones conservadoras tienen escaso o ningún impacto sobre la actividad de un polipéptido resultante. Por ejemplo, idealmente, un péptido de PA modificado que incluye una o más sustituciones conservadoras conserva la actividad de la proaerolisina. Se puede producir un polipéptido para que contenga una o más sustituciones conservadoras, manipulando la secuencia del nucleótido que codifica ese polipéptido, utilizando, por ejemplo, procedimientos estándar como la mutagénesis de sitio dirigido o la PCR.

Las variantes sustitutivas son aquellas en las que al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos ha sido eliminado y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Algunos ejemplos de aminoácidos que pueden ser sustituidos por un aminoácido original en una proteína y que se consideran sustituciones conservadoras incluyen: Ser por Ala; Lys por Arg; Gln o His por Asn; Glu por Asp; Ser por Cys; Asn por Gln; Asp por Glu; Pro por Gly; Asn o Gln por His; Leu o Val por Ile; Ile o Val por Leu; Arg o Gln por Lys; Leu o Ile por Met; Met, Leu o Tyr por Phe; Thr por Ser; Ser por Thr; Tyr por Trp; Trp o Phe por Tyr; y Ile o Leu por Val.

Las sustituciones permisivas son sustituciones de aminoácidos no conservadoras, pero tampoco alteran de forma significativa la actividad de la proaerolisina. Un ejemplo es la sustitución de Cys por Ala en la posición 300 de la SEC. ID. N°: 2 o 4.

Se puede obtener más información acerca de las sustituciones conservadoras, entre otros lugares, en Ben-Bassat et al., (J. Bacteriol. 169:751-7, 1987), O'Regan et al., (Gene 77:237-51, 1989), Sahin-Toth et al., (Protein Sci. 3:240-7, 1994), Hochuli et al., (Bio/Technology 6:1321-5, 1988), WO 00/67796 (Curd et al.) y en los libros de texto estándar de genética y biología molecular.

En un ejemplo, estas variantes se pueden seleccionar fácilmente para someterlas a pruebas adicionales, realizando un ensayo (como el descrito en los Ejemplos 2-5) para determinar si la variante conserva la actividad de la variante de PA.

5 **Comprende:** Un término que significa «incluye». Por ejemplo, «comprende A o B» significa que incluye A o B, o ambas A y B, a menos que se indique claramente lo contrario.

**Delección:** La eliminación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo ADN, uniendo las regiones de ambos lados.

10 **ADN:** Ácido desoxirribonucleico. El ADN es un polímero de cadena larga que comprende el material genético de la mayoría de los organismos vivos (algunos virus tienen genes que contienen ácido ribonucleico, ARN). Las unidades que se repiten en los polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales comprende una de las cuatro bases (adenina, guanina, citosina y timina) unidas a un azúcar, la desoxirribosa, a la que se une un grupo fosfato. Los tripletes de nucleótidos, denominados codones, de las moléculas de ADN codifican el aminoácido de un polipéptido. El término codón se utiliza también para las correspondientes (y complementarias) secuencias de tres nucleótidos del ARNm en el que se transcribe la secuencia de ADN.

15 **Mejorar:** Mejorar la calidad, cantidad o potencia de algo. En una realización, una terapia mejora la capacidad de un sujeto para reducir tumores, como un carcinoma de próstata, en el sujeto, si el sujeto es más efectivo combatiendo tumores. En otra realización, una terapia mejora la capacidad de un agente para reducir tumores, como un carcinoma de próstata, en un sujeto, si el agente es más efectivo reduciendo tumores. Esta mejora se puede medir utilizando los métodos divulgados en el presente, por ejemplo determinando la reducción del volumen del tumor (véase el Ejemplo 5).

**Delección funcional:** Una mutación, delección parcial o completa, inserción u otra variación realizada en la secuencia de un gen y que hace que esa parte de la secuencia del gen no sea funcional.

25 Por ejemplo, la delección funcional de un dominio de unión a PA provoca una reducción de la capacidad de PA para unirse a la membrana celular y concentrarse en la misma. Esta delección funcional se puede invertir, insertando otro dominio de unión funcional en la proaerolisina, como un dominio de unión específico prostático, por ejemplo, un péptido LHRH.

30 Algunos ejemplos de métodos que se pueden emplear para una delección funcional de un dominio de unión a proaerolisina, incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: delección de los aminoácidos 1-83 aproximadamente de la SEC. ID. N°: 2 o fragmentos de los mismos, como la de aproximadamente los aminoácidos 45-66 de la SEC. ID. N°: 2, o la inserción de una o más de las siguientes mutaciones en una variante de la secuencia de proaerolisina W45A, I47E, M57A, Y61A, K66Q (los números de los aminoácidos se refieren a la SEC. ID. N°: 2) (véase, por ejemplo, Mackenzie et al., J Biol Chem. 274: 22604-22609, 1999).

En otro ejemplo, la delección funcional del sitio de clivaje de furina de una PA nativa provoca una reducción de la capacidad de PA para ser clivada y activada por furina, en comparación con una molécula de PA de tipo salvaje.

35 **Inmovilizado:** Unido a una superficie, como una superficie sólida. Una superficie sólida puede ser polimérica, como poliestireno o polipropileno. En una realización, la superficie sólida es en forma de gránulo. En otra realización, la superficie incluye una toxina de PA modificada, y en algunos otros ejemplos incluye uno o más ligandos de unión específicos prostáticos, como el péptido LHRH, el anticuerpo de PSMA y el anticuerpo de cadena única de PSMA. Idealmente, la toxina de PA modificada se libera del gránulo, una vez que éste alcanza su objetivo en la célula prostática. Los métodos para inmovilizar péptidos sobre una superficie sólida se pueden encontrar en WO 94/29436 y en la Patente estadounidense n.º 5 858 358.

Algunos ejemplos de cómo las moléculas se pueden unir al gránulo incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: toxina de PA-sitio de clivaje de PSA-gránulo-ligando de unión prostático; o ligando de unión prostático-gránulo-sitio de PSA-toxina de PA-sitio de clivaje de PSA-inhibidor.

45 **Aislado:** Un componente biológico «aislado» (como una molécula de ácido nucleico o proteína) que ha sido sustancialmente separado o purificado de otros componentes biológicos de la célula del organismo en la que el componente se encuentra naturalmente presente (es decir otro ARN y ADN cromosómico y extracromosómico). Los ácidos nucleicos y proteínas que han sido «aislados» incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación estándar. El término también comprende los ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como los ácidos nucleicos y proteínas sintetizados químicamente.

Una célula aislada es aquella que ha sido sustancialmente separada o purificada de otros componentes biológicos del organismo en el que la célula se encuentra naturalmente presente.

**Maligno:** Células que tienen las propiedades de invasión de la anaplasia y metástasis.

55 **Mamífero:** Este término incluye tanto a los mamíferos humanos como a los no humanos. De forma similar, el término «sujeto» incluye tanto a los sujetos humanos como animales. Algunos ejemplos de mamíferos incluyen, a título meramente enunciativo, seres humanos, cerdos, vacas, cabras, gatos, perros, conejos y ratones.

**Neoplasia:** Crecimiento anómalo de las células.

**Célula normal:** Célula no tumoral, no maligna y no infectada.

**Oligonucleótido:** Una secuencia de polinucleótidos lineal de hasta 200 bases de nucleótidos de longitud, por ejemplo, un polinucleótido (como ADN o ARN) que tiene al menos unos 6 nucleótidos, por ejemplo, al menos 15, 50, 100 o 200 nucleótidos de largo.

**Operativamente unido:** Una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera mantiene una relación funcional con la segunda. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia de codificación si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. Por lo general, las secuencias de ADN operativamente unidas se encuentran contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones que codifican proteínas, en el mismo marco de lectura.

**ORF (marco abierto de lectura):** Una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación. Por lo general, estas secuencias se pueden traducir en un péptido.

**Polinucleótido:** Una secuencia de ácido nucleico lineal de cualquier longitud. Por tanto, un polinucleótido incluye moléculas que tienen al menos 15, 50, 100, 200, 400, 500, 1000, 1100 o 1200 (oligonucleótidos) y también nucleótidos tan largos como un cromosoma o ADNc en toda su longitud.

**Proaerolisina:** La protoxina inactiva de la aerolisina. El ADNc y la proteína de una proaerolisina de tipo salvaje o nativa se muestran en las SEC. ID. N°: 1 y 2, respectivamente.

En un ejemplo, una variante o modificación de una molécula de proaerolisina incluye un sitio de clivaje de proteasa específico prostático, como un sitio de clivaje específico de PSA, que permite la activación de la variante de PA en presencia de una proteasa específica prostática como PSA, PMSA o HK2 (véanse, por ejemplo, las FIG. 5C-I). En un ejemplo, se inserta un sitio de clivaje de proteasa específico prostático en el sitio de clivaje de furina nativo de PA, de forma que la PA se activa en presencia de una proteasa específica prostática, pero no de furina (véanse, por ejemplo, las FIG. 5D-I). Alternativamente, el sitio de clivaje de furina puede someterse a delección funcional utilizando la mutagénesis de la secuencia de seis aminoácidos y a la inserción de una secuencia de clivaje de proteasa específica prostática (véase, por ejemplo, la FIG. 5C). En otro ejemplo, una variante de una molécula de PA incluye también la delección o sustitución de uno o más, como al menos dos, de los aminoácidos de PA nativos. En otro ejemplo más, una variante de una molécula de PA incluye también otra molécula (como un anticuerpo o péptido) unida o añadida a (o dentro de) la variante de la molécula de PA. En otro ejemplo, una variante de una molécula de PA incluye un dominio de unión específico de tejido prostático.

En otro ejemplo, una variante de una molécula de PA incluye también un dominio de unión sometido a delección funcional (aproximadamente los aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. N°: 2). Las delecciones funcionales se pueden hacer utilizando cualquier método conocido en la técnica, como delecciones, inserciones, mutaciones o sustituciones. Algunos ejemplos incluyen, a título meramente enunciativo, la delección del dominio de unión completo (o partes del mismo (véanse, por ejemplo, las FIG. 5G-I), o la introducción de mutaciones puntuales (como las descritas anteriormente (véanse, por ejemplo, las FIG. 5D-F), que resultan en un dominio de unión con una funcionalidad reducida. Por ejemplo, una molécula de PA que tiene un dominio de unión sometido a delección funcional (y ninguna secuencia de unión de sustitución del mismo) tiene una capacidad reducida para acumularse en una membrana celular y, por tanto, lisa las células a un ritmo más lento que una secuencia de PA de tipo salvaje (véase, por ejemplo, la FIG. 5D). También se divulgan variantes de moléculas de PA en las que el dominio de unión nativo está sometido a delección funcional y sustituido por un dominio de unión específico del tejido prostático como se describe a continuación (véanse, por ejemplo, las FIG. 5E-I).

Algunos ejemplos concretos, ofrecidos a título meramente enunciativo, de una variante de las proteínas de PSA se muestran en las SEC. ID. N°: 4, 7, 10, 13, 24, y 25.

La actividad de PA modificada es la actividad de un agente en el que la lisis de las células se ve afectada. Las células incluyen, a título meramente enunciativo, las células secretoras de proteasa específica prostática, como las células secretoras de PSA, como las células cancerígenas prostáticas, como las células cancerígenas prostáticas de proliferación lenta. Los agentes incluyen, a título meramente enunciativo, proteínas de PA modificada, ácidos nucleicos, agentes de unión específicos, incluyendo variantes, mutantes, polimorfismos, fusiones y fragmentos de los mismos, divulgados en el presente. En un ejemplo, la actividad de la PA modificada se dice que está mejorada cuando los ácidos nucleicos o las proteínas de la PA modificada, en contacto con una célula secretora de PSA (como una célula cancerígena prostática), promueven la lisis y la muerte de la célula, por ejemplo, al menos un 10% o, por ejemplo, al menos un 25%, 50%, 100%, 200% o incluso un 500%, en comparación con la lisis de una célula que no produce PSA. En otros ejemplos, la actividad de la PA modificada se dice que está mejorada cuando los ácidos nucleicos y las proteínas de la PA modificada, en contacto con un tumor, reducen el volumen de las células tumorales, como un tumor prostático, por ejemplo, en al menos un 10%, por ejemplo, al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o incluso un 100% (eliminación completa del tumor).

Los ensayos que se pueden utilizar para determinar si un agente tiene una actividad de PA modificada se describen en el presente, por ejemplo, en los Ejemplos 2-5 y 9. Por ejemplo, un péptido de PA modificado puede ser evaluado

para determinar su capacidad para lisar específicamente las células que producen PSA (Ejemplos 2 y 5), ser estable en plasma humano (Ejemplo 3), ser un sustrato eficiente para la actividad enzimática de PSA (Ejemplo 9). La actividad de la proteína funcional se podría detectar mediante la lisis preferencial de células que producen PSA frente a las células que no producen PSA, reduciendo el volumen del tumor prostático, presentando una toxicidad reducida en comparación con la PA de tipo salvaje y una estabilidad incrementada en sangre en comparación con la PA de tipo salvaje.

Ensayos similares se pueden utilizar para determinar si cualquier agente de PA modificado divulgado en el presente puede reducir el volumen tumoral (tal como un tumor prostático) y lisar específicamente las células que producen PSA. Por ejemplo, los péptidos de PA modificados mostrados en las SEC. ID. N°: 4, 24 y 25 se espera que reduzcan el volumen del tumor prostático. Cualquiera de estos ensayos puede ser modificado empleando la expresión *in vivo* de un gen de PA modificado, y variantes, fusiones y fragmentos del mismo, en lugar de la administración de proteínas purificadas.

**Promotor:** Un conjunto de secuencias de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso del promotor de la polimerasa tipo II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente un facilitador distal o elementos represores que pueden estar ubicados a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción.

**Promotor específico prostático:** Un promotor que reacciona a la testosterona y otros andrógenos y que, por tanto, promueve la expresión del gen en las células prostáticas. Algunos ejemplos incluyen, a título meramente enunciativo, el promotor de la probasina, el promotor del antígeno específico prostático (PSA), el promotor del antígeno prostático específico de membrana (PSMA) y el promotor de la calicreína glandular humana 2 (HK2).

**Sitio de clivaje de proteasa específico prostático:** Una secuencia de aminoácidos que es reconocida y específica y eficientemente hidrolizada (clivada) por una proteasa específica prostática. Algunos ejemplos incluyen, a título meramente enunciativo, un sitio de clivaje específico de PSA, un sitio de clivaje específico de PSMA y un sitio de clivaje específico de HK2.

Un sitio de clivaje específico de PSA es una secuencia de aminoácidos que es reconocida y específica y eficientemente hidrolizada (clivada) por un antígeno específico prostático (PSA). Estas secuencias de péptidos se pueden introducir en otras moléculas, como PA, para producir profármacos que son activados por el PSA. Tras la activación de la PA modificada por el PSA, la PA es activada y puede ejercer su citotoxicidad. Algunos ejemplos de sitios de clivaje específicos de PSA incluyen, a título meramente enunciativo, los mostrados en las SEC. ID. N°: 5, 8, 11 y 14- 21, los divulgados en las Patentes estadounidenses n° 5 866 679 de DeFeo-Jones et al., 5 948 750 de Garsky et al., 5 998 362 de Feng et al., 6 265 540 de Isaacs et al., 6 368 598 de D'Amico et al., y 6 391 305 de Feng et al.

Algunos ejemplos concretos de sitios de clivaje específicos de PSMA se pueden encontrar en WO/0243773 de Isaacs y Denmeade (incorporada al presente por referencia). Algunos ejemplos concretos de sitios de clivaje específicos de HK2 se divulgan en WO/0109165 de Denmeade et al.

**Dominio de unión específico del tejido prostático:** Una molécula, como un ligando del péptido, una toxina o anticuerpo, que tiene una especificidad superior para las células prostáticas que para otros tipos de células. En un ejemplo, un dominio de unión específico del tejido prostático tiene una KD inferior en células o tejidos prostáticos que en otros tipos de células (es decir, se une selectivamente a tejidos prostáticos en comparación con otros tejidos normales del sujeto), por ejemplo una KD al menos 10 veces inferior, como una KD al menos 20, 50, 75, 100 o incluso 200 veces inferior. Estas secuencias se pueden utilizar para dirigir un agente, como una variante de una molécula de PA, hasta la próstata. Algunos ejemplos incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: anticuerpos que reconocen proteínas que son relativamente específicas prostáticas, como PSA, PSMA, hK2, prostasina y hepsina; ligandos que tienen receptores selectivos prostáticos como la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) natural y sintética, y endotelina (unión al receptor específico de endotelina).

**Purificado:** El término «purificado» no implica una pureza absoluta; pretende ser más bien un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de ácido nucleico o proteína sustancialmente purificada (como las toxinas de PA modificada divulgadas en el presente) es aquella en la que la proteína o el ácido nucleico al que se hace referencia es más puro que la proteína en su entorno natural dentro de una célula o dentro de una cámara de reacción de producción (según corresponda). Por ejemplo, una preparación de una proteína de PA modificada está purificada si la proteína representa al menos un 50%, por ejemplo al menos un 70%, del contenido total de proteína de la preparación. Los métodos para la purificación de proteínas y ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de métodos que se pueden emplear para purificar una proteína, como una PA modificada, incluyen, a título meramente enunciativo, los métodos divulgados en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Capítulo 17).

**Recombinante:** Un ácido nucleico recombinante es aquel que tiene una secuencia que no se encuentra naturalmente presente o tiene una secuencia que se compone de una combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otro modo estarían separados. Por lo general, esta combinación artificial se realiza mediante síntesis química o, más frecuentemente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos



nucleicos, por ejemplo mediante técnicas de ingeniería genética. Una proteína recombinante es aquella que resulta de la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica la proteína.

**Muestra:** Muestras biológicas que contienen ARN, ADNc, ADN genómico o proteína obtenidos de las células de un sujeto, como los presentes en la sangre periférica, la orina, la saliva, el semen, la biopsia de un tejido, una muestra quirúrgica, el producto de las aspiraciones con aguja fina, muestras de amniocentesis y material de una autopsia. En un ejemplo, una muestra incluye células cancerígenas prostáticas obtenidas de un sujeto.

