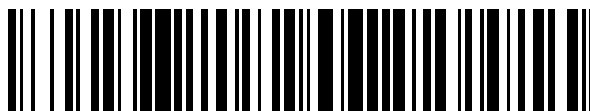


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 805**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**C07K 14/21** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2010** **E 10755283 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 2475398**

54 Título: **Exotoxina A de Pseudomonas mejorada con inmunogenicidad reducida**

30 Prioridad:

**11.09.2009 US 241620 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.09.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PASTAN, IRA H.;  
BEERS, RICHARD y  
ONDA, MASANORI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 544 805 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

Exotoxina A de *Pseudomonas* mejorada con inmunogenicidad reducida

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona moléculas mejoradas de Exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) con alta citotoxicidad e inmunogenicidad reducida, composiciones que contienen la (PE) mejorada, y métodos de uso.

10 **Antecedentes de la invención**

En los últimos años se han desarrollado inmunoconjugados como enfoque terapéutico alternativo para tratar neoplasias. Los inmunoconjugados se componían originalmente de un anticuerpo químicamente conjugado con una toxina vegetal o bacteriana, una forma que es conocida como inmunotoxina. El anticuerpo se une al antígeno expresado en la célula diana y la toxina se internaliza causando muerte celular deteniendo la síntesis de proteínas e induciendo apoptosis (Brinkmann, U., Mol. Med. Today, 2:439-446 (1996)). Más recientemente, se han fusionado genes que codifican el anticuerpo y la toxina y se ha expresado la inmunotoxina como una proteína de fusión.

Se han realizado varios estudios sobre inmunotoxinas que usan como resto tóxico una toxina bacteriana conocida como exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE"). Normalmente, la PE se ha truncado o mutado para reducir su toxicidad no específica sin destruir su toxicidad hacia las células a las que está dirigida mediante la parte de direccionamiento de la inmunotoxina. Actualmente hay varios ensayos clínicos en curso ensayando el uso de inmunotoxinas basadas en PE como tratamientos para diversos cánceres.

El documento WO2007016150; el documento WO2009032954; Onda *et al*, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, vol. 105, nº 32, agosto de 2008, páginas 11311-11316; Onda *et al*, Journal of Immunology, vol. 177, nº 12, 1 de diciembre de 2006, páginas 8822-8834; y Hansen *et al*, Journal of Immunotherapy, vol. 33, nº 3, abril de 2010 (2010-04), páginas 297-304 describen moléculas de PE.

Las actuales inmunotoxinas basadas en PE son altamente inmunogénicas. Esto ha demostrado ser un problema en el tratamiento de neoplasias hematológicas, en que a menudo se ve comprometida la capacidad del sistema inmune para montar una respuesta. Las inmunotoxinas normalmente pueden administrarse múltiples veces a pacientes con neoplasias hematológicas. Los pacientes con tumores sólidos, sin embargo, habitualmente desarrollan anticuerpos neutralizantes contra inmunotoxinas basadas en PE semanas después de la primera administración. Como muchos protocolos exigen un periodo de tres semanas entre la administración de inmunotoxinas, el desarrollo de los anticuerpos durante este periodo efectivamente significa que, para tumores sólidos, habitualmente puede hacerse una única administración de una inmunotoxina basada en PE antes de que los anticuerpos del paciente la vuelvan ineficaz. Incluso una única administración de una inmunotoxina basada en PE puede ser muy útil para reducir la carga tumoral del paciente, en la eliminación de metástasis más pequeñas, y en el alivio de los síntomas. No obstante, sería deseable tener formas menos antigénicas de inmunotoxinas basadas en PE que redujeran las respuestas inmunogénicas del paciente.

La presente invención satisface estas y otras necesidades.

45 **Breve resumen de la invención**

La presente invención se refiere a exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") mejorada con inmunogenicidad reducida. Estructuralmente, la PE mejorada tiene eliminado el Dominio I, eliminada la mayoría del Dominio II, y sustituciones en las posiciones de restos de aminoácido del Dominio III D406 y Q592 con una glicina, alanina o serina.