**Similitud/identidad de la secuencia:** La similitud/identidad entre dos o más secuencias de ácido nucleico, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de la identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de la secuencia se puede medir en términos de identidad porcentual; cuanto más elevado es el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de la secuencia se puede medir en términos de similitud porcentual (que tiene en cuenta las sustituciones de aminoácidos conservadoras); cuanto más elevado es el porcentaje, más similares son las secuencias.

Los métodos de alineación de las secuencias para los fines de la comparación son bien conocidos en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang et al. *Comput. Appl. Biosci.* 8:155-65, 1992; y Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31, 1994. Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990, presenta una exposición detallada de los métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología.

La herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990) está disponible en diversas fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información Biológica estadounidense (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894), y en Internet, y se puede emplear conjuntamente con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Se puede obtener información adicional en el sitio web del NCBI.

Para las comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de unos 30 aminoácidos, se emplea la función de secuencias Blast 2, utilizando la matriz BLOSUM62 por defecto configurada conforme a los parámetros por defecto (penalización de espacio de 11 y penalización de espacio por residuo de 1). Para alinear péptidos cortos (menos de unos 30 aminoácidos), la alineación se debe realizar utilizando la función de secuencias Blast 2, empleando la matriz PAM30 configurada conforme a los parámetros por defecto (penalización por espacio abierto 9, penalización por extensión del espacio 1). Las proteínas con una similitud todavía mayor a la secuencia de referencia mostrarán identidades porcentuales mayores al evaluarlas con este método, tales como una identidad de la secuencia de al menos el 95% o incluso el 99%. Cuando se compara menos de la secuencia completa para determinar la identidad de la secuencia, los homólogos típicamente presentarán al menos un 75% de identidad de la secuencia en ventanas de comparación pequeñas de 10-20 aminoácidos, y pueden presentar identidades de la secuencia de al menos el 85%, 90%, 95% o 98%, dependiendo de su identidad con la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de la secuencia en estas ventanas pequeñas se describen en el sitio web del NCBI.

Los homólogos de las proteínas se caracterizan típicamente por poseer al menos un 70%, como al menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o incluso un 98% de identidad de la secuencia, contada sobre la alineación de toda la longitud con la secuencia de aminoácidos utilizando el NCBI Basic Blast 2.0, gapped blastp con bases de datos como la nr o swissprot. Las búsquedas realizadas con el programa blastn se filtran con DUST (Hancock y Armstrong, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:67-70). Otros programas emplean SEG.

Una persona con conocimientos en la técnica apreciará que estos rangos de identidad de las secuencias se ofrecen únicamente a título orientativo; es posible obtener homólogos muy significativos que se encuentren fuera de los rangos proporcionados. En el presente se proporcionan los homólogos peptídicos anteriormente descritos, así como las moléculas de ácido nucleico que codifican estos homólogos.

Las secuencias de ácido nucleico que no muestran un elevado grado de identidad pueden, no obstante, codificar secuencias de aminoácidos idénticas o similares (conservadas), debido a la degeneración del código genético. Los cambios en una secuencia de ácido nucleico se pueden realizar utilizando esta degeneración para producir múltiples moléculas de ácido nucleico que codifican todas sustancialmente la misma proteína. Estos péptidos homólogos pueden, por ejemplo, poseer al menos un 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de la secuencia determinada por este método. Cuando se compara menos de la secuencia completa para determinar la identidad de la secuencia, los homólogos pueden poseer, por ejemplo, al menos un 75%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de la secuencia en ventanas de comparación pequeñas de 10-20 aminoácidos. Los métodos para determinar la identidad de la secuencia en estas ventanas pequeñas se pueden encontrar en el sitio web del NCBI.

Una persona con conocimientos en la técnica apreciará que estos rangos de identidad de las secuencias se ofrecen únicamente a título orientativo; es posible obtener homólogos significativos u otras variantes que se encuentren fuera de los rangos proporcionados.

**Sujeto:** Organismo vertebrado multicelular vivo (una categoría que incluye tanto seres humanos como animales) que precisa un aumento del efecto biológico deseado. Algunos ejemplos incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: seres humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, conejos, caballos, cerdos y vacas.

**Cantidad terapéuticamente efectiva:** Una cantidad suficiente para conseguir un efecto biológico deseado, por ejemplo una cantidad que es efectiva para reducir el tamaño (es decir, volumen), los efectos secundarios y/o la metástasis del cáncer de próstata. En un ejemplo, es una cantidad suficiente para reducir los síntomas o efectos de un carcinoma de próstata, como el tamaño del tumor. En determinados ejemplos, es una cantidad efectiva para

5 reducir el tamaño de un tumor de próstata y/o una metástasis prostática en al menos un 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o incluso un 100% (eliminación completa del tumor).

En determinados ejemplos, es una cantidad de una molécula de PA modificada, efectiva para reducir un tumor de próstata y/o una cantidad de células cancerígenas prostáticas lisadas por una PA modificada, como en un sujeto al que se le administra, por ejemplo un sujeto que tiene uno o más carcinomas prostáticos. En otros ejemplos, es una

10 cantidad de una molécula de PA modificada y/o una cantidad de células cancerígenas prostáticas lisadas por esa molécula de PA modificada, efectiva para reducir la metástasis de un carcinoma prostático.

En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva también incluye una cantidad de una PA modificada y/o una cantidad de células cancerígenas prostáticas lisadas por una PA modificada suficiente para conseguir un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado. Por ejemplo, estas pueden ser una cantidad necesaria para mejorar

15 los signos y/o síntomas de una enfermedad como el cáncer, por ejemplo el cáncer de próstata.

Una cantidad efectiva de una PA modificada y/o células cancerígenas prostáticas lisadas con esta molécula de PA modificada puede ser administrada en una sola dosis, o en varias dosis, por ejemplo diariamente, durante un régimen de tratamiento. No obstante, la cantidad efectiva dependerá del sujeto que está siendo tratado, la gravedad y el tipo de trastorno que se está tratando y la manera de administración. Por ejemplo, una cantidad

20 terapéuticamente efectiva de una PA modificada puede variar de unos 1-10 mg por 70 kg de peso corporal, por ejemplo unos 2,8 mg, si se administra por vía intravenosa, y unos 10-100 mg por 70 kg de peso corporal, por ejemplo unos 28 mg, si se administra intraprostática o intratumoralmente. Por otra parte, una cantidad terapéuticamente efectiva de las células cancerígenas prostáticas lisadas con PA (variante o de tipo salvaje) puede variar de unas  $10^6$  a  $10^8$  células.

**Dosis terapéuticamente efectiva:** En un ejemplo, una dosis de PA modificada suficiente para reducir el volumen de las células tumorales, como un carcinoma de próstata, en un sujeto al que se le administra, resultando en una

25 regresión de una condición patológica, o que es capaz de aliviar signos y síntomas provocados por la condición. En un ejemplo concreto, es una dosis de una PA modificada suficiente para reducir la metástasis de un cáncer de próstata.

En otro ejemplo más, es una dosis de lisado celular resultante del contacto de las células con una PA modificada, suficiente para reducir el volumen de las células tumorales, como un carcinoma de próstata, en un sujeto al que se le

30 administra, resultando en una regresión de una condición patológica, o que es capaz de aliviar signos y síntomas provocados por el trastorno. En un ejemplo concreto, es una dosis de lisado celular resultante del contacto de las células con una PA de tipo salvaje o modificada suficiente para reducir la metástasis de un cáncer de próstata.

**Tumor:** Una neoplasia. Incluye tumores sólidos y hematológicos (o líquidos). Algunos ejemplos de tumores hematológicos incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: leucemias, incluyendo leucemias agudas (como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de

35 Hodgkin, linfoma no Hodgkin (incluyendo grado bajo, medio y alto), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadenas pesadas, síndrome mielodisplásico, linfoma de células del manto y mielodisplasia.

Algunos ejemplos de tumores sólidos, como sarcomas y carcinomas, incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, malignidad

45 linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de vejiga y tumores CNS (como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

**Transformada:** Una célula transformada es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Para los fines del presente, el término transformación abarca todas las

55 técnicas por las que una molécula de ácido nucleico se podría introducir en esta célula, incluyendo la transfección con vectores virales, la transformación con vectores plásmidos y la introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

**Célula transgénica:** Célula transformada que contiene ADN extraño, no nativo.

**Mamífero transgénico:** Mamífero transformado que contiene ADN extraño, no nativo. En una realización, el ADN no nativo es una PA modificada que incluye un sitio de clivaje de PSA, como en la SEC. ID. N°: 3, o una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína mostrada en las SEC. ID. N°: 24 o 25.

**Variantes o fragmentos o fusiones de proteínas:** La producción de una proteína de PA modificada se puede realizar de diversas formas (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 12 y 16). Las secuencias de ADN que codifican una proteína de PA modificada o una proteína de fusión, o un fragmento o una variante de una proteína (por ejemplo, un fragmento o una variante que tiene un 80%, 90% o 95% de identidad de la secuencia con una PA modificada) se pueden crear para permitir que la proteína se exprese en las células eucarióticas o de organismos, bacterias, insectos y/o plantas. Para obtener la expresión, la secuencia de ADN puede ser modificada y operativamente unida a otras secuencias reguladoras. El producto final, que contiene las secuencias reguladoras y la proteína de PA modificada terapéutica, se denomina vector. Este vector se puede introducir en las células eucarióticas, de bacterias, insectos y plantas. Una vez dentro de la célula, el vector permite la producción de la proteína.

Una proteína de fusión que incluye una PA modificada (o variantes, polimorfismos, mutantes o fragmentos de la misma) unida a otras secuencias de aminoácidos que no inhiben la actividad deseada de la proteína, por ejemplo la capacidad para lisar las células secretoras de PSA. En un ejemplo, las otras secuencias de aminoácidos no tienen más de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o 50 residuos de aminoácidos de longitud.

Una persona con conocimientos en la técnica apreciará que el ADN se puede alterar de numerosas maneras, sin afectar a la actividad biológica de la proteína codificada. Por ejemplo, la PCR se puede utilizar para producir variaciones en la secuencia de ADN que codifica una variante de la toxina de PA. Estas variantes pueden ser variantes optimizadas para la preferencia codónica en una célula hospedadora utilizada para expresar la proteína u otros cambios en la secuencia que facilitan la expresión.

**Vector:** Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula hospedadora, que produce así una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula hospedadora, como un origen de la replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

Otras definiciones de términos utilizados habitualmente en genética molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V* publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

#### **Variantes de moléculas de proaerolisina**

Las toxinas bacterianas, como la aerolisina producida por *Aeromonas hydrophilia* y una alfa-hemolisina producida por *Staph aureus*, son proteínas beta lámina que se oligomerizan en la membrana plasmática para producir poros y provocar la muerte celular citolítica rápida (FIG. 1). La formación de poros rompe físicamente las membranas celulares y provoca la muerte de las células en todas las fases del ciclo celular, incluyendo las células no proliferativas (es decir, reposo G0). No obstante, la aerolisina de tipo salvaje mata las células de forma indiscriminada. En el presente se divulga una forma de protoxina inactiva de la aerolisina (una variante de PA) que se puede dirigir hacia las proteínas específicas del cáncer de próstata y ser activada por las mismas. Una ventaja de las variantes de las moléculas de PA divulgadas para el tratamiento del cáncer de próstata localizado y metastásico es que combinan una terapia independiente de la proliferación con la administración de un fármaco específico prostático, lo que resulta en unos efectos secundarios mínimos para los pacientes. Una persona con conocimientos en la técnica entenderá que otras protoxinas, como la toxina alfa *Clostridium septicum*, la toxina delta *Bacillus thuringiensis* y la perforina humana, pueden ser sustituidas por proaerolisina.

En el presente se divulgan variantes de moléculas de PA, incluyendo secuencias de ADN y proteína, que incluyen una secuencia de clivaje de proteasa específica prostática. Algunos ejemplos de secuencias de clivaje de proteasa específicas prostáticas incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: secuencias de clivaje de PSA, PSMA y hK2. La secuencia de clivaje de proteasa específica prostática sustituye funcionalmente al sitio de clivaje de furina nativa de la PA (véanse, por ejemplo, las FIG. 5B-I). Esta sustitución resulta en una variante de proaerolisina que solamente se vuelve citolíticamente activa en presencia de proteasa enzimáticamente activa, como PSA, PSMA o hK2. El PSA es una serina proteasa con la capacidad para reconocer e hidrolizar secuencias de péptidos específicas. Es secretada por las células prostáticas normales y malignas en una forma enzimáticamente activa y se inactiva tras entrar en la circulación. Dado que ni la sangre ni el tejido normal, salvo la próstata, contienen PSA enzimáticamente activo, la actividad proteolítica del PSA se utiliza para activar protoxinas en los sitios del cáncer de próstata. Se puede utilizar cualquier sitio de clivaje de PSA, PSMA o hK2. Algunos ejemplos de sitios de clivaje de PSA incluyen, a título meramente enunciativo, los mostrados en las SEC. ID. N°: 5, 8, 11, y 14-21. En un ejemplo concreto, el sitio de clivaje de PSA incluye la SEC. ID. N°: 5.

En algunos ejemplos, el sitio de clivaje de furina de la PA (aminoácidos 427-432 de la SEC. ID. N°: 2) está sometido a delección y se ha insertado un sitio de clivaje de proteasa específico prostático, como un sitio de clivaje de PSA (véase, por ejemplo, la FIG. 5B). En otros ejemplos, el sitio de clivaje de la furina de la PA está mutado y se ha

insertado o añadido al extremo N-terminal o C-terminal de la furina un sitio de clivaje de la proteasa específico prostático, como un sitio de clivaje de PSA (véase, por ejemplo, la FIG. 5C).

También se divulgan variantes de moléculas de PA en las que el dominio de unión de PA está sometido a delección funcional (véanse, por ejemplo, las FIG. 5D-M). Estas variantes de moléculas de PA pueden contener un sitio de clivaje de furina nativo (véanse, por ejemplo, las FIG. 5J-M), en las que se consigue llegar a las células prostáticas sustituyendo funcionalmente el dominio de unión de PA por un dominio de unión específico del tejido prostático. Alternativamente, las variantes de moléculas de PA contienen un sitio de clivaje de proteasa específico prostático (véanse, por ejemplo, las FIG. 5D-I), donde la activación de la protoxina se produce principalmente en las células que secretan una proteasa específica prostática. El dominio de unión de PA incluye los aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. N°: 2. El dominio de unión se puede someter a delección funcional utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante la delección de todos o algunos de los aminoácidos del dominio de unión, como la delección de los aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. N°: 2 o 4 (véase, por ejemplo, la FIG. 5G), o a la delección de uno o más de los aminoácidos 45-66 de la SEC. ID. N°: 2 o 4 (véase, por ejemplo, la FIG. 5D, donde el \* representa una o más delecciones). En otros ejemplos, el dominio de unión está sometido a delección funcional mediante la introducción de una o más mutaciones específicas del sitio en la variante de la secuencia de PA, como W45A, I47E, M57A, Y61A y K66Q de la SEC. ID. N°: 2 o 4 (véase, por ejemplo, la FIG. 5D, donde el \* representa una o más mutaciones).

Se divulgan variantes de moléculas de PA que incluyen un dominio de unión específico del tejido prostático que sustituye funcionalmente al dominio de unión de PA nativa (véanse, por ejemplo, las FIG. 5E, 5F, 5H y 5I-M). El uso de uno o más dominios de unión específicos del tejido prostático puede mejorar la focalización en las células prostáticas y sus metástasis por parte de las variantes de moléculas de PA divulgadas. Hay varios dominios de unión específicos del tejido prostático conocidos. Algunos ejemplos incluyen, a título meramente enunciativo, la secuencia de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), como las mostradas en las SEC. ID. N°: 22 y 23, y los anticuerpos que reconocen el PSA y/o PSMA.

Uno o más de los dominios de unión específicos del tejido prostático se pueden enlazar con uno o más aminoácidos de las variantes de moléculas de PA divulgadas, aunque idealmente, no interfieren de forma significativa en la capacidad de la variante de PA para ser activada por una proteasa específica prostática, como el PSA, ni en la capacidad para formar poros en las membranas celulares. Por ejemplo, los dominios de unión específicos del tejido prostático se pueden enlazar o insertar en un extremo N-terminal o C-terminal de una variante de PA (véanse, por ejemplo, las FIG. 5E y 5H). En algunos ejemplos, el dominio de unión nativo de la PA está sometido a delección (es decir, los aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. N°: 2 o 4), de forma que la unión o el enlace de un dominio de unión específico del tejido prostático en el extremo N-terminal resulta en la unión al aminoácido 84 de la SEC. ID. N°: 2 o 4 (véanse, por ejemplo, las FIG. 5H y 5L). En otros ejemplos, se introducen delecciones más pequeñas o mutaciones puntuales en el dominio de unión nativo de la PA, de forma que la unión o el enlace de un dominio de unión específico del tejido prostático en el extremo N-terminal resulta en una unión al aminoácido 1 de la SEC. ID. N°: 2 o 4 (o en cualquier aminoácido N-terminal tras la delección funcional del dominio de unión de la PA nativa) (véanse, por ejemplo, las FIG. 5E y 5I). En algunos ejemplos, el aminoácido N-terminal de la PA se cambia por un Cys u otro aminoácido antes de unir un dominio de unión específico del tejido prostático, para ayudar al enlace del dominio de unión específico del tejido prostático a la variante de la proteína de PA.

Alternativa o adicionalmente, uno o más dominios de unión específicos del tejido prostático se pueden unir o enlazar con otros aminoácidos de una variante de una molécula de PA, como el aminoácido 215 o 300 de la SEC. ID. N°: 2 o 4 (véanse, por ejemplo, las FIG. 5F, 5I, 5K y 5M). En algunos ejemplos, un aminoácido Cys sustituye al aminoácido nativo en esa posición. Por ejemplo, se pueden realizar los siguientes cambios en la SEC. ID. N°: 2 o 4: Tyr215Cys o Ala300Cys. En un ejemplo, donde el dominio de unión específico del tejido prostático es un anticuerpo, se puede utilizar el enlace cruzado para unir anticuerpos a una variante de PA, por ejemplo haciendo reaccionar los grupos amino del anticuerpo con la cisteína que se encuentra en la variante de PA (como los aminoácidos Cys19, Cys75, Cys159 y/o Cys164 de la SEC. ID. N°: 2).

También se divulgan variantes concretas de las moléculas de PA, como las mostradas en las SEC. ID. N°: 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 24 y 25.

En algunos ejemplos, la variante de las moléculas de PA divulgadas está enlazada o inmovilizada en una superficie, como un gránulo. El gránulo también puede incluir un ligando específico prostático para mejorar la focalización en una célula prostática, como una célula cancerígena prostática localizada o metastásica.

#### **Tratamiento del cáncer de próstata utilizando proaerolisina modificada**

Las variantes de moléculas de PA divulgadas y comentadas anteriormente se activan específicamente como potentes citotoxinas dentro de los sitios del cáncer de próstata gracias a la actividad proteolítica de proteasas específicas prostáticas, como el PSA, PSMA y hK2. En algunos ejemplos, la focalización se consigue incluyendo uno o más dominios de unión específicos del tejido prostático, como el péptido de LHRH que se puede unir a su receptor específico de LHRH expresado por las células cancerígenas prostáticas, o anticuerpos de LHRH o PSMA, que se pueden unir al PSMA o la LHRH expresada en la superficie de las células cancerígenas prostáticas. Una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que el uso de una variante de una molécula de PA que incluye un sitio de clivaje de furina y un anticuerpo o péptido de LHRH puede servir para tratar otros tipos de cáncer que expresan receptores de LHRH, como el melanoma y el cáncer de mama, ovario y pulmón, utilizando las variantes de

las moléculas de PA y los métodos divulgados en el presente. Por otra parte, una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que el uso de una variante de una molécula de PA que incluye un sitio de clivaje de furina o PSMA y/o un anticuerpo de PSMA puede servir para tratar otros tipos de cáncer en los que se expresa el PSMA (p. ej., en la vasculatura del tumor), como el cáncer de mama, colon, riñón, vejiga y cerebro, utilizando las variantes de moléculas de PA y los métodos divulgados en el presente.

Las variantes de moléculas de PA divulgadas, como ácidos nucleicos y/o proteínas, se pueden administrar local o sistémicamente, utilizando cualquier método conocido en la técnica, a los sujetos que padecen un cáncer de próstata localizado o metastásico. Por otra parte, las variantes de moléculas de PA divulgadas se pueden administrar a un sujeto para la terapia inmunoestimuladora. Debido a la especificidad de la unión y activación de las variantes de las moléculas de PA divulgadas, la administración local y sistémica debería tener un efecto mínimo sobre los tejidos normales del paciente e, idealmente, producir escasos o ningún efecto secundario.

En un ejemplo, las variantes de moléculas de PA divulgadas se inyectan en la glándula prostática (intraprostáticamente) y/o en el tumor prostático (intratumoralmente) en un sujeto que padece cáncer de próstata, como un tumor localizado. Esta inyección localizada y la posterior lisis de las células cancerígenas prostáticas dentro de la glándula prostática pueden producir un efecto inmunoestimulador que provoque una reducción o eliminación de la enfermedad micrometastásica en los sujetos tratados. De este modo, la enfermedad sistémica es tratada o reducida a través de una terapia aplicada localmente y mínimamente tóxica.

Adicional o alternativamente, las variantes de moléculas de PA divulgadas se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea u oral, a un sujeto que padece cáncer de próstata, como un tumor de próstata metastásico. La terapia sistémica también puede tener un efecto antitumoral inmunoestimulador. Las variantes de moléculas de PA divulgadas que incluyen un sitio de clivaje de PSA no están hidrolizadas con proteasas séricas ni inactivan enzimáticamente el PSA dentro de la sangre. En su lugar, las variantes de moléculas de PA divulgadas no hidrolizadas se administran a través de la sangre en el fluido extracelular de los depósitos del cáncer metastásico, donde pueden ser hidrolizadas para convertirse en la toxina terapéutica activa a través del PSA enzimáticamente activo secretado por estas células cancerígenas prostáticas. Una vez hidrolizada, la toxina liberada entra en las células espectadoras que producen y que no producen PSA de la vecindad inmediata debido a su elevada capacidad de penetrar en la membrana y provoca la muerte citolítica de estas células.

También se divulga un método adicional para tratar sistémicamente el cáncer de próstata en un sujeto. En este método, las células cancerígenas prostáticas se eliminan del sujeto que padece cáncer de próstata, como un tumor de próstata metastásico. Alternativa o adicionalmente, se pueden utilizar líneas de células cancerígenas prostáticas establecidas. Algunos ejemplos de líneas de células cancerígenas prostáticas que se pueden utilizar incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: células que producen PSA, como LNCaP (como las ATTC n° CRL-1740 y CRL-10995) y CWR22R (ATCC n° CRL-2505 y Nagabhushan et al, Cancer Res. 56(13):3042-6, 1996), o células que no producen PSA, como PC-3 (ATCC n° CRL-1435) y DU 145 (ATCC n° HTB-81). Las líneas celulares o células eliminadas se incuban o ponen en contacto con las variantes de moléculas de PA divulgadas. Esta incubación provoca la lisis de las células por parte de las variantes de moléculas de PA y la producción de un lisado celular que se administra al sujeto. En un ejemplo, el método incluye también la administración de factores inmunoestimuladores, lisados de células cancerígenas prostáticas diseñados para producir factores inmunoestimuladores y/o células cancerígenas prostáticas irradiadas (incluyendo células cancerígenas prostáticas diseñadas para producir factores inmunoestimuladores). Algunos ejemplos de factores inmunoestimuladores incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: el factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF); miembros de la familia de proteínas de la interleucina, como, a título meramente enunciativo, la interleucina-2 y la interleucina-6, el factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF); y miembros de la familia del interferón, como el interferón alfa, beta o gamma. La administración de estos materiales a un sujeto puede ser simultánea al lisado celular (administración conjunta), anterior a la administración del lisado celular y/o posterior a la administración del lisado celular.

En un ejemplo, esta administración aumenta la capacidad de un sujeto para reducir el volumen de un tumor de próstata y/o tumor metastásico. Por ejemplo, los métodos divulgados pueden reducir el volumen de la célula tumoral prostática y/o el volumen de la célula tumoral metastásica, en al menos un 10%, como por ejemplo al menos un 20% o más. Por otra parte, los métodos divulgados pueden provocar una reducción de los síntomas asociados al tumor de próstata y/o al tumor de próstata metastásico.

Las variantes de moléculas de PA divulgadas se pueden administrar como una terapia de modalidad única o emplearse en combinación con otras terapias, como la terapia de radiación y/o terapias de ablación androgénica (como agonistas/antagonistas del receptor de LHRH, antiandrógenos, estrógenos, inhibidores de la síntesis de esteroides adrenales, como ketoconazol y aminoglutetimida). Por otra parte, la administración de las variantes de las moléculas de PA divulgadas puede ser aislada o combinada con un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o combinada con otros compuestos terapéuticos, tales como los que reducen la producción de anticuerpos de las variantes de las proteínas de PA administradas (como Rituximab y esteroides), así como otros agentes antitumorales.

La divulgación de determinados ejemplos específicos no tiene por objeto excluir otras realizaciones. Asimismo, todos los tratamientos descritos en el presente no excluyen necesariamente otros tratamientos, sino que pueden ser combinados con otros agentes bioactivos u otras modalidades de tratamiento.

### EJEMPLO 1

#### 5 Generación de toxinas de proaerolisina activadas por PSA

Este ejemplo describe los métodos empleados para producir las variantes de las toxinas de proaerolisina recogidas en la Tabla 1, que son activadas por el PSA. Una persona con conocimientos en la técnica entenderá que se pueden emplear métodos similares para producir otras variantes de proteínas de proaerolisina que son activadas por el PSA o cualquier otra proteasa específica prostática. Estas proteínas se pueden producir sustituyendo la secuencia de furina de la proaerolisina por un sitio de clivaje de proteasa específico prostático, como una secuencia de clivaje específica de PSA (véase el Ejemplo 9).

Tabla 1: Variantes de proaerolisina específicas de PSA

Mutante (SEC. ID N°)	Cambio(s) hecho(s) (SEC. ID. N°)	Comparación con proaerolisina de tipo salvaje ADSKVRRARSDGAGQGLRLEIPLD (aa 424-448 de SEC. ID. N°: 2)
PSA-PA1 (3&4)	KVRRAR (aa 427-432 de SEC. ID. N°: 2) cambiado por HSSKLQ(5)	ADSHSSKLQSDGAGQGLRLEIPLD (aa 424-448 de SEC. ID N°: 4)
PSA-IK. (6 & 7)	KVRRARSV (aa 427-434 de SEC. ID N°: 2) cambiado por HSSKLQSA (8)	ADSHSSKLQSDGAGQGRLEIPLD (aa 424-48 de SEC. ID. N°: 7)
PSA-PA2 (9& 10)	KVRRAR (aa 427-432 de SEC. ID. N°: 2) cambiado por QFYSSN(U)	ADSQFYSSNSVDGAGQGLRLEIPLD (aa 424-448 de SEC. ID. N°: 10)
PSA-PA3 (12 & 13)	KVRRAR (aa 427-432 de SEC. ID. N°: 2) cambiado por GISSFQS (14)	ADSGISSFQSS VDGAGQGIRLEIPLD (aa 424-448 de SEC. ID. N°: 13)

15 Las variantes o modificaciones de las proaerolisinas (PA) mostradas en la Tabla 1 incluyen una secuencia de proaerolisina (PA de tipo salvaje mostrada en las SEC. ID. N°: 1 y 2) en la que el sitio de reconocimiento de proteasa de la furina de seis aminoácidos (aminoácidos 427-432 de la SEC. ID. N°: 2) fue sustituido por un sustrato de PSA. Por ejemplo, la toxina de la variante de proaerolisina (PA) denominada PSA-PA 1 (SEC. ID. N°: 3 y 4), incluye una secuencia de PA en la que el sitio de clivaje de furina fue sustituido por el sustrato de PSA HSSKLQ (SEC. ID. N°: 5).

20 La PCR recombinante fue utilizada para sustituir el sitio de la furina de la aerolisina (aminoácidos 427-432 de la SEC. ID. N°: 2) por un sitio de clivaje específico de PSA (SEC. ID. N°: 5, 8, 11 o 14), empleando métodos anteriormente descritos (Vallette et al., Nucl. Acids Res. 17:723-33, 1988). En resumen, la PCR recombinante se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 0,2 mM de deoxinucleósido trifosfato (dNTPs), 0,5 µM de cebadores directos e inversos, 0,1 µg de ADN de plantilla y 2,5 unidades de polimerasa de pfu clonada en un tampón de reacción de pfu [20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KC1, 10 mM (NH4)2S04, 2 mM MgS04, 0,1% Triton X-100, y 0,1 mg/ml BSA].

25 La detección de las células transformadas para detectar el elemento insertado de proaerolisina se realizó mediante PCR utilizando polimerasa de Taq. Se preparó un cóctel en el tampón de reacción de la PCR [50 mM KC1, 1,5 mM MgCl2) y 10mM Tris-HCl (pH 9.0)] que contenía 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM de cebadores directos e inversos, y 5 unidades de polimerasa de Taq. Las muestras de 10 µl de este cóctel se repartieron en partes alícuotas en tubos de 0,2 ml y se añadieron las células transformadas utilizando palillos estériles.

30 Los productos finales de la PCR fueron digeridos utilizando enzimas de restricción apropiadas y posteriormente unidas al vector de clonación pTZ18u (BioRad) para la amplificación. En resumen, las digestiones de restricción se realizaron a 37°C durante 90 minutos en una solución tampón de Pharmacia One-Phor-All buffer [10 mM Tris-acetato (pH 7.5), 10 mM Mg-acetato, y 50 mM K-acetato] que contenía aproximadamente una unidad de enzima de restricción por cada µg de ADN. El elemento insertado resultante y el ADN del vector pTZI 8u se mezclaron en una

35

proporción aproximada de 5:1 y se calentaron a 45°C durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras fueron diluidas en la solución tampón One-Phor All y se añadió ATP a una concentración final de 1 mM para las uniones de los extremos cohesivos o 0,5 mM para las uniones de los extremos romos. A continuación, se añadieron 11 unidades de ADN ligasa de T4 a cada muestra y las muestras se mezclaron suavemente. Las uniones se realizaron a 13°C durante 4 horas (uniones de extremo cohesivo) o 16 horas (uniones de extremo romo).

La secuenciación de ADN se realizó para garantizar que se hubiesen hecho las sustituciones correctas. El elemento insertado fue posteriormente aislado del vector de clonación y subclonado en el plásmido de amplio rango de huésped pMMB66HE (Furste et al., Gene 48:119-131, 1986) para la expresión en *E. coli*. Las células DH5a de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método de lavado CaCl<sub>2</sub> anteriormente descrito (Cohen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-4, 1972). Las células en fase logarítmica (OD<sub>600</sub>= 0,4 – 0,7) fueron cultivadas por centrifugación y lavadas en ¼ de volumen de 100 mM MgCl<sub>2</sub> en frío. Las células fueron granuladas de nuevo y resuspendidas en dos volúmenes de 100 mM CaCl<sub>2</sub> en frío. Las células fueron incubadas en hielo posteriormente durante unos 45 minutos. Las células fueron posteriormente centrifugadas y resuspendidas en 1/10 de volumen de 100 mM CaCl<sub>2</sub>. La incubación continuó durante otro 45 minutos, antes de la adición de glicerol a una concentración final del 15%. Las células competentes fueron almacenadas a -70°C hasta el uso.

La transformación de plásmidos recombinantes en células *E. coli* competentes se realizó conforme al método de Inoue et al. (Gene 96: 23-8, 1990). Las células competentes (alícuotas de 200 µl) fueron incubadas con 0,5 - 10 ng de ADN durante una hora en hielo. Las células se sometieron posteriormente a un golpe de calor, a 42°C durante 4 minutos. Las células fueron transferidas rápidamente al hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 500 µl de medio LB a cada muestra y las células se incubaron durante una hora a 37°C con agitación suave. Se colocaron partes alícuotas (150 µl) en placas LB-agar que contenían 50 µg/ml de ampicilina. Estas placas fueron incubadas ON a 37°C.

Los clones de pMMB66HE recombinantes fueron transferidos a la cepa de *Aeromonas salmonicida* CB3 (véase Buckley, Biochem. Cell. Biol. 68:221-4, 1990) mediante conjugación, utilizando la técnica de acoplamiento de filtros de Harayama et al. (Mol. Gen. Genet. 180:47-56, 1980). El uso de esta cepa deficiente en proteasa de *A. salmonicida* resultó en la producción de variantes de proaerolisina que no estaban contaminadas por la aerolisina activada y permitió la producción de grandes cantidades de proteína. La proteína de proaerolisina final fue purificada mediante cromatografía de hidroxapatita y cromatografía de intercambio de iones como se ha descrito anteriormente (Buckley, Biochem. Cell. Biol. 68:221-4, 1990). Este método resultó en preparaciones de las proteínas de proaerolisina idénticas de lote a lote.

## EJEMPLO 2

### PSA-PA1 lisa específicamente las células productoras de PSA *in vitro*

Este ejemplo describe los métodos empleados para determinar la especificidad de las variantes de proaerolisina descritas en el Ejemplo 1. Estos métodos se pueden emplear para testar la especificidad de cualquier variante de proaerolisina que incluye un sitio de clivaje específico de PSA.

La toxina de PSA-PA 1 fue testada para determinar la presencia de células LNCaP que producen PSA (American Type Culture Collection, Manassas, VA) y células TSU que no producen PSA (Dr. T. Itzumi, Universidad de Teikyo, Japón). Las células fueron incubadas en presencia de 10<sup>-12</sup> M a 10<sup>-6</sup> M de toxina durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron contadas y valoradas en función del porcentaje de células viables, basándose en la capacidad para excluir Trypan Blue. Se determinó la concentración necesaria para matar el 50% de células (IC50) para la toxina frente a las líneas LNCaP y TSU.

La LD50 de PSA-PA1 frente a las células productoras de PSA fue de 10<sup>-10</sup> M. Sin embargo, frente a las células TSU no productoras de PSA, la LD50 fue de ~5 x 10<sup>-8</sup> M. Este resultado demuestra que la toxina de PSA-PA 1 es específicamente activada por el PSA, tal y como pone de manifiesto una diferencia de toxicidad 500 veces mayor de las líneas celulares cancerígenas humanas que producen PSA frente a las que no producen PSA.

## EJEMPLO 3

### PSA-PA1 no se activa en la sangre que contiene PSA

Las variantes divulgadas de péptidos de proaerolisina específicos prostáticos activados por proteasa, como las descritas en el Ejemplo 1, se pueden inyectar intraprostáticamente (o intratumoralmente) como terapia local para el cáncer de próstata. La toxina también se puede inyectar por vía intravenosa (o intramuscular) como terapia sistémica para el cáncer de próstata metastásico. Las variantes de moléculas de PA que incluyen un sitio de PSA no se deberían activar en sangre, dado que el PSA está enzimáticamente inactivado en la sangre debido a la presencia de un gran exceso molar de inhibidores de proteasa séricos como  $\alpha$ 1-antiquimotripsina and  $\alpha$ 2-macroglobulina.

La prueba para comprobar la activación no específica de PSA-PA1 por otras proteasas séricas y el PSA del suero humano, un ensayo de hemólisis sensible, se realizó como sigue. Se añadieron glóbulos rojos (RBC, 2% en peso) al plasma o tampón que contenía la toxina de PSA-PA 1  $\pm$  PSA. El grado de hemólisis se probó midiendo la liberación de hemoglobina en el supernatante. La adición de 0,1% de Triton resulta en una hemólisis del 100% en unos segundos y se utilizó como control positivo. La cantidad de hidrólisis se expresó como una proporción de

absorbancia de la muestra a 540 nm con respecto a la absorbancia de la muestra tratada con Triton. La preincubación de la toxina de PSA-PA 1 (10<sup>-8</sup> M) con PSA en una solución tampón acuosa solamente durante una hora antes de añadir los RBC resultó en una hemólisis aproximadamente del 45% (FIG. 2).