Funcionalmente, las moléculas de PE mejorada a las cuales se refiere la invención retienen alta actividad citotóxica con la eliminación de epítomos de células B. Ratones que reciben 5 inyecciones de la presente PE mejorada no desarrollaron una respuesta inmune contra la toxina. Las moléculas de PE mejorada se ejemplifican por una realización particular de la invención mencionada aquí como LR-8M (previamente mencionada como LR-8X).

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una endotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") aislada, donde dicha PE tiene los restos 1-273 y 285-394 eliminados y sustituciones de alanina, glicina o serina en lugar de los restos de aminoácido D406 y Q592 correspondientes a un resto de aminoácido de la SEC ID Nº 1.

En una realización, la PE tiene adicionalmente una sustitución de alanina, glicina o serina de al menos un resto de aminoácido correspondiente a un resto de aminoácido de la SEC ID Nº 1 seleccionado entre el grupo que consiste en R432, R467, R490, R513, R548, K590.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula química que comprende (a) un resto de direccionamiento conjugado o fusionado a la exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") de la invención.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

También se describen en este documento moléculas quiméricas que comprenden (a) un resto de direccionamiento conjugado o fusionado con (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE"), donde dicha PE tiene los restos 1-273 y 285-394 eliminados y sustituciones de alanina, glicina o serina en lugar de los restos de aminoácido D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 correspondientes a un resto de aminoácido de la SEC ID N° 1.

También se describen en este documento composiciones que comprenden

(a) una molécula quimérica que comprende un resto de direccionamiento conjugado o fusionado a una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE"), donde dicha PE tiene los restos 1-273 y 285-394 eliminados y sustituciones de alanina, glicina o serina en lugar de los restos de aminoácido D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 correspondientes a un resto de aminoácido de la SEC ID N° 1, y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describen en este documento ácidos nucleicos aislados que codifican una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") modificada, donde dicha PE tiene los restos 1-273 y 285-394 eliminados y sustituciones de alanina, glicina o serina en lugar de los restos de aminoácido D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 correspondientes a un resto de aminoácido de la SEC ID N° 1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica adicionalmente un resto de direccionamiento.

También se describen en este documento métodos para inhibir el crecimiento de una célula que alberga una molécula diana, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una molécula quimérica que comprende

(a) un resto de direccionamiento que se une específicamente a dicha molécula diana, y  
(b) una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE"), donde dicha PE tiene los restos 1-273 y 285-394 eliminados y sustituciones de alanina, glicina o serina en lugar de los restos de aminoácido D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 correspondientes a un resto de aminoácido de la SEC ID N° 1,

donde el contacto de dicha célula con dicha molécula quimérica inhibe el crecimiento de dicha célula.

Con respecto a las realizaciones, en algunas realizaciones, la PE contiene también opcionalmente una sustitución de alanina, glicina o serina de al menos un resto de aminoácido correspondiente a un resto de aminoácido de la SEC ID N° 1 seleccionado entre el grupo que consiste en D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597.

En algunas realizaciones, la PE tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. En algunas realizaciones, la PE tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.

En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en un scFv, un dsFv, un Fab, un anticuerpo de un solo dominio y un F(ab')<sub>2</sub>.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es contra un antígeno de superficie celular seleccionado entre el grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en B3, RFB4, SS1, HN1, HN2, MN y HB21.

En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una cadena ligera variable (VL) que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), y una cadena pesada variable (VH) que comprende tres CDR, donde

(i) dicha CDR1 de VL tiene la secuencia QDIXXY, donde XX se selecciona entre SN, HG, GR, RG y AR;  
(ii) dicha VL CDR2 tiene la secuencia YTS;  
(iii) dicha VL CDR3 tiene la secuencia QQGNTLPWT;  
(iv) dicha VH CDR1 tiene la secuencia GFAFSIYD;  
(v) dicha VH CDR2 tiene la secuencia ISSGGGTT;  
(vi) dicha VH CDR3 tiene la secuencia ARHSGYGXXXGVLFAY, donde XXX se selecciona entre SSY, THW, YNW, TTW y STY.

En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una cadena ligera variable (VL) que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), y una cadena pesada variable (VH) que comprende tres CDR, donde

(i) dicha VL CDR1 tiene la secuencia QDISNY;

- (ii) dicha VL CDR2 tiene la secuencia YTS;
- (iii) dicha VL CDR3 tiene la secuencia QQGNTLPWT;
- (iv) dicha VH CDR1 tiene la secuencia GFAFSIYD;
- (v) dicha VH CDR2 tiene la secuencia ISSGGGTT;
- (vi) dicha VH CDR3 tiene la secuencia ARHSGYGTHWGVLFAF.