Para determinar si la PSA-PA 1 se activa en plasma humano, la toxina de PSA-PA 1 (10<sup>-8</sup> M) fue incubada en plasma humano al 50% durante una hora. En un experimento relacionado, el exceso de PSA (10.000 ng/ml) se añadió primero al plasma humano y se dejó incubar durante varias horas. La PSA-PA1 que contenía plasma ± PSA fue posteriormente incubada con RBC humanos (2% en peso). La adición de PSA-PA 1 al plasma humano, o plasma humano al que se le ha añadido una elevada concentración de PSA, resultó en una hemólisis inapreciable (es decir, menos del 1% del control de Triton) (FIG. 2). Estos resultados demuestran que la PSA-PA1 se puede administrar sistémicamente sin ninguna activación significativa en la sangre, incluso cuando la sangre contenga una cantidad mensurable de PSA.

#### EJEMPLO 4

##### Toxicidad *in vitro* e *in vivo* de las variantes de proaerolisina

Este ejemplo describe métodos empleados para determinar la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de las proteínas de proaerolisina modificada. Estos métodos se pueden utilizar para medir la toxicidad de cualquier variante de proteína de proaerolisina clivable por proteasa específica prostática.

Para determinar la toxicidad *in vitro*, se realizó un ensayo de viabilidad celular como sigue. Las células T de linfoma murino E14 (ATCC TIB-39) se cultivaron a 10<sup>5</sup> células por pocillo en MTS/PMS Cell Titer 96 (Promega). Las variantes de proaerolisina a 1 x 10<sup>-13</sup> M- 1 x 10<sup>-7</sup> M se añadieron como se muestra en la FIG. 3 y se incubaron con las células durante cuatro horas a 37°C. Posteriormente se determinó la viabilidad celular leyendo la placa en un lector de placas, conforme a las instrucciones del fabricante del kit MTS/PMS. Como se muestra en la FIG. 3, las variantes de proaerolisina son menos tóxicas que la proaerolisina de tipo salvaje, con una LC50 de 4 x 10<sup>-9</sup>(PSA-PA 1), 1 x 10<sup>-9</sup>(PSA-1K), y 1 x 10<sup>-7</sup> (PSA-PA2), frente a la LC50 de 1.5 x 10<sup>-10</sup> la de tipo salvaje.

Para determinar la toxicidad *in vivo*, las variantes de proaerolisina se administraron a los ratones por vía intravenosa. La proaerolisina de tipo salvaje (SEC. ID. N°: 2) fue altamente tóxica para los ratones; una dosis de 1 µg causó la muerte en una hora y la LD100 a las 24 horas (es decir, la dosis que mata al 100% de los animales en el plazo de 24 horas) tras una única inyección intravenosa fue de 0,1 /µg. Por lo contrario, la LD100 de PSA-PA1 (SEC. ID. N°: 4) 24 horas después de la inyección fue 25 veces superior (es decir, 2,5 /µg de dosis total).

#### EJEMPLO 5

##### PSA-PA1 reduce el volumen de las células tumorales que secretan PSA

Sobre la base de los datos de toxicidad descritos en el Ejemplo 4, a una serie de ratones portadores de LNCaP (xenoinjertos del cáncer de próstata de LNCaP humano que producen PSA) y a una serie de ratones portadores de SN12C (ratones de control que tienen un xenoinjerto de carcinoma renal humano que no produce PSA) se les administró una única inyección intratumoral de 100 µl con 0,25 - 25 µg de PSA-PA1 (0,1-10 veces la dosis de LD100). A las 48 horas después de la inyección, se extirparon los tumores, se fijaron y tiñeron con H&E para determinar el Ki-67 (índice proliferativo) y Tunel (índice apoptótico). El porcentaje de tumor dentro de la muestra se determinó calculando el ratio de tumor viable frente al área tumoral total siguiendo el análisis de las imágenes de secciones tumorales finas.

Como se muestra en la FIG. 4, la administración de 2,5 -25 µg de PSA-PA 1 redujo el volumen de la célula tumoral en un 85-99%, mientras que con 25 µg de PSA-PA se observó una reducción inferior al 20%. Por lo contrario, cuando a los ratones portadores de xenoinjertos de carcinoma renal humano SN12C que no produce PSA (células proporcionadas por el Dr. Isaiah Fidler, Anderson Cancer Center, Houston TX) se les inyectó PSA-PA1 intratumoralmente, no se observó ninguna reducción significativa (es decir, inferior al 25%) en el porcentaje de tumor viable con el mismo régimen de dosis (FIG. 4).

En los tumores de control (ratones SN12C), el índice proliferativo fue aproximadamente del 40%, 48 horas después de la administración de la PSA-PA 1 intratumoral. Por lo contrario, en los tumores tratados con PSA-PA 1 que respondieron al tratamiento, el porcentaje de células Ki-67 positivas fue inferior al 1% a las 48 horas. Por otra parte, en los tumores de control el índice apoptótico fue inferior al 1%, 48 horas después de la administración de la PSA-PA1 intratumoral, mientras que en los tumores tratados con PSA-PA1 todas las células fueron positivas antes de 48 horas (es decir, índice apoptótico >99%).

Estos resultados demuestran que la toxina PSA-PA1 mata eficiente y rápidamente a las células productoras de PSA y que esta citotoxicidad *in vivo* es específica y dependiente de la presencia de PSA en el fluido extracelular de los tumores.

#### EJEMPLO DE REFERENCIA 6

##### Focalización de la protoxina a través de dominios de unión específicos prostáticos

Este ejemplo describe métodos para generar y utilizar variantes de toxinas de proaerolisina activadas por proteasa específicas prostáticas en las que el dominio de unión de PA de tipo salvaje (o nativa) (aproximadamente los



aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. N°: 2) es sustituido funcionalmente por un dominio de unión específico del tejido prostático, como el péptido de LHRH. El dominio de unión nativo de PA puede ser sometido a delección funcional por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante la delección aproximadamente de los aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. N°: 2 (o fragmentos de la misma, como los 45-66), o mediante la inserción de mutaciones que reducen la capacidad de la PA para concentrarse en las membranas celulares.

El dominio de unión a las proteínas ancladas a GPI del extremo N-terminal de la PA (aproximadamente los aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. N°: 2) puede ser sometido a delección funcional (por ejemplo, mediante la delección de los aminoácidos 1-83 o mediante la inserción de mutaciones que dejan el dominio no funcional) sin afectar de forma significativa a la formación de poros. No obstante, se necesita un dominio de unión para concentrar la toxina en la membrana celular. Las proteínas mutantes que carecen del dominio de unión son citolíticas, pero solamente cuando las células están expuestas a diversos órdenes de concentraciones de magnitud superior de toxina. La mayor parte de la toxicidad *in vivo* de la variante y del tipo salvaje de la PA activada por PSA anteriormente descrita en el Ejemplo 4 se debe a la unión no específica a las proteínas ancladas a GPI expresadas por la mayoría de las células de los mamíferos. Para generar una protoxina más específica y menos tóxica a nivel sistémico, el dominio de unión a las proteínas ancladas a GPI no específico de la proaerolisina puede ser sometido a delección funcional y sustituido por un dominio de unión específico del tejido prostático.

### Anticuerpos

Un ejemplo de un fragmento de unión que se puede utilizar para focalizar una proteína de proaerolisina modificada con una alta especificidad para el tejido prostático es una proteína de fusión que incluye un anticuerpo de cadena única para una proteína de membrana específica prostática y anticuerpos que reconocen el PSMA o la LHRH fusionada a los dominios de la toxina. Idealmente, la unión del anticuerpo a una molécula de PA modificada no interferirá de forma significativa en la capacidad de la molécula para unirse a la membrana celular y concentrarse en la misma, provocando la muerte de la célula. Los anticuerpos se pueden unir al extremo N-terminal o C-terminal de una PA modificada empleando métodos de fusión de genes bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Debinski y Pastan, Clin. Cancer Res. 1:1015-22, 1995). Por ejemplo, el anticuerpo podría sustituir al pequeño lóbulo nativo de proaerolisina (aminoácidos 1-83 de la SEC. ID. N°: 2), o se podría añadir el anticuerpo a una molécula de PA con mutaciones en el dominio de unión nativo. Esta proaerolisina modificada también puede incluir una secuencia de activación de PSA para aumentar la especificidad. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única del PSMA fusionado en el dominio de la toxina de PA.

Alternativamente, los anticuerpos o fragmentos FAB se pueden unir a una PA modificada mediante enlaces cruzados covalentes (véase, por ejemplo, Woo et al., Arch. Pharm. Res. 22(5):459-63, 1999 y Debinski and Pastan, Clin. Cancer Res. 1(9): 1015-22, 1995). Los enlaces cruzados pueden ser no específicos, por ejemplo, utilizando un agente de enlace cruzado reactivo a lisina homobifuncional, o pueden ser específicos, por ejemplo utilizando un agente de enlace que reacciona con los grupos amino del anticuerpo y con la cisteína que se encuentra en la variante de proaerolisina (como los aminoácidos Cys19, Cys75, Cys159, y/o Cys164 de la SEC. ID. N°: 2).

### Ligandos

Otros fragmentos de unión que se pueden emplear son pequeños ligandos de péptidos que se unen a su receptor específico expresado en la membrana de las células cancerígenas prostáticas. Un ejemplo incluye, a título meramente enunciativo, los péptidos agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) natural y sintética (véase, por ejemplo, el número de acceso Genbank CAA25526 y las SEC. ID. N°: 22 y 23), que se unen con gran afinidad a los receptores de LHRH y péptidos que se unen selectivamente a PMSA. Los receptores de LHRH se expresan en un elevado porcentaje de los cánceres prostáticos humanos, pero no en las células hematopoyéticas. Esta expresión diferencial proporciona la especificidad de unión.

Se sabe que determinados residuos de LHRH, como Gly en la sexta posición (Gly6), pueden ser sustituidos sin comprometer la afinidad de unión del receptor (Janaky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:972-6, 1992; Nechushtan et al./ Biol Chem , 272:11597-603, 1997). Por tanto, se puede producir una variante de la toxina de PA (en la que el dominio de unión nativo está sometido a delección funcional) que está covalentemente enlazada con una LHRH purificada D-Lys6 (en la amina épsilon de esta lisina).

La LHRH D-Lys6 (SEC. ID. N°: 23) se puede unir a diversas porciones de una proteína de proaerolisina modificada que tiene un dominio de unión sometido a delección funcional. No obstante, idealmente, esto no interferirá de forma significativa en la capacidad de la toxina de insertarse en la membrana para formar un poro. Por ejemplo, la amina épsilon del análogo de D-Lys6 se puede unir al extremo amino de la proaerolisina modificada a través de un enlace de ácido dicarboxílico. El clivaje mediante furina o una proteasa específica prostática (dependiendo del sitio de clivaje presente en el péptido de la proaerolisina) provocará la liberación de la porción inhibidora C-terminal mientras que la toxina permanecerá unida al receptor de LHRH.

Alternativa o adicionalmente, la amina épsilon del análogo de D-Lys6 de LHRH se puede unir directamente al carboxilo C-terminal de la proaerolisina modificada que carece de un dominio de unión de tipo salvaje funcional, mediante la adición de Cys al extremo C-terminal de la PA modificada y, a continuación, realizando un enlace cruzado de este Cys con la amina épsilon del análogo de D-Lys6 de la LHRH. Esta unión producirá un derivado de la proteína de PA en el que el péptido de LHRH se une al dominio inhibidor C-terminal de PA. El clivaje con furina o

con una proteasa específica prostática, como PSA, liberará la toxina y dejará el fragmento inhibidor unido al receptor del LHRH. Por tanto, la formación de poros no se verá inhibida por una firme unión al receptor. Por otra parte, se pueden producir proteínas de fusión recombinantes en las que los péptidos de LHRH modificada se fusionan tanto con el extremo N-terminal como con el extremo C-terminal de la toxina de PA modificada que carece de un dominio de unión nativo funcional.

En otros ejemplos, se introduce un residuo de cisteína en la sexta posición del péptido de LHRH y el péptido unido a las toxinas de PA modificada a través de un puente de disulfuro, por ejemplo en los aminoácidos 215 y/o 300 de la SEC. ID. N°: 2, donde los aminoácidos 215 y/o 300 han sido mutados a una cisteína. En otro ejemplo, se produce una proteína recombinante en la que el péptido de LHRH se fusiona con el extremo amino-terminal de la toxina de PA modificada.

Las proteínas de proaerolisina modificada resultantes que incluyen un dominio de unión específico del tejido prostático funcionalmente sustituido por el dominio de unión de PA nativa son testadas *in vitro* e *in vivo* para determinar la especificidad de la unión y la activación de la toxina, empleando los métodos descritos en los Ejemplos 1-5.

Para demostrar que los dominios de unión específicos del tejido prostático, como LHRH o PSMA, pueden ser funcionalmente sustituidos por el dominio de unión de PA nativa, se pueden realizar los siguientes experimentos. Los métodos descritos a continuación describen el uso de una molécula en la que el dominio de unión de PA nativa ha sido sometido a delección y se ha unido la LHRH a la proaerolisina resultante. No obstante, se pueden emplear métodos similares para testar cualquier variante de molécula de PA, como las moléculas en las que se emplean otros dominios de unión específicos del tejido prostático y en las que el dominio de unión de PA está mutado (por ejemplo mediante la inserción de una o más de las siguientes mutaciones: W45A, I47E, M57A, Y61 A, K66Q, y W324A), en lugar de sometido a delección.

Se producen proteínas de LHRH-proaerolisina que contienen la secuencia de activación de furina de la PA nativa. La especificidad de la unión de estas toxinas a las células de receptor de LHRH positivo (LNCaP) y negativo (TSU) se compara empleando los métodos descritos en el Ejemplo 2. Ambas líneas celulares activan la PA que contiene el sitio de activación de furina de tipo salvaje. Por tanto, a pesar de que cada una de las líneas puede activar las proteínas de LHRH-proaerolisina, el péptido ideal es uno que es tóxico a bajas concentraciones para las células de receptor de LHRH positivo. Utilizando estos métodos, se identifican las regiones de la proaerolisina a las que se puede unir el péptido LHRH sin interferir en la formación de canales por parte de la toxina.

Para demostrar que las proteínas LHRH-proaerolisina se unen al receptor de LHRH y también son activadas por el PSA, se generan toxinas que contienen un sitio de activación de PSA en lugar del sitio de la furina, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 1. La activación de estas toxinas por parte de las células LNCaP productoras de PSA de receptor de LHRH positivo se compara con la activación de las células TSU no productoras de PSA de receptor de LHRH negativo, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 2.

Las toxinas de proaerolisina activadas por LHRH-PSA son testadas *in vivo* para demostrar que la introducción del fragmento de unión de LHRH resulta en un descenso de la toxicidad no específica y en un incremento de la capacidad de focalización. Como se ha descrito anteriormente, la LD100 de estas toxinas tras una única inyección intravenosa se determina y compara con la correspondiente toxina activada por PSA que no contiene LHRH, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 4. Posteriormente, la toxina se administra a diversas dosis, como de 0,1 µg a 1 mg, por vía intravenosa, a animales portadores de LNCaP para demostrar que a unas dosis más elevadas y menos tóxicas de toxina se observa un efecto antitumoral mejorado.

## EJEMPLO 7

### Determinación de la antigenicidad de la proaerolisina

Este ejemplo proporciona métodos para determinar si los péptidos de proaerolisina modificados divulgados en el presente son antigénicos. Por otra parte, se divulgan métodos para reducir la potencial antigenicidad.

Como se describe en los Ejemplos anteriores, la inyección intratumoral de PSA-PA1 (SEC. ID. N°: 4) demuestra la utilidad de la toxina como terapia para el cáncer de próstata localizado a través de una inyección intraprostática. No obstante, esta terapia también se puede administrar por otras vías, como intravenosa (iv), intramuscular, oral, etc., como terapia sistémica para el cáncer de próstata metastásico. No obstante, la administración sistémica de las variantes de péptidos de PA divulgadas en el presente puede provocar el desarrollo de una reacción del anticuerpo neutralizador que limitaría la dosificación repetida.

La cinética y magnitud de la reacción del anticuerpo a cualquiera de las variantes de PA divulgadas en el presente se pueden determinar como sigue. Por ejemplo, la respuesta antigénica a PSA-PA1 (SEC. ID. N°: 4) se puede determinar en ratones inmunocompetentes, para determinar un régimen de dosificación que se puede emplear en un ser humano inmunocompetente. A los ratones inmunocompetentes (C57-BL6) se les administran dosis intravenosas de PSA-PA1 (SEC. ID. N°: 5) tanto diariamente x 5 como semanalmente x 3 a un régimen de dosis de 0,1 µg a 5 µg. Los ratones son sacrificados a diversos intervalos (p. ej., tras una única dosis, tras múltiples dosis) y se obtiene suero. Se puede utilizar un ensayo basado en ELISA para detectar la presencia de anticuerpos contra la proaerolisina. En este ensayo, se fija una cantidad definida de proaerolisina a la superficie de poliestireno en placas

de 96 pocillos. Tras bloquearlos adecuadamente con albúmina de suero bovino (BSA), el suero de los ratones expuesto a la proaerolisina se añade a los pocillos a diversas diluciones. Tras un tiempo de incubación definido, los pocillos son lavados y se añade anticuerpo secundario de cabra anti-ratón unido a fosfatasa alcalina, seguido del sustrato. La cantidad de anticuerpo presente se determina midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, que permite determinar el marco temporal y la magnitud de la reacción del anticuerpo a través de diversos programas y dosis intravenosas de PSA-PA1.

Para reducir la antigenicidad de la proaerolisina, el dominio de unión nativo puede ser sometido a delección funcional y sustituido, por ejemplo por LHRH, tal y como se describe en el Ejemplo 6. La antigenicidad de estos péptidos se puede determinar tras la exposición a diversos regímenes de proteínas de LHRH-proaerolisina, que carecen de porciones del dominio de unión nativo, utilizando los métodos anteriormente descritos. Otro método que se puede emplear para permitir el tratamiento continuado con toxinas activadas por proteasa específica prostática consiste en utilizar toxinas líticas alternativas con una antigenicidad no solapada (véase el Ejemplo). Un ejemplo consiste en utilizar una toxina bacteriana modificada relacionada estructuralmente, como la toxina alfa Clostridium septicum que también se puede activar con una proteasa específica prostática, como PSA, pero no sería reconocida ni neutralizada por los anticuerpos que reconocen la PA (véase el Ejemplo 10). Otro ejemplo consiste en utilizar una toxina formadora de poros producida por los tejidos humanos, como la perforina humana producida por las células T humanas citolíticas. Las perforinas modificadas en las que la secuencia de activación de tipo salvaje es sustituida por péptidos que son sustratos para proteasas específicas prostáticas, como PSA, se pueden administrar sin producir una reacción del anticuerpo porque las proteínas son de origen humano.