En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una cadena ligera variable (VL) que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), y una cadena pesada variable (VH) que comprende tres CDR, donde

- (i) dicha VL CDR1 tiene la secuencia QDIHGY;
- (ii) dicha VL CDR2 tiene la secuencia YTS;
- (iii) dicha VL CDR3 tiene la secuencia QQGNTLPWT;
- (iv) dicha VH CDR1 tiene la secuencia GFAFSIYD;
- (v) dicha VH CDR2 tiene la secuencia ISSGGGTT;
- (vi) dicha VH CDR3 tiene la secuencia ARHSGYGTHWGVLFAF.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la parte Fv de HA22. En algunas realizaciones, el anticuerpo es humano o humanizado.

En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento es una citoquina, una linfoquina o un factor de crecimiento.

Serán evidentes realizaciones adicionales para los especialistas en la técnica y se describen en este documento.

## Definiciones

Las unidades, prefijos, y símbolos se indican en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. Salvo que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi. Los encabezados proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención, que pueden obtenerse por referencia a la memoria descriptiva como conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas. La secuencia nativa de PE (SEC ID N° 1) se expone en la patente de Estados Unidos n° 5.602.095. El método de acción y estructura de PE, así como las modificaciones que provocan varias variantes de PE, se analizan en algún detalle en una sección dedicada a este fin dentro de la misma.

Se describen mutaciones de PE en este documento por referencia al resto de aminoácido presente en una posición particular de la secuencia de 613 aminoácidos de PE nativa (SEC ID N° 1), seguido por el aminoácido con el que se ha reemplazado el resto en la mutación particular en análisis. Por tanto, por ejemplo, el término "R490A" indica que la "R" (arginina, en código convencional de una letra) en la posición 490 de la molécula de referencia está reemplazada por una "A" (alanina, en código convencional de una letra), mientras que "K590Q" indica que la lisina normalmente presente en la posición 590 se ha reemplazado con una glutamina. El código convencional de una letra para aminoácidos comunes se expone a continuación.

"CD22" se refiere a un antígeno de células B restringido a linaje que pertenece a la superfamilia de Ig. Se expresa en el 60-70 % de los linfomas de células B y leucemias y no está presente en la superficie celular en fases tempranas del desarrollo de células B o en células madre. Véase, por ejemplo, Vaickus *et al.*, Crit. Rev. Oncol/Hematol. 11:267-297 (1991).

Como se usa en este documento, el término "anti-CD22" hace referencia a un anticuerpo que se une específicamente a CD22 e incluye referencias a un anticuerpo que se genera contra CD22. En realizaciones preferidas, la CD22 es una CD22 de primate, tal como CD22 humana. En una realización preferida, el anticuerpo se genera contra CD22 humana sintetizada por un mamífero no primate después de la introducción en el animal del ADNc que codifica CD22 humana.

"CD25" o "Tac" se refiere a la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL2R). Es una proteína transmembrana tipo I presente en células T activadas, células B activadas, algunos timocitos, precursores mieloides, y oligodendrocitos que se asocian con CD122 para formar un heterodímero que puede actuar como receptor de alta afinidad para IL-2. CD25 se expresa en la mayoría de neoplasias de células B, algunas leucemias no linfocíticas agudas, y neuroblastomas.

Como se usa en este documento, el término "anti-CD25" hace referencia a un anticuerpo que se une específicamente a CD25 e incluye referencias a un anticuerpo que se genera contra CD25. En realizaciones

preferidas, la CD25 es un CD25 de primate, tal como CD25 humana. En una realización preferida, el anticuerpo se genera contra CD25 humana sintetizada por un mamífero no primate después de la introducción en el animal del ADNc que codifica CD25 humana.