Por otra parte, se proporcionan métodos para determinar si el anticuerpo producido puede neutralizar las propiedades citolíticas de la aerolisina. Una PA modificada divulgada (como en las SEC. ID. N<sup>o</sup>: 4, 24 y 25) es incubada con PSA para activar la toxina. La toxina activada es incubada con anticuerpo que contiene suero a diversas dosis. Los RBC lavados se añaden para determinar el grado de hemólisis frente al control (toxina expuesta no sérica), como se describe anteriormente en el Ejemplo 2.

Por otra parte, los animales portadores del tumor productor de PSA pueden ser inoculados dos veces con toxinas de proaerolisina activadas por PSA, para posteriormente administrarles una dosis de recuerdo letal de toxina (véase el Ejemplo 4) al objeto de determinar si el anticuerpo neutraliza la toxicidad *in vivo*. Posteriormente, se valora la respuesta antitumoral tras la inyección intratumoral de los animales vacunados, para determinar si los anticuerpos neutralizan la toxina cuando se inyecta intratumoralmente.

## EJEMPLO 8

### Inducción de una respuesta inmunoestimuladora sistémica

Este ejemplo proporciona los métodos que se pueden emplear para demostrar que la lisis celular mediada por proaerolisina produce un efecto inmunoestimulador sistémico. Este efecto inmunoestimulador sistémico resultante de una administración intraprostática de las toxinas divulgadas en el presente proporcionaría una terapia local para el cáncer de próstata dentro de la glándula prostática, induciendo simultáneamente un efecto antitumoral sistémico contra la enfermedad micrometastásica oculta. Alternativa o adicionalmente, los sujetos pueden ser vacunados con células cancerígenas prostáticas lisadas con proaerolisina modificada en presencia o ausencia de citoquinas, como GMCSF, para tratar la enfermedad metastásica inicial o recurrente.

### Administración de células tumorales prostáticas lisadas con proaerolisina modificada

Para demostrar que las células tratadas con proaerolisina modificada estimulan una respuesta inmunológica sistémica en un sujeto, se pueden emplear los siguientes métodos. En resumen, a los sujetos (como un ratón inmunocompetente o un sujeto humano que padece cáncer de próstata) se les administran células tumorales prostáticas (como células tumorales prostáticas de ratón TC2, células cancerígenas prostáticas del sujeto que padece cáncer de próstata y/o líneas de células cancerígenas prostáticas humanas para la administración a pacientes) que han sido lisadas con una o más moléculas de proaerolisina modificada divulgadas en el presente. Para determinar si ocurre una respuesta inmunológica sistémica, a los ratones que se les han administrado células cancerígenas prostáticas lisadas se les puede administrar una dosis de recuerdo con las mismas células para medir el crecimiento de estas células tumorales inoculadas. Por ejemplo, a los ratones C57-BL6 se les inyecta subcutáneamente células TC2 lisadas con proaerolisina. Para ello,  $10^7$  células TC2 son lisadas mediante incubación con proaerolisina durante una hora a 37°C en solución tampón de fosfatos (PBS). A los animales se les administran dos inyecciones semanales de este lisado celular para estimular la respuesta inmunológica a las células TC2. Posteriormente a los animales se les administra una dosis de recuerdo mediante una inyección subcutánea de células cancerígenas TC2, una semana después de la segunda inoculación del lisado. TC2 es una línea de células cancerígenas prostáticas de ratón obtenida del tejido canceroso aislado de un ratón TRAMP (Foster et al, Cancer Res. 57:3325-30, 1997). Los sujetos de control recibirán un número similar de células que han sido lisadas mediante congelación y descongelación o que han sido tratadas con radiación para inducir la apoptosis. Otro grupo de control recibirá solamente el péptido de proaerolisina modificada. El crecimiento tumoral se compara entre los grupos utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 5.

Para los sujetos humanos, las células cancerígenas prostáticas se pueden obtener del paciente en el momento de la prostatectomía o de la biopsia, o se pueden emplear líneas de células cancerígenas prostáticas humanas. Algunos

ejemplos de líneas de células cancerígenas prostáticas humanas incluyen la LNCaP productora de PSA (como ATCC n° CRL-1740 y CRL-10995) o células CWR22R (ATCC n° CRL-2505 y Nagabhushan et al, Cancer Res. 56(13):3042-6,1996), o PC-3 no productoras de PSA (ATCC No. CRL-1435) y DU 145 (ATCC n° HTB-81). Aproximadamente,  $10^7$ - $10^3$  células de cualquier fuente (paciente o líneas celulares) se incuban con 1 µg de PA (tipo salvaje o variante) durante una hora a 37°C en PBS estéril. El lisado resultante se mezcla bien agitando fuertemente las pipetas y la suspensión se administra a un sujeto mediante inyección subcutánea de unos 0,5 ml. Los pacientes pueden ser tratados semanalmente con tres dosis. Se controla de cerca de los pacientes, con exploraciones físicas semanales. La respuesta inmunológica a la PA subcutánea se puede controlar testando la presencia de anticuerpos para PSA, PSMA y hK2, y testando la respuesta de las células B y T, utilizando la metodología anteriormente descrita (Simons et al. Cancer Res. 59:5160-8, 1999).

Alternativa o adicionalmente, las células cancerígenas prostáticas de un paciente o las líneas de células cancerígenas prostáticas diseñadas para expresar proteínas inmunoestimuladoras (como GM-CSF) son incubadas con PA (de tipo salvaje o variante) y utilizadas para producir el lisado (véase, por ejemplo, Simons et al. Cancer Res. 59:5160-8, 1999). Las células cancerígenas prostáticas lisadas con PA pueden ser administradas conjuntamente con las células cancerígenas prostáticas irradiadas que producen moléculas inmunoestimuladoras. La irradiación provoca la apoptosis de las células. Se espera que la combinación de células matadas mediante citolisis y células matadas mediante inducción de la apoptosis produzca efectos inmunoestimuladores superiores (Sauter et al. J. Exp. Med 191:423-33, 2000). En un ejemplo, a un sujeto se le administran conjuntamente células cancerígenas prostáticas lisadas con PA combinadas con proteína inmunoestimuladora. En otro ejemplo, las células cancerígenas prostáticas lisadas con PA se administran subcutáneamente y una proteína inmunoestimuladora, como GM-CSF, interleucinas, interferones, G-CSF (Dranoff et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3539-43, 1993) se administra sistémicamente.

#### **Administración intraprostática de proaerolisina modificada**

Otro método que se puede emplear para estimular una respuesta inmunológica sistémica en un sujeto que padece cáncer de próstata consiste en administrar las toxinas de proaerolisina modificada divulgadas en el presente directamente en la glándula prostática del sujeto. Por ejemplo, las toxinas de proaerolisina modificada se pueden administrar directamente en la glándula prostática (o el propio tumor) de un sujeto humano que tiene un tumor de próstata o en ratones ProHA transgénicos seguida de una transferencia adoptiva de células T sensibilizadas a la hemaglutinina (HA). Se espera que la citolisis tras la inyección intraprostática de toxinas de proaerolisina modificada provoque la respuesta inmunológica a la HA en la glándula prostática del ratón ProHA o a los antígenos tumorales prostáticos en los seres humanos. El ratón transgénico ProHA expresa la HA de la proteína de la influenza bajo el control del promotor de probasina específico prostático. El ratón ProHA expresa la HA solamente en la glándula prostática. En este sistema, las células T CD4 y CD8 específicas de un ratón donante diferente son sensibilizadas mediante exposición a HA y posteriormente sometidas a transferencia adoptiva al ratón transgénico de HA.

A los sujetos se les administra una dosis intraprostática subletal de proaerolisina modificada (por ejemplo, determinada empleando los métodos descritos en el Ejemplo 4). Dado que los ratones ProHA no producen PSA ni un homólogo enzimáticamente equivalente, se utiliza la aerolisina de tipo salvaje. No obstante, en seres humanos se administran una o más de las toxinas de proaerolisina modificada divulgadas. Veinticuatro horas después de la inyección intraprostática, algunos ratones son sacrificados y se les extirpan las próstatas para analizar el grado de necrosis. A un segundo grupo de ratones inyectados se les administrarán células T CD4 y CD8 específicas de HA, que han sido obtenidas de donantes transgénicos TCR inoculados con  $10^9$  pfu de hemaglutinina recombinante que expresa el virus de las vacunas anteriormente descrito (Staveley-O'Carroll et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1178-83,1998). Estas células T son Thy 1.1 y son transferidas a los ratones ProHA que son Thy1.2+. Cuatro días después de la transferencia adoptiva a los ratones ProHA tratados con proaerolisina, los ratones receptores son sacrificados para extirpar, disociar y lavar el bazo, los nódulos drenantes prostáticos y axilares (irrelevantes).

Para evaluar la activación de las células T específicas, se pueden realizar los siguientes ensayos: un millón de células aisladas se tiñen utilizando un anticuerpo anti-Thy 1.1. marcado con ficoeritrina y un anticuerpo anti-CD4 o CD8 marcado con citocromo (Pharmingen, San Diego, CA). Las células aisladas son analizadas utilizando FacsScan (Becton Dickinson). El índice de expansión de las células T específicas de HA se calcula dividiendo el porcentaje de células clonotípicas (Thy 1.1+) de los animales tratados con ProHA por el porcentaje de células clonotípicas en una ubicación tisular idéntica de los controles ProHA no tratados. Por otra parte, el ratio del porcentaje de células clonotípicas en el drenaje prostático frente a los nódulos linfáticos irrelevantes proporciona un índice de proliferación específica prostática tras el tratamiento con PA. En otro ensayo, la proliferación específica del antígeno se mide como se ha descrito anteriormente (Adler et al. J. Exp. Med. 187:1555-64, 1998). En resumen, el grupo de linfocitos o esplenocitos es incubado con el péptido de clase II HA (proliferación específica de células CD4) o con el péptido de clase I HA (proliferación específica de células CD8). Las células son cultivadas durante tres días y después pulsadas con timidina tritiada durante una noche; posteriormente, son cosechadas y se determinan los recuentos. Los recuentos incorporados mayores con respecto al control significan la activación de células T específica.

Las glándulas prostáticas de los ratones ProHA tratados con PA que han recibido células T Thy 1.1 específicas de HA se analizan como sigue. Las secciones prostáticas fijadas de los ratones tratados se tiñen con el anticuerpo de Thy 1.1 biotinilado (Pharmingen) y se contratiñen con peroxidasa de estreptavidina empleando procedimientos

inmunohistoquímicos estándar. Para determinar el grado de estimulación, el grado de teñido positivo se compara con los controles tratados con solución salina.

Para valorar si la proaerolisina intraprostática puede afectar al desarrollo, al crecimiento o al patrón de propagación tumoral posterior, se pueden emplear los siguientes métodos. La proaerolisina (o los péptidos de proaerolisina modificada divulgados en el presente) se puede inyectar en la próstata de ratones TRAMP en diferentes puntos temporales del ciclo vital del animal (prepubescente, postpubescente antes de la enfermedad metastásica, con enfermedad metastásica). Los animales anestesiados son inyectados intraprostáticamente en condiciones estériles. En diversos puntos temporales tras la inoculación intraprostática, los animales son sacrificados y se les practica una necropsia para evaluar el alcance del tumor. Se extirpan las glándulas prostáticas y se realiza un análisis inmunohistoquímico para evaluar la presencia de lesiones precursoras y cáncer de próstata manifiesto. De forma similar, a los animales TRAMP prepubescentes se les pueden administrar dos veces por vía subcutánea las células TC2 lisadas con proaerolisina o los tumores primarios lisados con proaerolisina obtenidos de ratones TRAMP que padecen un cáncer en fase avanzada. Estos animales son controlados y sacrificados en puntos temporales definidos, para evaluar el marco temporal y la magnitud del desarrollo del tumor en comparación con los controles.

Se puede utilizar un planteamiento similar para administrar PA modificada a los pacientes con cáncer de próstata localizado. Esta terapia de PA modificada intraprostática se puede utilizar como tratamiento inicial para el cáncer de próstata localizado, de forma aislada o en combinación con radiación (braquiterapia o haz exterior) y/o terapia de ablación androgénica. La terapia de PA modificada intraprostática también se puede administrar a los pacientes en los que la terapia de radiación ha fracasado y que se sospecha que solamente padecen una recurrencia local del cáncer de próstata dentro de la glándula prostática. La terapia de PA modificada intraprostática también se puede administrar a pacientes con cáncer de próstata localizado y metastásico para tratar el cáncer localizado directamente y para tratar el cáncer metastásico mediante la estimulación de una respuesta inmunológica antitumoral sistémica.

Para producir la terapia de PA modificada intraprostática, la PA modificada se inyecta en la glándula prostática de los pacientes, conforme a una plantilla predefinida similar a la utilizada para administrar braquiterapia intraprostática. Las técnicas y equipos necesarios para la administración intraprostática también son similares a los utilizados para la braquiterapia y se han descrito anteriormente (Deweese et al, Cancer Res. 61:7464-72, 2001). Para determinar la dosis apropiada que se debe administrar intraprostáticamente, se realiza un ensayo clínico de cálculo de dosis. Los pacientes recibirán múltiples inyecciones (20-80) en sitios predefinidos para abarcar toda la glándula prostática. La dosis total administrada de PA modificada oscilará entre 0,1 y 1,0 mg, y no será superior a 10 mg en total. La dosis por inyección se determinará dividiendo la dosis total por el número de inyecciones total. Los pacientes son tratados en ingreso hospitalario y controlados en el centro durante 48 horas tras la inyección. Posteriormente, los pacientes serán examinados semanalmente para determinar la presencia de signos de toxicidad. El MR1 de la próstata se puede emplear para controlar el efecto directo del tratamiento sobre el tamaño prostático. La respuesta inmunológica a la PA intraprostática se controlará como se ha descrito anteriormente (Simons et al. Cancer Res. 59:5160-8,1999).

## EJEMPLO 9

### Sitios de clivaje de PSA adicionales

Los sitios de clivaje de PSA adicionales son conocidos, basándose en el mapa de clivaje de PSA de las proteínas seminales humanas, semenogelina I y II, y un ensayo basado en la membrana de celulosa (véase la Tabla 2 y Denmeade et al., Cancer Res., 57:4924-30, 1997). Los sitios de clivaje de PSA mostrados en la Tabla 2 pueden sustituir al sitio de activación de la proteasa de la furina de tipo salvaje de la proaerolisina (aminoácidos 427-432 de la SEC. ID. N°: 2), utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 1. En resumen, la PCR recombinante se puede utilizar para sustituir el sitio de la furina de la PA por un sitio de clivaje específico de PSA, como los mostrados en las Tablas 1 y 2. La variante de la secuencia de PA es subclonada en pMMB66HE para la expresión en *E. coli*. Los clones recombinantes son transferidos a una cadena deficiente en proteasa de *A. salmonicida* y la variante de proteína de proaerolisina resultante es purificada mediante cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de intercambio de iones.

Tabla 2. Cinética de la hidrólisis de PSA.\*

Sustrato de PSA (SEC. ID. N°)	$K_m(\mu M)$	$K_{cat}(s^{-1})$	$K_{cat}/K_m(s^{-1}M^{-1})$
KGISSQY (15)	160	0,043	270
SRKSQQY (16)	90	0 023	260
ATKSKQH (17)	1310	0 0091	6 9
KGLSSQC (18)	300	0 0017	5 6
LGGSSQL (19)	900	0 0037	4.1
EHSSKLQ (20)	1165	0012	10 6
HSSKLQ (5)	470	0011	23 6

SKLQ(21)	813	0.020	24 6
----------	-----	-------	------

Los péptidos fueron marcados por fluorescencia (aminometil cumarina). Se realizaron ensayos en 50 mM Tris, 0,1 M NaCl, pH 7.8.

5 Las secuencias mostradas en la Tabla 2 incluyen sustratos que fueron eficiente, aunque no específicamente, hidrolizados con PSA (KGISSQY; SEC. ID. N°: 15) y SRKSQQY; SEC. ID. N°: 16), y los que no fueron eficiente, aunque sí específicamente, hidrolizados con PSA (ATKSKQH; SEC. ID. N°: 17 y LGGSSQL; SEC. ID. N°: 19). Las características de estas toxinas modificadas se pueden comparar con la secuencia de PSA-PA 1 que contiene la secuencia HSSKLQ (SEC. ID. N°: 5). Como control, se produce una toxina modificada en la que el sitio de activación está completamente sometido a delección (EX-PA).

10 Estas toxinas purificadas son estudiadas para detectar la presencia de hidrolisis de PSA utilizando el ensayo de hemólisis descrito en el Ejemplo 3. La proaerolisina de tipo salvaje no es activada o es citolítica para los eritrocitos. No obstante, la activación de la proaerolisina con proteasas provoca una rápida hemólisis. En resumen, para testar la activación de PSA, se incuban diversas concentraciones de variantes de toxinas de PA purificadas con PSA durante una hora, se lavan y se les añaden glóbulos rojos (RBC) libres de suero (2% en peso). Cuando ha transcurrido otra hora, las mezclas de la incubación se centrifugan y se determina la absorbancia del supernatante a 15 540 nm. La concentración mínima de toxina modificada necesaria para lisar el 50% de los RBC se determina para clasificar las toxinas en función de la eficiencia para la hidrólisis de PSA.

20 Para determinar tanto la activación de PSA como la especificidad de la activación, se realizan ensayos de citotoxicidad exponiendo las toxinas de PSA-proaerolisina purificadas a líneas de células cancerígenas que producen PSA (LNCaP) y que no producen PSA (TSU) *in vitro*, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 2. La concentración necesaria para matar el 50% de las células (IC50) se puede determinar para cada variante de toxina de PA con respecto tanto a las líneas de LNCaP como a las de TSU. La diferencia porcentual en la citotoxicidad se emplea para clasificar las toxinas activadas por PSA en función de la especificidad.

25 Las variantes de las toxinas de PA también se pueden estudiar *in vivo* para determinar la actividad antitumoral mediante una inyección intratumoral en los xenoinjertos de LNCaP que producen PSA en los ratones desnudos, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 5. Como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5, la inyección intratumoral de la toxina de PAS-PA 1 reduce el tumor en el plazo de 48 horas. Por lo contrario, la proaerolisina de tipo salvaje, que es activada más eficientemente tanto por las líneas celulares que producen PSA como por las que no producen PSA *in vitro*, tuvo un efecto mínimo sobre los xenoinjertos de LNCaP. Esto indica que la cinética de la activación de la toxina puede ser importante para el efecto antitumoral general. La PSA-PA 1 es activada más específicamente por el PSA, aunque la cinética de la activación es más lenta que con la toxina de tipo salvaje. Esto puede permitir que la PSA-PA 1 se distribuya más ampliamente por todo el tumor. Por tanto, paradójicamente, los mejores sustratos de PSA del sitio de activación pueden provocar un efecto antitumoral general reducido *in vivo*.

35 Para evaluar la distribución de la proaerolisina activada por PSA frente a la PA de tipo salvaje, intratumoralmente o en el tejido normal, se pueden emplear las proteínas de PA y PSA-PA 1 marcadas fluorescentemente (como FITC). Los xenoinjertos de LNCAP que producen PSA son inyectados con la PA y la PSA-PA1 marcadas fluorescentemente. A las 24 horas de la inyección intratumoral, los tumores son extirpados, fijados y seccionados para el análisis microscópico. Las proteínas de la proaerolisina marcadas fluorescentemente que se han insertado en las membranas celulares son retenidas durante todo el proceso de fijación. Estas secciones son posteriormente analizadas utilizando un microscopio fluorescente equipado con el correspondiente conjunto de filtros para 40 determinar el grado de distribución de las toxinas de proaerolisina en toda la muestra tumoral.

Posteriormente, las variantes de toxinas de PA son inyectadas en los xenoinjertos de LNCaP y se valora la respuesta antitumoral mediante la medición del tumor una vez transcurridas 48 horas, empleando los métodos descritos en el Ejemplo 5. Las variantes de las toxinas de PA son clasificadas en función del efecto antitumoral *in vivo* tras la inyección intratumoral.

45 Por otra parte, las variantes de toxinas de PA pueden ser testadas para valorar la toxicidad sistémica general, determinando la dosis que mata al 100% de los ratones (es decir, la LD<sub>100</sub>) tras una única inyección intravenosa, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 4.

50 Utilizando estos métodos, se identifica que las variantes de toxinas de PA activadas por PSA son más eficiente y específicamente activadas por PSA, menos tóxicas a nivel sistémico y que producen el efecto antitumoral más pronunciado *in vivo*. Estas variantes de toxinas de PA activadas por PSA también se pueden modificar utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 6.

## EJEMPLO 10

### Reducción de la antigenicidad de la toxina de proaerolisina modificada activada por PSA

55 Este ejemplo describe otros métodos que se pueden utilizar para producir y caracterizar la antigenicidad y la eficacia antitumoral de otras protoxinas activadas por proteasa formadora de poros modificada.

Un método para superar la potencial antigenicidad de las variantes de toxinas de PA divulgadas consiste en administrar secuencialmente protoxinas estructuralmente relacionadas que son activadas por PSA de forma similar, que no son reconocidas por los anticuerpos de la proaerolisina. Algunos ejemplos de estas protoxinas incluyen, a título meramente enunciativo, la toxina alfa *Clostridium septicum* (Ballard et al., Infect. Immun. 63:340-4, 1995; Gordon et al. J. Biol. Chem. 274:27274-80, 1999; acceso Genbank nº S75954), la toxina delta *Bacillus Thuringiensis* (acceso Genbank nº D00117), y la perforina humana (acceso Genbank nº NM005041). A pesar de que mecánicamente son similares a la aerolisina, estas protoxinas tienen secuencias peptídicas diferentes, de forma que los anticuerpos específicos de la proaerolisina no las reconocerían. Estas protoxinas han sido clonadas y se han producido formas recombinantes (Imagawa et al., FEMS. Microbiol. Lett. 17:287-92, 1994; Meza et al. FEMS Microbiol. Lett. 145:333-9, 1996).

Estas protoxinas, como la proaerolisina, contienen un péptido inhibidor C-terminal que debe ser eliminado mediante clivaje proteolítico para que se produzca la activación. El sitio de activación dentro de cada una de estas protoxinas ha sido definido. Para la toxina alfa *Clostridium septicum*, el sitio de activación es un sitio de clivaje de furina (Gordon et al, Infect Immun 65:4130-4, 1997). El sitio de activación de la toxina delta *Bacillus Thuringiensis* es clivado por proteasas en el intestino medio de determinados insectos (Miranda et al., Insect Biochem. Mol. Biol. 31:1155-63, 2001). Para la perforina humana, la secuencia de activación se ha definido, aunque todavía no se ha identificado la proteasa de activación (Uellner et al, EMBOJ. 16:7287-96, 1997).

El sitio de activación de cada una de estas protoxinas puede ser modificado para contener un sitio de clivaje de proteasa específico prostático (como los sitios de clivaje de PSA mostrados en las Tablas 1 y 2), utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 1. Si se desea, el dominio de unión a la protoxina nativo puede ser sometido a delección funcional y sustituido por un dominio de unión específico del tejido prostático, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 6. Alternativamente, el sitio de activación no se modifica, pero el dominio de unión es sometido a delección funcional y sustituido por un dominio de unión específico del tejido prostático, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 6. Estas protoxinas modificadas son sometidas a ensayo para determinar la activación de la proteasa, por ejemplo empleando el ensayo de hemólisis de RBC (Ejemplo 3), la actividad *in vitro* frente a las líneas celulares que producen PSA y que no producen PSA (Ejemplo 2) y la estabilidad en suero humano (Ejemplo 3). Si estas toxinas son específica y eficientemente activadas por el PSA, entonces son testadas *in vivo* para determinar la actividad frente a los xenoinjertos que producen PSA, empleando los métodos descritos en el Ejemplo 5. Por otra parte, la cinética y la magnitud de la producción de anticuerpo se determinarán empleando los métodos descritos en el Ejemplo 7. El suero de los animales tratados con cada una de las toxinas es analizado para determinar la reactividad cruzada con cada uno de los demás miembros de la familia de las toxinas y así averiguar el grado de reconocimiento cruzado.

Otro método para reducir la respuesta inmunológica sistémica consiste en administrar terapias inmunosupresoras. Algunos ejemplos de terapias inmunosupresoras incluyen, a título meramente enunciativo, los corticosteroides sistémicos o tópicos (Suga et al., Ann. Thorac. Surg. 73:1092-7, 2002), la ciclosporina A (Fang et al., Hum. Gene Ther. 6:1039-44, 1995), la ciclofosfamida (Smith et al., Gene Ther. 3:496-502, 1996), la desoxispergualina (Kaplan et al., Hum. Gene Ther. 8:1095-1104, 1997) y anticuerpos de las células T y/o B [p. Ej., ligando anti-CD40, anticuerpos anti-CD4, anticuerpo anti-CD20 (Rituximab)] (Manning et al., Hum. Gene Ther. 9:477-85, 1998). Estos agentes se pueden administrar antes, durante o después de la administración de las moléculas de PA modificada y/o los lisados celulares producidos mediante incubación con PA (variante o de tipo salvaje).

## EJEMPLO 11

### Producción de variantes de secuencias

En el presente se divulgan agentes y métodos para tratar el cáncer de próstata mediante la administración de un péptido de proaerolisina modificada que incluye un sitio de clivaje de proteasa específico prostático. Aquellos versados en la técnica entenderán que el uso de otras secuencias de proaerolisina, PSA, LHRH y PSMA (como polimorfismos, fragmentos o variantes) se pueden emplear para practicar los métodos de la presente divulgación, siempre que se mantengan las características funcionales distintivas de la secuencia. Por ejemplo, las variantes de la proaerolisina se pueden emplear para practicar los métodos divulgados en el presente, si mantienen su capacidad para ser activadas por una proteasa específica prostática y formar poros en las membranas celulares, provocando la muerte celular. Esta actividad se puede determinar fácilmente empleando los ensayos divulgados en el presente, como los descritos en los Ejemplos 2-5. En otras realizaciones, las moléculas de proaerolisina modificada tienen la característica de lisar específicamente las células que producen PSA (por ejemplo, lisar células que producen PSA en mayor medida que células que no producen PSA).

Esta divulgación facilita el uso de moléculas de ADN, y por tanto, de proteínas, obtenidas de una proteína nativa pero que se diferencia en su secuencia de aminoácidos o nucleótidos precisa con respecto a la secuencia nativa. Estas variantes se pueden obtener a través de técnicas de laboratorio de biología molecular estándar y de la información sobre las secuencias divulgadas en el presente.

Las moléculas de ADN y las secuencias de nucleótidos obtenidas de una molécula de ADN nativo también se pueden definir como secuencias de ADN que se hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ADN divulgadas, o fragmentos de las mismas. Las condiciones de hibridación resultantes en grados concretos de rigurosidad varían dependiendo de la naturaleza del método de hibridación, así como de la composición y longitud

del ADN de hibridación empleado. Por lo general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na<sup>+</sup>) de la solución tampón de hibridación determinan la rigurosidad de la hibridación. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación necesarias para conseguir determinadas cantidades de rigurosidad son debatidos por Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989, capítulos 9 y 11). Por lo general, la hibridación con una sonda seleccionada marcada con [<sup>32</sup>P]-dCTP se realiza en una solución de elevada fuerza iónica, como 6xSSC, a una temperatura que se encuentre a unos 5-25°C por debajo de la temperatura de fusión, T<sub>m</sub>. Un ejemplo de condiciones rigurosas es una concentración de sal de al menos unos 0,01 a 1,0 M de concentración de iones de Na (u otras sales) a un pH de 7.0 a 8.3 y a una temperatura de al menos 30°C para las sondas cortas (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas se pueden conseguir también con la adición de agentes desestabilizadores, como la formamida. Por ejemplo, las condiciones de 5X SSPE (750 mM NaCl, 50 mM Na fosfato, 5 mM EDTA, pH 7.4) a 25-30°C son adecuadas para las hibridaciones de sondas específicas de alelos.

La degeneración del código genético amplía más el ámbito de aplicación de la presente divulgación, dado que permite importantes variaciones en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN, al tiempo que se mantiene la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Por ejemplo, el aminoácido Ala es codificado por el triplete de codones de nucleótidos GCT, GCG, GCC y GCA. Así, la secuencia de nucleótidos se podría cambiar sin afectar a la composición de aminoácidos de la proteína codificada ni a las características de la proteína. Basándose en la degeneración del código genético, las variantes de moléculas de ADN se pueden obtener de una molécula de ADNc empleando técnicas de mutagénesis de ADN estándar descritas anteriormente, o mediante síntesis de las secuencias de ADN. Las secuencias de ADN que no se hibridan en condiciones estrictas con las secuencias de ADNc divulgadas en virtud de la variación de la secuencia basada en la degeneración del código genético también están incluidas en la presente divulgación.

Las variantes, fragmentos, fusiones y polimorfismos de PA conservarán la capacidad para lisar células productoras de PSA, determinada utilizando los ensayos divulgados en el presente (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 2 y 5). Las variantes y fragmentos de las secuencias divulgadas conservarán al menos un 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos de una proteína y mantendrán la actividad funcional de la proteína, tal como entienden aquellos versados en la técnica.

## EJEMPLO 12

### Expresión recombinante de proteínas

Con el ADNc y las correspondientes secuencias de aminoácidos a disposición del público, y con la presente divulgación de las variantes, fragmentos y fusiones de PA, se puede realizar la expresión y purificación de cualquier proteína mediante técnicas de laboratorio estándar. La proteína purificada se puede emplear para la terapia del paciente. Una persona con conocimientos en la técnica entenderá que las toxinas de PA modificada divulgadas se pueden producir en cualquier célula u organismo de interés, y purificarse antes de la administración a un sujeto.

Los métodos para producir proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Por tanto, el ámbito de aplicación de la divulgación incluye la expresión recombinante de cualquier proteína. Véase, por ejemplo, la Patente estadounidense nº 5 342 764 de Johnson et al; la Patente estadounidense nº: 5 846 819 de Pausch et al; la Patente estadounidense nº: 5 876 969 de Fleer et al. y Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Capítulo 17).

## EJEMPLO 13

### Modificaciones de péptidos

Las proteínas de PA modificadas que están activadas por una proteasa específica prostática, como PSA, se pueden modificar empleando diversas técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad que los péptidos no modificados y, opcionalmente, presentan otras propiedades recomendables (como antigenicidad reducida). Por ejemplo, los grupos de ácido carboxílico del péptido, sean del extremo carboxi-terminal o de la cadena lateral, se pueden proporcionar en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o pueden ser esterizados para formar un éster C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>, o convertirse en una amida de la fórmula NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno, independientemente, el alquilo H o C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>, o combinarse para formar un anillo heterocíclico, como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, sean del extremo amino-terminal o de la cadena lateral, pueden proporcionarse en forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, como HCl, HBr, acético, benzoico, sulfónico tolueno, maleico, tartárico y otras sales orgánicas, o pueden ser modificados por el alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub> o dialquilamino, o también convertirse en una amida.

Los grupos hidroxilo de la cadena lateral del péptido se pueden convertir en un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub> o en un éster C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub> utilizando técnicas bien reconocidas. Los anillos de fenil y fenólicos de la cadena lateral del péptido pueden ser sustituidos por uno o más de los átomos de halógeno, como F, Cl, Br o I, o por el alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>, el alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de estos ácidos carboxílicos. Los grupos metileno de las cadenas laterales del péptido se pueden extender a alquilenos C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> homólogos. Los tioles se pueden proteger con cualquiera de los grupos de protección existentes bien reconocidos, como los grupos acetamida. Los versados en la técnica también reconocerán métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos divulgados en el



presente, al objeto de seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales en la estructura que permitan una estabilidad mejorada. Por ejemplo, se puede añadir un residuo de cisteína carboxi-terminal o amino-terminal al péptido, de forma que, una vez oxidado, el péptido contenga un enlace de disulfuro, generando un péptido cíclico. Otros métodos de ciclación de péptidos incluyen la formación de tioéteres, y amidas y ésteres carboxi-terminales y amino-terminales.

Para mantener un péptido funcional, determinadas variantes del péptido diferirán solamente en un pequeño número de aminoácidos de un péptido. Estas variantes pueden tener deleciones (por ejemplo de 1-3 o más aminoácidos), inserciones (por ejemplo de 1-3 o más residuos) o sustituciones, que no interfieran con la actividad deseada del péptido. Las variantes sustitutivas son aquellas en las que al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos ha sido eliminado y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. En determinadas realizaciones, estas variantes tienen sustituciones de aminoácidos de residuos únicos, por ejemplo 1, 3, 5 o incluso 10 sustituciones en una proteína.

Las realizaciones peptidomiméticas y organomiméticas también se divulgan en el presente, en las que la disposición tridimensional de los componentes químicos de estos peptidomiméticos y organomiméticos imita la disposición tridimensional del segmento principal del péptido y de las cadenas laterales de aminoácidos que componen el péptido, resultando en peptidomiméticos y organomiméticos de una toxina de PA modificada que tiene la capacidad de lisar células productoras de PSA. Para las aplicaciones de modelización informática, un farmacóforo es una definición tridimensional idealizada de los requisitos estructurales para la actividad biológica. Los peptidomiméticos y organomiméticos pueden ser diseñados para adaptarse a cada farmacóforo con el software de modelización informática actual (utilizando el diseño de fármacos asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", en Klegerman & Groves, eds., 1993, Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pp. 165-174 and Principles of Pharmacology (ed. Munson, 1995), capítulo 102, para obtener una descripción de las técnicas utilizadas en CADD.

#### EJEMPLO 14

##### Métodos para expresar péptidos de proaerolisina modificada

Alternativamente (o adicionalmente) a la administración de un péptido de proaerolisina modificada para tratar el cáncer de próstata, el tratamiento a largo plazo o sistémico (por ejemplo, para tratar o prevenir la metástasis del tumor) se puede conseguir expresando las toxinas de proaerolisina modificada divulgadas *in vivo*.

La presente divulgación proporciona métodos para expresar un péptido de proaerolisina modificada en una célula o tejido *in vivo*. En un ejemplo, la transfección de la célula o el tejido se produce *in vitro*. En este ejemplo, la célula o el tejido (como un injerto) se extirpa de un sujeto y posteriormente se transfecta en un vector de expresión que contiene un ADNc que codifica la proteína de interés. Las células transfectadas producirán proteína funcional y pueden ser reintroducidas en el sujeto. En otro ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de interés se administra a un sujeto directamente (por ejemplo, por vía intravenosa, intratumoral o intraprostática) y la transfección se produce *in vivo*.

Los métodos y péptidos de proaerolisina modificada divulgados en el presente se pueden utilizar para tratar a un sujeto con un tumor de próstata. Este método reduciría el volumen del tumor y, en algunas realizaciones, evitaría o trataría la metástasis del tumor prostático.

Los procedimientos científicos y médicos necesarios para la transfección de células humanas son ahora rutinarios. La disponibilidad pública de proaerolisina, dominios de unión y proteína de proteasa específica prostática, así como secuencias de ADNc, permite desarrollar la expresión genética *in vivo* en seres humanos (y otros mamíferos) basándose en estos procedimientos. Por otra parte, en el presente se divulgan determinadas variantes de moléculas de proaerolisina. La inmunoterapia de pacientes con melanoma utilizando linfocitos de infiltración tumoral (TIL) diseñados genéticamente ha sido documentada por Rosenberg et al. (N. Engl. J. Med. 323:570-8,1990). En ese estudio, se empleó un vector de retrovirus para introducir un gen para la resistencia a neomicina en los TIL. Se puede emplear un planteamiento similar para introducir el ADNc de un péptido de proaerolisina modificada en un sujeto que padece cáncer de próstata.

Una estrategia general para transferir genes en células de un donante se divulga en la Patente estadounidense nº 5.529.774. Por lo general, un gen que codifica una proteína que tiene efectos terapéuticamente deseados es clonado en un vector de expresión viral y ese vector es posteriormente introducido en el organismo diana. El virus infecta las células y produce la secuencia de proteína *in vivo*, donde tiene su efecto terapéutico deseado (Zabner et al. Cell 75:207-16, 1993).