El término "mesotelina" se refiere a una proteína y fragmentos de la misma presentes en la superficie de algunas células humanas y unidas por, por ejemplo, el anticuerpo K1. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de mesotelina se exponen en, por ejemplo, la solicitud publicada PCT WO 97/25,068 y las patentes de Estados Unidos nº 6.083.502 y 6.153.430. Véase también, Chang, K. y Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57:90 (1994); Chang, K. y Pastan, I., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 93:136 (1996); Brinkmann U., *et al.*, *Int. J. Cancer* 71:638 (1997); Chowdhury, P.S., *et al.*, *Mol. Immunol.* 34:9 (1997), y la patente de Estados Unidos nº 6.809.184. La mesotelina se expresa como una proteína precursora de aproximadamente 69 kDa, que después se procesa para liberar una proteína de 30 kDa, dejando unida a la superficie celular la glucoproteína de superficie celular unida a glucosilfosfatidilinositol de 40 kDa descrita en los antecedentes. La glucoproteína de 40 kDa es la mencionada por el término "mesotelina" en este documento. Se han registrado las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de mesotelina de varias especies, por ejemplo, seres humanos (NM\_005823.4→NP\_005814.2; y NM\_013404.3→NP\_037536.2), ratón (NM\_018857.1→NP\_061345.1), rata (NM\_031658.1→NP\_113846.1), bovino (NM\_001100374.1→NP\_001093844).

"RFB4" se refiere a un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón que se une específicamente a CD22 humana. RFB4 está disponible en el mercado con el nombre RFB4 en varias fuentes, tales como Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham AL; Cat. Nº 9360-01), Autogen Bioclear UK Ltd. (Calne, Wilts, R.U.; Cat. Nº AB147), Axxora LLC. (San Diego, CA). RFB4 es altamente específico para células del linaje B y no tiene reactividad cruzada detectable con otros tipos celulares normales. Li *et al.*, *Cell. Immunol.* 118:85-99 (1989). Las cadenas pesada y ligera de RFB4 se han clonado. Véase, Mansfield *et al.*, *Blood* 90:2020-2026 (1997).

"BL22" (o "RFB-4(dsFv)-PE38") es una inmunotoxina que emplea como resto de direccionamiento una región Fv estabilizada por disulfuro de un anticuerpo anti-CD22 conocido en la técnica como "RFB-4". La secuencia del anticuerpo RFB-4 es bien conocida en la técnica. BL22 se describe en Kreitman *et al.*, *New Eng J Med* 345(4):241-7 (2001). La inmunotoxina BL22 usa PE38 como parte tóxica de la inmunotoxina.

"HA22" es una inmunotoxina que emplea como resto de direccionamiento una forma mutada de RFB-4 en que los restos SSY de CDR3 de la cadena pesada variable se han mutado en THW. Esta mutación de RFB-4 y su efecto sobre inmunotoxinas que la emplean como resto de direccionamiento se describe en la publicación internacional WO 03/027135 y Salvatore *et al.*, *Clin Cancer Res* 8(4):995-1002 (2002). La inmunotoxina HA22 usa PE38 como parte tóxica de la inmunotoxina.

Por conveniencia de referencias, como se usa en este documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos (algunas veces mencionados en este documento como "intactos"), fragmentos de anticuerpo que retienen la capacidad de un reconocimiento y unión a antígeno, se produzcan mediante modificación de anticuerpos completos o sinteticen *de novo* usando metodologías de ADN recombinante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y miméticos de anticuerpos, salvo que el contexto requiera otra cosa. El anticuerpo puede ser una IgM, IgG (por ejemplo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>), IgD, IgA o IgE.