Puede que sólo sea necesario introducir el ADN o los elementos de la proteína en determinadas células o tejidos. Por ejemplo, si un sujeto solamente tiene un tumor de próstata, la introducción de la proteína o el ADN solamente en la próstata (o el tumor) puede ser suficiente. No obstante, en algunos ejemplos, puede resultar más terapéuticamente efectivo y sencillo tratar todas las células de un sujeto o diseminar de forma más amplia el vector, por ejemplo mediante administración intravascular (i.v.) u oral. Por ejemplo, si un sujeto padece un tumor de próstata metastásico, la introducción sistémica de la proteína o el ADN puede resultar necesaria.

La secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un agente terapéutico, como una toxina de proaerolisina modificada, se encuentra bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, a título meramente enunciativo, el promotor nativo del gen, el promotor de LTR retroviral, o promotores adenovirales, como el promotor principal tardío de adenovirus; el promotor de CMV; los promotores inducibles por el promotor RSV, como el promotor de MMIV; el promotor de metalotioneína; los promotores del golpe de calor; el promotor de albúmina; el promotor de histona; el promotor de  $\alpha$ -actina; los promotores TK; los promotores del parvovirus B19; y el promotor de ApoA1. En un ejemplo, el promotor es un promotor específico prostático, como el promotor de probasina. No obstante, la divulgación no se limita a promotores o genes extraños específicos.

El ácido nucleico recombinante se puede administrar al sujeto por cualquier método que permite que el ácido nucleico recombinante llegue a las células. Estos métodos incluyen la inyección, infusión, implantación de deposición o administración tópica. Las inyecciones pueden ser intradérmicas o subcutáneas. El ácido nucleico recombinante se puede administrar como parte de un vector viral, como virus de avipox, virus de la vacuna recombinante, poliovirus o cepas de adenovirus de replicación deficiente, o una forma no infecciosa, como ADN desnudo o ADN encapsulado en liposomas, como también se describe en el Ejemplo 15.

### EJEMPLO 15

#### Vectores virales para la expresión genética *in vivo*

Los vectores adenovirales incluyen esencialmente el genoma adenoviral completo (Shenk et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. III: 1-39, 1984). Alternativamente, el vector adenoviral es un vector adenoviral modificado en el que al menos una porción del genoma adenoviral ha sido sometido a delección. En un ejemplo, el vector incluye un adenovirus 5' ITR; un adenovirus 3' ITR; una señal de encapsidación adenoviral; una secuencia de ADN que codifica un agente terapéutico; y un promotor para expresar la secuencia de ADN que codifica un agente terapéutico. El vector está libre de al menos la mayoría de secuencias de ADN E1 y E3 adenoviral, aunque no necesariamente libre de todas las secuencias de ADN E2 y E4, y secuencias de ADN que codifican proteínas adenovirales transcritas por el promotor principal tardío de adenovirus. En otro ejemplo, el vector es un virus adeno-asociado (AAV) como el que se describe en la Patente estadounidense nº 4.797.368 (Carter et al.) y en McLaughlin et al. (J. Virol. 62:1963-73, 1988) y AAV tipo 4 (Chiorini et al. J. Virol. 71:6823-33, 1997) y AAV tipo 5 (Chiorini et al. J. Virol. 73:1309-19, 1999).

Este vector se puede construir conforme a las técnicas estándar, utilizando una versátil lanzadera que contiene, empezando en el extremo 5', un ITR 5' adenoviral, una señal de encapsidación adenoviral y una secuencia potenciadora de E1; un promotor (que puede ser un promotor adenoviral o un promotor extraño); una secuencia líder tripartita, un sitio de clonación múltiple (que puede ser como el descrito en el presente; una señal poli(A)); y un segmento de ADN que corresponde a un segmento del genoma adenoviral. El segmento de ADN sirve como sustrato para la recombinación homóloga con un adenovirus modificado o mutado y puede comprender, por ejemplo, un segmento del genoma 5' del adenovirus no más largo que de la base 3329 a la base 6246. El plásmido también puede incluir un marcador seleccionable y un origen de replicación. El origen de replicación puede ser un origen de replicación bacteriano. Se puede insertar una secuencia de ADN deseada que codifica un agente terapéutico en el sitio de clonación múltiple del plásmido.

Algunos ejemplos de vectores que se pueden utilizar para practicar los métodos divulgados en el presente incluyen, a título meramente enunciativo, los divulgados en: WO 95/27512 de Woo et al.; WO 01/127303 de Walsh et al.; la Patente estadounidense nº: 6.221.349 de Couto et al.; la Patente estadounidense nº: 6.093.392 de High et al.

### EJEMPLO 16

#### Generación y expresión de proteínas de fusión

Los métodos para hacer proteínas de fusión son bien conocidos para aquellos versados en la técnica. Por ejemplo, la Patente estadounidense nº 6.057.133 de Bauer et al. divulga métodos para hacer moléculas de fusión compuestas por una variante de la interleucina-3 humana (hIL-3) o proteínas mutantes funcionalmente unidas al factor estimulador de una segunda colonia, citocina, linfocina, interleucina, factor de crecimiento hematopoyético o variante de IL-3. La Patente estadounidense nº 6 072 041 de Davis et al divulga la generación de proteínas de fusión que comprenden una molécula de Fv de cadena única dirigida contra un receptor transcítico enlazado covalentemente con una proteína terapéutica.

Se pueden emplear métodos similares para generar proteínas de fusión que comprenden PA (o variantes, fragmentos, etc., de la misma) enlazada a otras secuencias de aminoácidos, tales como el dominio de unión específico prostático (por ejemplo, LHRH o un anticuerpo). Se pueden emplear regiones de enlace para separar las dos porciones de la proteína entre sí y proporcionar flexibilidad entre ellas. Por lo general, la región de enlace es un polipéptido de entre 1 y 500 aminoácidos de longitud, por ejemplo menos de 30 aminoácidos de longitud. El conector que une las dos moléculas puede estar diseñado para (1) permitir que las dos moléculas se plieguen y actúen independientemente entre sí, (2) no mostrar una propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que podría interferir en los dominios funcionales de las dos proteínas, (3) tener una característica de carga o hidrofoba mínima que podría interactuar con los dominios funcionales de la proteína, y (4) proporcionar la separación estérica de las dos regiones. Típicamente, los aminoácidos de superficie de las regiones flexibles de la proteína incluyen Gly,

Asn y Ser. Otros aminoácidos neutros, como Thr y Ala, también se pueden utilizar en la secuencia de enlace. Otros aminoácidos se pueden incluir en el conector debido a la adición de sitios de restricción únicos en la secuencia de enlace para facilitar la construcción de las fusiones. También se pueden incluir otros fragmentos, si se desea. Estos pueden incluir una región de unión, como avidina o un epítipo, como una etiqueta de polihistadina, que puede ser útil para la purificación y el procesamiento de la proteína de fusión. Por otra parte, se pueden unir marcadores detectables a la proteína de fusión, de forma que el tráfico de la proteína de fusión a través de un cuerpo o célula se pueda controlar cómodamente. Estos marcadores incluyen radionúclidos, enzimas, fluoróforos y similares.

La fusión de las secuencias de ácido nucleico de PA (o una variante, fragmento, etc. de la misma) con la secuencia de ácido nucleico de otra proteína (o variante, fragmento, etc., de la misma) se puede conseguir mediante el uso de vectores intermedios. Alternativamente, se puede clonar un gen directamente en un vector que contiene el otro gen. Se pueden utilizar conectores y adaptadores para unir las secuencias de ácido nucleico, así como sustituir las secuencias perdidas, cuando un sitio de restricción sea interno en la región de interés. El material genético (ADN) que codifica un polipéptido, el conector peptídico y el otro polipéptido se inserta en un vector de expresión adecuado, que se utiliza para transformar células procarióticas o eucarióticas, por ejemplo bacterias, levaduras, células de insectos o células de mamíferos. El organismo transformado es cultivado y la proteína aislada mediante técnicas estándar, por ejemplo utilizando un marcador detectable, como la cromatografía de afinidad en quelato de níquel, si se utiliza una etiqueta de polihistadina. Por tanto, el producto resultante es una nueva proteína, una proteína de fusión, que tiene PA modificada unida por una región de enlace a una segunda proteína. Para confirmar que la proteína de fusión está expresada, la proteína purificada se somete a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, y se transfiere a filtros de membrana de nitrocelulosa utilizando métodos establecidos. Los productos de la proteína pueden ser identificados mediante un inmunoensayo Western blot, utilizando anticuerpos dirigidos contra los componentes individuales, es decir una etiqueta de polihistadina y PA.

#### **EJEMPLO 17**

##### **Composiciones farmacéuticas y modos de administración**

Los vehículos farmacéuticamente efectivos útiles en el presente son los convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), describe las composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica.

##### **Administración de péptidos**

En una realización en la que una toxina de PA modificada, como en las SEC. ID. N°: 4, 24 y 25, es administrada a un sujeto, la proteína se administra por cualquier vía empleada por aquellos versados en la técnica. Algunos ejemplos incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: por vía intravenosa, intratumoral, oral, intraprostática, intramuscular, inyección subcutánea, transdérmica, etc. La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de una toxina de PA modificada sola o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por otra parte, las composiciones farmacéuticas o métodos de tratamiento se pueden administrar en combinación (o por separado) con uno o más tratamientos terapéuticos diferentes. Algunos ejemplos de otros terapéuticos incluyen, a título meramente enunciativo, agentes antitumorales, lisados celulares (como los generados mediante incubación con una toxina de PA modificada), células no lisadas (como las que han sido matadas mediante radiación), inmunosupresores (como Rituximab, esteroides) y/o citocinas (como GM-CSF). Las realizaciones de la divulgación, incluyendo los medicamentos, se pueden preparar con vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales, adyuvantes y contraiones conocidos por aquellos versados en la técnica.

La toxina de PA modificada se puede administrar en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente efectivo, por ejemplo uno o más, como un fluido farmacéutica y fisiológicamente aceptable. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente efectivos incluyen, a título meramente enunciativo, agua, suero fisiológico, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, aceite de sésamo, glicerol, etanol, combinaciones de los mismos, o similares, como vehículo. El portador y la composición pueden ser estériles, y la formulación se adapta al modo de administración. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tampón de pH o agentes similares, como acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, tableta, píldora, cápsula, fórmula de liberación prolongada o polvo. Para las composiciones sólidas (p. ej., polvo, píldoras, tabletas o cápsulas), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o estearato de magnesio. La composición se puede formular como un supositorio, con los aglutinantes y vehículos tradicionales, como triglicéridos.

La cantidad de toxina de PA modificada, como las SEC. ID. N°: 4, 24 y 25, efectiva para el tratamiento de una condición o trastorno concreto, como el cáncer de próstata, dependerá de la naturaleza del trastorno o la condición, y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Por otra parte, se pueden emplear ensayos *in vitro* para identificar rangos de dosis óptimos (véanse los ejemplos 2, 4 y 5). La dosis precisa que se va a emplear en la formulación dependerá también de la gravedad de la enfermedad o el trastorno y se deberá decidir conforme al

criterio del médico y a las circunstancias de cada sujeto. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a las dosis obtenidas de sistemas de ensayo con modelos animales o *in vitro*. Los ejemplos de dosis intravenosas efectivas de una toxina de PA modificada para un humano de 70 kg son aproximadamente de 1-10 mg de toxina de PA modificada, por ejemplo unos 1-5 mg, por ejemplo unos 1-3 mg, por ejemplo unos 2,8 mg. Algunos ejemplos de dosis intraprostáticas o intratumorales efectivas de una toxina de PA modificada para un humano de 70 kg son aproximadamente de 10-100 mg de toxina de PA modificada, por ejemplo unos 10-50 mg, por ejemplo unos 10-30 mg, por ejemplo unos 28 mg.

La divulgación también proporciona un kit o pack farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. Opcionalmente, junto con este recipiente o recipientes puede haber una nota, en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, en la que se refleje la aprobación de la agencia para la fabricación, el uso o la venta para su administración a seres humanos. Las instrucciones de uso de la composición también pueden estar incluidas.

#### Administración de moléculas de ácido nucleico

En un ejemplo en el que un ácido nucleico se emplea para permitir la expresión de un ácido nucleico en una célula, el ácido nucleico se administra intracelularmente (p. ej., mediante la expresión de un vector de ácido nucleico o mediante mecanismos mediados por el receptor). En una realización, un ácido nucleico codifica una PA modificada, como en la SEC. ID. N°: 4, 24 o 25.

Se conocen diversos sistemas de administración de un ácido nucleico, que incluyen la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, endocitosis mediada por el receptor (Wu and Wu, J. Biol. Chem. 1987, 262:4429-32), y la construcción de ácidos nucleicos terapéuticos como parte de un vector retroviral o de otro vector. Los métodos de introducción incluyen, a título meramente enunciativo, la vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal y oral. Los compuestos se pueden administrar mediante cualquier vía útil, por ejemplo mediante infusión o la inyección de bolos, mediante absorción a través de revestimientos mucocutáneos o epiteliales (p. ej., mucosa oral, rectal, vaginal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Los liposomas se fusionan con el sitio diana y depositan el contenido de su interior intracelularmente. Los liposomas se mantienen en contacto con las células diana durante un tiempo suficiente como para que se produzca la fusión, utilizando diversos métodos para mantener el contacto, como agentes de aislamiento y unión. Los liposomas se pueden preparar con péptidos o proteínas purificadas que median en la fusión de las membranas, como el virus Sendai o virus de la influenza. Los lípidos pueden ser cualquier combinación útil de lípidos formadores de liposomas, incluyendo lípidos catiónicos, como fosfatidilcolina. Otros lípidos potenciales incluyen lípidos neutros, como colesterol, fosfatidil serina, fosfatidil glicerol y similares. Para preparar los liposomas, se puede utilizar el procedimiento descrito por Kato et al. (J. Biol. Chem. 1991, 266:3361).

Cuando la molécula terapéutica es un ácido nucleico, la administración se puede conseguir mediante un vector de expresión de ácido nucleico apropiado que se administra de forma que llegue a ser intracelular, p. Ej., mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente estadounidense n° 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (p. ej., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o el revestimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en enlace con un péptido similar al homeobox, que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:1864-8), etc. Alternativamente, el ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar al ADN de una célula hospedadora para la expresión, mediante recombinación homóloga.

El vector pcADN es un ejemplo de un método para introducir el ADNc extraño en una célula bajo el control de un fuerte promotor viral (CM V) para conducir la expresión. No obstante, se pueden utilizar otros vectores (véase el Ejemplo 15). Otros vectores retrovirales (como pRETRO-ON, Clontech) también utilizan este promotor, aunque tienen la ventaja de entrar en las células sin ninguna ayuda de transfección, integrándose en el genoma de las células diana solamente cuando la célula diana se está dividiendo (como hacen las células cancerígenas, especialmente durante las primeras remisiones después de la quimioterapia) y son regulados. También es posible activar la expresión de un ácido nucleico administrando tetraciclina cuando se utilizan estos plásmidos.

Otros vectores plásmidos, como pMAM-neo (Clontech) o pMSG (Pharmacia) utilizan el promotor MMTV-LTR (que se puede regular con esteroides), el promotor final SV10 (pSVL, Pharmacia) o el promotor sensible a metalotioneína (pBPV, Pharmacia) y otros vectores virales, incluyendo retrovirus. Algunos ejemplos de otros vectores virales incluyen adenovirus, AAV (virus adeno-asociados), HSV recombinante, poxvirus (vacuna) y lentivirus recombinantes (como HIV). Estos vectores consiguen el objetivo básico de administrar en la célula diana la secuencia de ADNc y controlar los elementos necesarios para la transcripción. La presente divulgación incluye todas las formas de administración de ácido nucleico, incluyendo oligos sintéticos, ADN desnudo, plásmido y viral, integrado o no en el genoma.

Habiendo ilustrado y descrito nuevas toxinas de la proaerolisina modificada y métodos para utilizar estas moléculas en el tratamiento del cáncer de próstata y las metástasis, para una persona con conocimientos en la técnica resultará evidente que la divulgación se puede modificar tanto en la disposición como en los detalles sin desviarse

de estos principios. En vista de las numerosas realizaciones posibles a las que se pueden aplicar los principios de nuestra divulgación, se debe reconocer que las realizaciones ilustradas son solamente ejemplos concretos de la divulgación y que no se debería entender que limitan el alcance de la misma. Por lo contrario, el alcance de la divulgación se ajusta a las siguientes reivindicaciones. Por tanto reivindicamos como nuestra invención todo lo que se enmarca en el ámbito de aplicación de estas reivindicaciones.

5

10

15

20

25

30

35

40

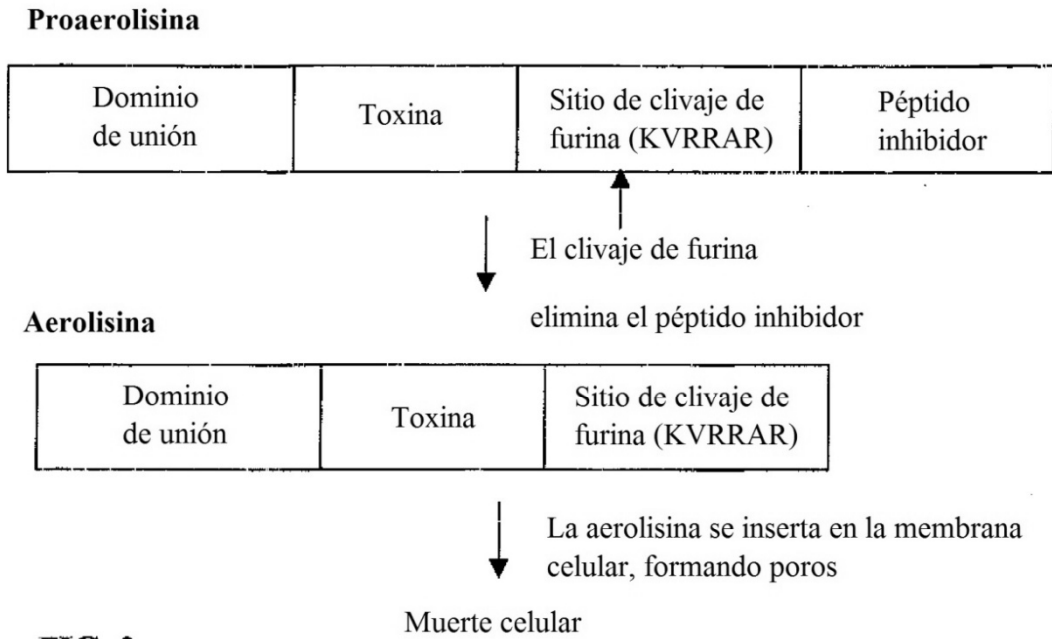
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido purificado que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia del 95% o superior con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SED. ID. Nº: 4, donde el péptido purificado comprende un sitio de clivaje específico prostático y un sitio de clivaje de furina sometido a delección funcional, donde el sitio de clivaje específico prostático sustituye funcionalmente al sitio de clivaje de furina.
- 10 2. Un péptido purificado de conformidad con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia del 98% o superior con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SED. ID. Nº: 4.
3. El péptido purificado de la reivindicación 1, donde el péptido comprende asimismo una etiqueta de polihistidina.
- 15 4. El péptido purificado de la reivindicación 3, donde la etiqueta de polihistidina comprende un máximo de seis histidinas.
5. El péptido purificado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto.
- 20 6. El péptido purificado para el uso de la reivindicación 5, donde el péptido se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea u oral.
7. El péptido purificado para el uso de la reivindicación 5, donde el péptido se administra por vía intratumoral o intraprostática.
- 25 8. El péptido urificado para el uso de la reivindicación 5, donde el sujeto tiene un tumor prostático localizado.
9. El péptido urificado para el uso de la reivindicación 5, donde el sujeto tiene un tumor prostático metastásico.
- 30 10. El péptido purificado para el uso de la reivindicación 5, donde el volumen de la célula tumoral prostática se reduce al menos en un 10%.
11. El péptido purificado para el uso de la reivindicación 5, donde el volumen de la célula tumoral prostática se reduce al menos en un 50%.
- 35 12. Una composición farmacéutica que comprende el péptido purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 13. Una secuencia de ácido nucleico purificado que codifica el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

45

1/5

**FIG. 1**



**FIG. 2**

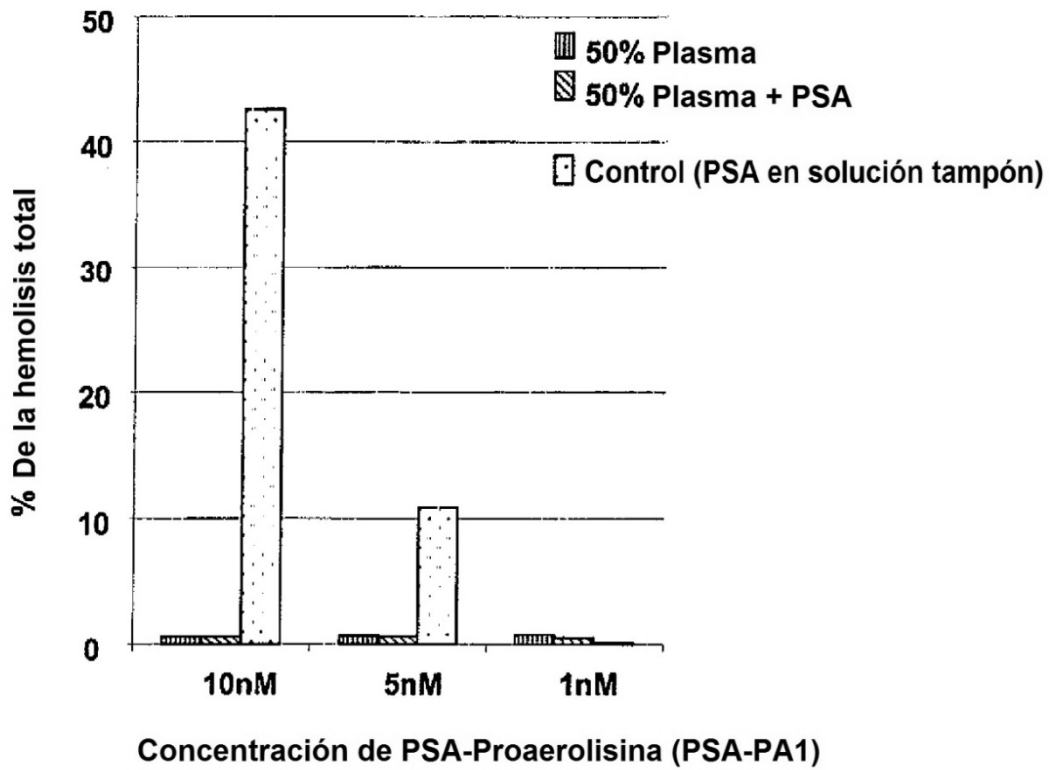


FIG. 3

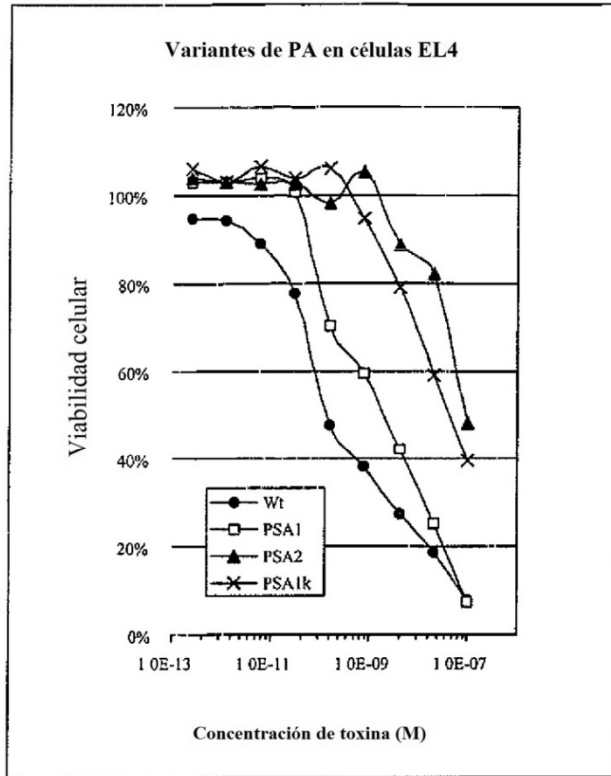
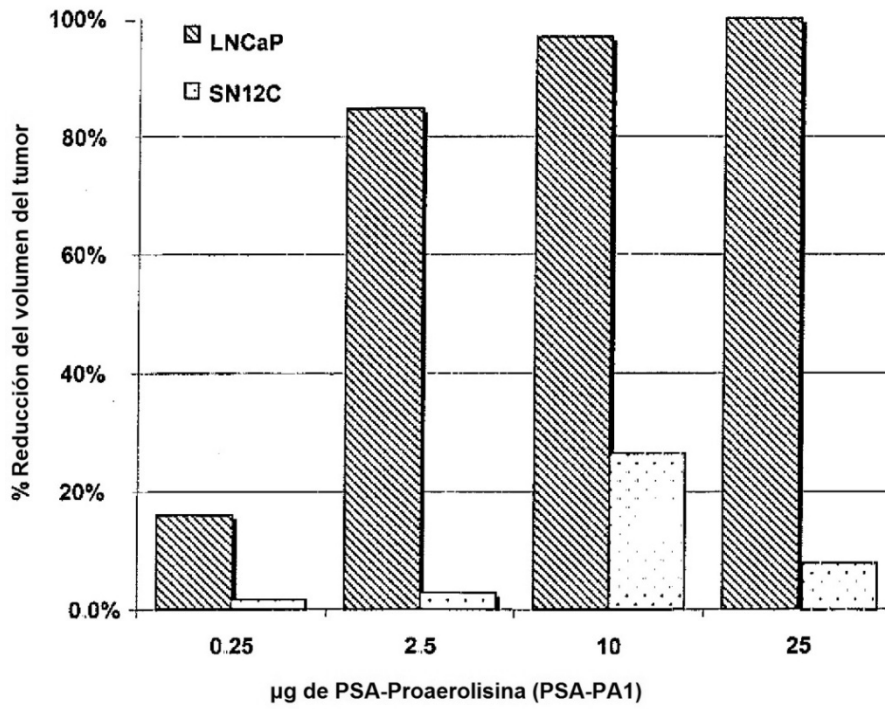


FIG. 4





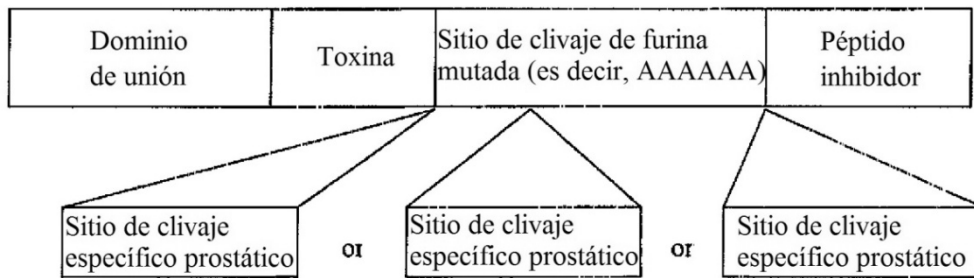
**FIG. 5A: Proaerolisina de tipo salvaje (SEC.ID. N°: 1 y 2)**

Dominio de unión	Toxina	Sitio de clivaje de furina (KVERRAR)	Péptido inhibidor
------------------	--------	--------------------------------------	-------------------

**FIG. 5B: Ejemplo de variante de proaerolisina (SEC. ID. N°: 3 y 4)**

Dominio de unión	Toxina	Sitio de clivaje de proteasa específica prostática (p. ej., HSSKLQ)	Péptido inhibidor
------------------	--------	---	-------------------

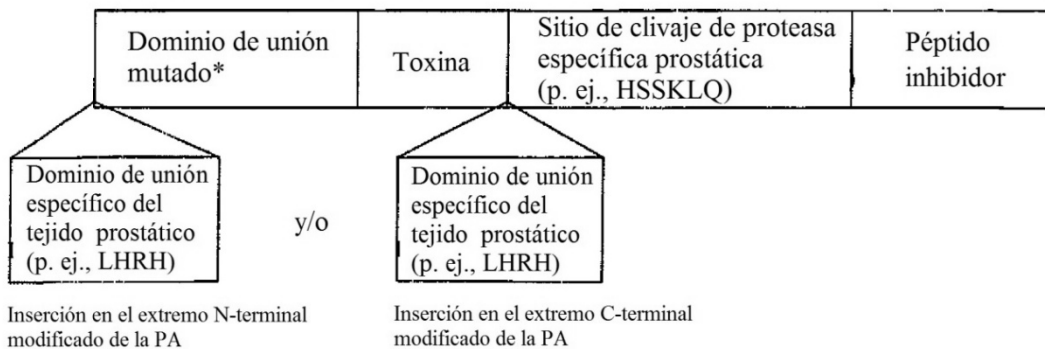
**FIG. 5C Ejemplo de variante de proaerolisina**



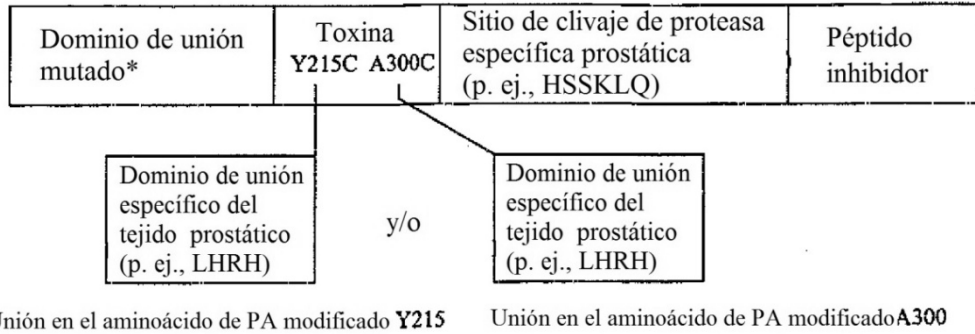
**FIG. 5D Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a delección funcional**

Dominio de unión mutado*	Toxina	Sitio de clivaje de proteasa específica prostática (p. ej., HSSKLQ)	Péptido inhibidor
--------------------------	--------	---	-------------------

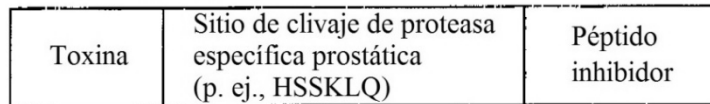
**FIG. 5E Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a eliminación funcional**



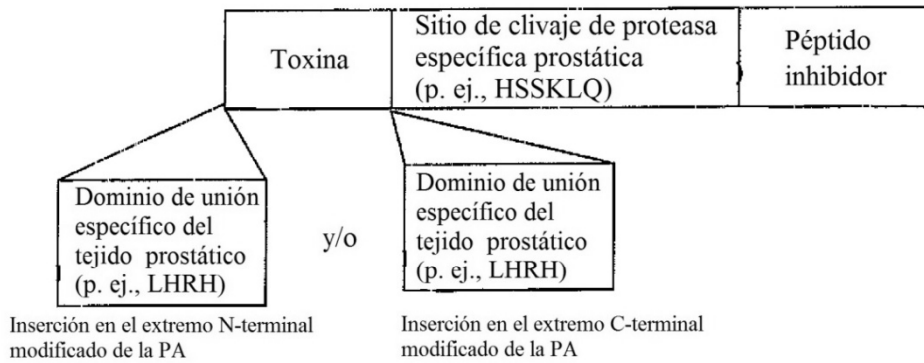
**FIG. 5F** Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a eliminación funcional



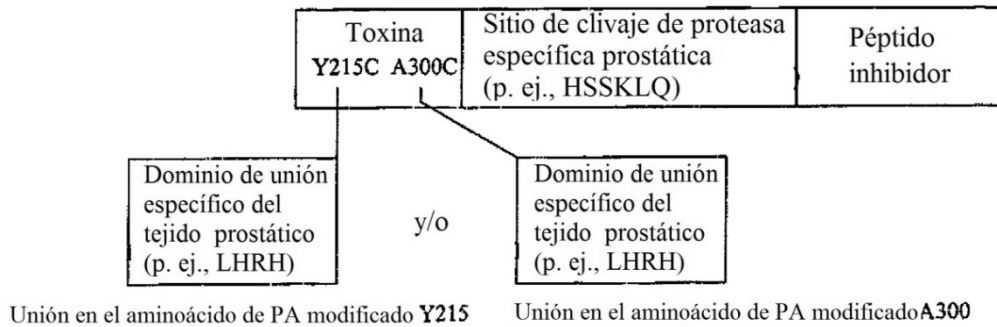
**FIG. 5G** Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a delección funcional (Aminoácidos 1-83 sometidos a delección)



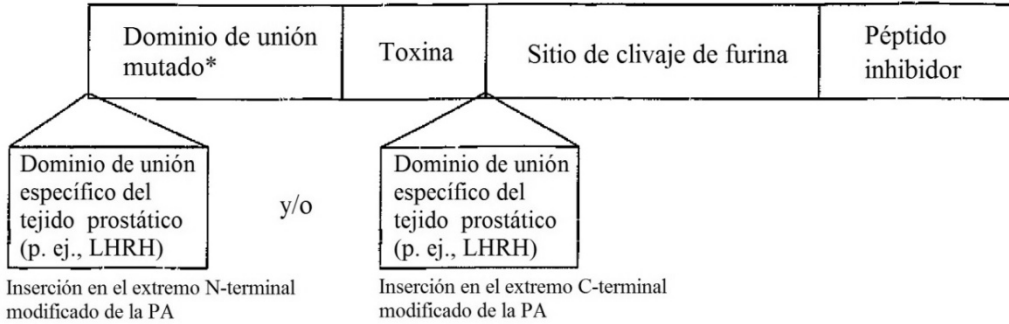
**FIG. 5H** Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a eliminación funcional



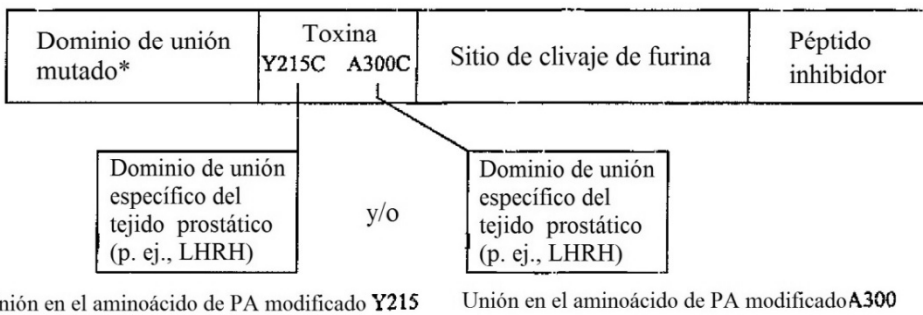
**FIG. 5I** Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a eliminación funcional



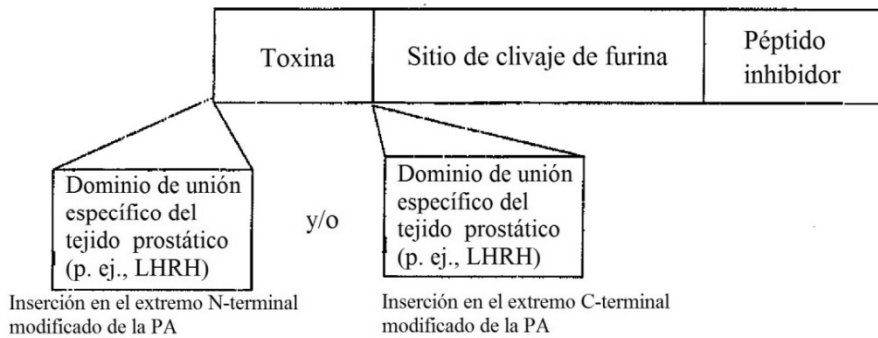
**FIG. 5J** Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a eliminación funcional



**FIG. 5K** Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a eliminación funcional



**FIG. 5L** Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a eliminación funcional



**FIG. 5M** Ejemplo de variante de proaerolisina con un dominio de unión sometido a eliminación funcional