Se conocen en la técnica desde hace años las secuencias de las regiones constantes de las subclases de IgG (por ejemplo, Honjo *et al.*, *Cell*, 18:559-68 (1979); Tucker *et al.*, *Science*, 206:1303-6 (1979); Yamawaki *et al.*, *Nature* 283:786-9 (1980); Ellison *et al.*, *Nucl Acids Res* 10:4071-9 (1982); Ellison *et al.*, *DNA* 1:11-8 (1981); Ellison y Hood, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 79:1984-8 (1982)). Como las CDR de las regiones variables determinan la especificidad del anticuerpo, las CDR o Fv de los anticuerpos contra un antígeno de superficie celular diana pueden injertarse o modificarse por ingeniería en un anticuerpo de elección para conferir especificidad por el antígeno de superficie celular diana en ese anticuerpo. Por ejemplo, las CDR de un anticuerpo contra un antígeno de superficie celular diana pueden injertarse en una región flanqueante de anticuerpo humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, el documento WO98/45322; el documento WO 87/02671; las patentes de Estados Unidos nº 5.859.205; 5.585.089; y 4.816.567; la solicitud de patente EP 0173494; Jones, *et al.* *Nature* 321:522 (1986); Verhoeyen, *et al.*, *Science* 239:1534 (1988), Riechmann, *et al.* *Nature* 332:323 (1988); y Winter y Milstein, *Nature* 349:293 (1991)) para formar un anticuerpo que generará poca o ninguna respuesta inmunogénica cuando se administre a un ser humano. Como alternativa, las regiones constantes de los anticuerpos pueden modificarse por ingeniería reemplazando restos encontrados en animales no humanos, tales como ratones, con restos normalmente encontrados en seres humanos. Los anticuerpos modificados por ingeniería de este modo se mencionan como "anticuerpos humanizados" y son preferidos, ya que tienen un riesgo inferior de inducir efectos secundarios y pueden permanecer en la circulación más tiempo. Los métodos para humanizar anticuerpos son conocidos en la técnica y se exponen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 6.180.377; 6.407.213; 5.693.762; 5.585.089; y 5.530.101.

La expresión "fragmentos de anticuerpo" significa moléculas que comprenden una parte de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y fragmentos Fv; anticuerpos de un único dominio (véase, por ejemplo, Wesolowski, *Med Microbiol Immunol.* (2009) 198(3): 157-74; Saerens, *et al.*, *Curr Opin Pharmacol.* (2008) 8(5):600-8; Harmsen y de

Haard, *Appl Microbiol Biotechnol.* (2007) 77(1):13-22); anticuerpos estabilizados por hélice (véase, por ejemplo, Arndt *et al.*, *J Mol Biol* 312:221-228 (2001)); diacuerpos (véase a continuación); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla ("scFv," véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos nº 5.888.773); anticuerpos estabilizados por disulfuro ("dsFv", véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos nº 5.747.654 y 6.558.672), y anticuerpos de dominio "dAb," (véase, por ejemplo, Holt *et al.*, *Trends Biotech* 21(11):484-490 (2003), Ghahroudi *et al.*, *FEBS Lett.* 414:521-526 (1997), Lauwereys *et al.*, *EMBO J* 17:3512-3520 (1998), Reiter *et al.*, *J. Mol. Biol.* 290:685-698 (1999), Davies y Riechmann, *Biotechnology*, 13:475-479 (2001)).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio pesado variable ("V<sub>H</sub>" o "VH") conectado a un dominio ligero variable ("V<sub>L</sub>" o "VL") en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios aparezcan con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos y su producción se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpo parental" significa cualquier anticuerpo de interés que tiene que mutarse o variarse para obtener anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unan al mismo epítipo que el anticuerpo parental, pero con mayor afinidad.

Un "resto de direccionamiento" es la parte de un inmunoconjugado pretendida para dirigir al inmunoconjugado a una célula de interés. Normalmente, el resto de direccionamiento es un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo que retiene la capacidad de reconocimiento de antígeno, tal como un scFv, un dsFv, un Fab, o un F(ab')<sub>2</sub>.

Un "resto tóxico" es la parte de una inmunotoxina que vuelve a la inmunotoxina citotóxica para las células de interés. Con respecto a las inmunotoxinas que son el objeto de la presente invención, el resto tóxico es una endotoxina A de *Pseudomonas* que se ha mutado para reducir su citotoxicidad no específica, como se describe en algún detalle a continuación.

Normalmente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como "dominios"). Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "flanqueante" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". La extensión de la región flanqueante y las CDR se ha definido. Las secuencias de las regiones flanqueantes de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región flanqueante de un anticuerpo, es decir las regiones flanqueantes combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se mencionan normalmente como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente empezando en el extremo N-terminal, y también se identifican normalmente por la cadena en la que se localiza la CDR particular. Por tanto, una CDR3 de V<sub>H</sub> se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en que se encuentra, mientras que una CDR1 de V<sub>L</sub> es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en que se encuentra.

Referencias a "V<sub>H</sub>" o a "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo un Fv, scFv, dsFv o Fab. Referencias a "V<sub>L</sub>" o a "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo un Fv, scFv, dsFv o Fab.

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

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

La expresión "Fv estabilizado por disulfuro" o "dsFv" se refiere a la región variable de una inmunoglobulina en que existe un enlace disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada. En el contexto de esta invención, las cisteínas que forman el enlace disulfuro están dentro de las regiones flanqueantes de las cadenas de anticuerpo y sirven para estabilizar la conformación del anticuerpo. Normalmente, el anticuerpo se modifica por ingeniería para introducir cisteínas en la región flanqueante en posiciones donde la sustitución no impedirá la unión a antígeno.

La expresión "péptido enlazador" incluye referencias a un péptido dentro de un fragmento de unión de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente el dominio variable de la cadena pesada al dominio

variable de la cadena ligera.

Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede generarse por métodos recombinantes tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, véase, por ejemplo, Huse, *et al.*, Science 246:1275-1281 (1989); Ward, *et al.*, Nature 341:544-546 (1989); y Vaughan, *et al.*, Nature Biotech. 14:309-314 (1996), o por inmunización de un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno.

La expresión "resto efector" significa la parte de un inmunoconjugado pretendida para tener un efecto sobre una célula abordada por el resto de direccionamiento o para identificar la presencia del inmunoconjugado. En el contexto de la presente invención, el resto efector es una exotoxina A de *Pseudomonas* mutada.

El término "inmunoconjugado" incluye referencias a un enlace covalente de una molécula efectora a un anticuerpo.

Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad eficaz para" o "cantidad terapéuticamente eficaz" incluyen referencias a una dosificación de un agente terapéutico suficiente para producir un resultado deseado, tal como inhibición de síntesis de proteínas celulares en al menos el 50 %, o eliminación de la célula.

El término "toxina" normalmente incluye referencias a abrina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE), toxina diftérica (DT), toxina botulínica, o toxinas modificadas de las mismas. Por ejemplo, la PE y DT son compuestos altamente tóxicos que normalmente llevan a la muerte a través de toxicidad hepática. La PE y DT, sin embargo, pueden modificarse en una forma para su uso como una inmunotoxina eliminando el componente de direccionamiento nativo de la toxina (por ejemplo, dominio la de PE o la cadena B de DT) y reemplazándolo con un resto de direccionamiento diferente, tal como un anticuerpo. En el contexto de la presente invención, la toxina es una exotoxina A de *Pseudomonas* mutada.

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

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

Como se usa en este documento, "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable e incluyen referencias a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en que uno o más restos de aminoácido son análogos químicos artificiales de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los términos también se aplican a polímeros que contienen sustituciones conservativas de aminoácidos de modo que la proteína siga siendo funcional.

El término "resto" o "resto de aminoácido" o "aminoácido" incluye referencias a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido, o péptido (colectivamente "péptido"). El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural y, salvo que esté limitado de otro modo, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de un modo similar como aminoácidos de origen natural.

Los aminoácidos y análogos mencionados en este documento se describen por las siguientes designaciones abreviadas en la Tabla A:

Tabla A: Nomenclatura de aminoácido

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

| Nombre     | 3 letras | 1 letra |
|------------|----------|---------|
| Treonina   | Thr      | T       |
| Triptófano | Trp      | W       |
| Tirosina   | Tyr      | Y       |
| Valina     | Val      | V       |

Una "sustitución conservativa", cuando se describe una proteína se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera sustancialmente la actividad de la proteína. Por tanto, "variaciones modificadas de forma conservativa" de una secuencia particular de aminoácidos se refiere a sustituciones de aminoácidos de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad de la proteína o sustitución de aminoácidos con otros aminoácidos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácidos, básicos, cargados positiva o negativamente, polares o no polares, etc.) de modo que las sustituciones de incluso los aminoácidos críticos no alteren sustancialmente la actividad. Son bien conocidas en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Los siguientes seis grupos en la Tabla B contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas de los otros:

**Tabla B**

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
  - 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
  - 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
  - 4) Arginina (R), Lisina (K);
  - 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
  - 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).
- Véase también, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W.H. Freeman and Company, Nueva York (2ª Ed., 1992).

La expresión "sustancialmente similar" en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, donde la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones en que existe la base de ácido nucleico o resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "conjugar", "juntar", "unir" o "enlazar" se refieren a preparar dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua. En el contexto de la presente invención, los términos incluyen referencias a unir un resto de anticuerpo a una molécula efectora (EM). El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. Los medios químicos se refieren a una reacción entre el resto de anticuerpo y la molécula efectora de modo que haya un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula.

Como se usa en este documento, "recombinante" incluye referencias a una proteína producida usando células que no tienen, en su estado nativo, una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante porque se han alterado genéticamente mediante la introducción de la secuencia aislada de ácido nucleico apropiada. El término también incluye referencias a una célula, o ácido nucleico, o vector, que se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la alteración de un ácido nucleico nativo en una forma no nativa para esa célula, o a que esa célula se obtiene de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, expresan mutantes de genes que se encuentran dentro de la forma nativa, o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otro modo, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

Como se usa en este documento, "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" incluye referencias a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono o bicatenaria, y salvo que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan con ácidos nucleicos de un modo similar a nucleótidos de origen natural. Salvo que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular incluye la secuencia complementaria de la misma así como variantes conservativas, es decir, ácidos nucleicos presentes en posiciones tambaleante de codones y variantes que, cuando se traducen en una proteína, producen una sustitución conservativa de un aminoácido.

Como se usa en este documento, "codificante" con respecto a un ácido nucleico específico, incluye referencias a ácidos nucleicos que comprenden la información para la traducción en la proteína especificada. La información se especifica mediante el uso de codones. Normalmente, la secuencia de aminoácidos se codifica por el ácido nucleico usando el código genético "universal". Sin embargo, pueden usarse variantes del código universal, tal como está presente en algunas mitocondrias de plantas, animales, y hongos, la bacteria *Mycoplasma capricolum* (Proc. Nat'l



Acad. Sci. EE.UU. 82:2306-2309 (1985), o el ciliado *Macronucleus*, cuando se expresa el ácido nucleico usando la maquinaria de traducción de estos organismos.

La expresión "fusionar en fase" se refiere a unir dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de modo que la secuencia de ácido nucleico unida se traduzca en una proteína de una única cadena que comprende las cadenas polipeptídicas originales.

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

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

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual.

La expresión "sustancialmente idéntico", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos un 60 %, más preferiblemente un 65 %, incluso más preferiblemente un 70 %, aún más preferiblemente un 75 %, incluso más preferiblemente un 80 %, y mucho más preferiblemente un 90-95 % de identidad de nucleótidos o restos de aminoácido, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual. Preferiblemente, la identidad sustancial existe sobre una región de las secuencias que es de al menos aproximadamente 50 restos de longitud, más preferiblemente sobre una región de al menos aproximadamente 100 restos, y mucho más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 restos. En una realización más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud completa de las regiones codificantes.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, se introducen las secuencias de ensayo y referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros designados del programa.

La alineación óptima de las secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase en líneas generales Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley y Sons, Inc., (Suplemento 1995) (Ausubel)).

Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschuel *et al.* (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencia de alta valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia en cuestión, que se corresponden a o satisfacen algún valor T umbral del valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al valor umbral de palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para hallar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra después se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde pueda aumentarse el valor de alineación acumulativo. Los valores acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valor de recompensa para un par de restos apareados; siempre >0) y N (valor de penalización para restos desapareados; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de valores para calcular el valor acumulativo. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: el valor de alineación acumulativo queda fuera en la cantidad X de su valor conseguido máximo; el valor acumulativo llega a 0 por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de valoración negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de

11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de valores BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915 (1989)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma menor (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual sucedería por casualidad un apareamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma menor en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene reactividad cruzada inmunológica con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por tanto, un polipéptido normalmente es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos polipéptidos difieren solamente por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación.

El término "*in vivo*" incluye referencias a dentro del cuerpo del organismo el cual se obtiene la célula. "*Ex vivo*" e "*in vitro*" significa fuera del cuerpo del organismo del que se obtiene la célula.

La frase "célula maligna" o "neoplasias" se refiere a tumores o células tumorales que son invasivas y/o capaces de experimentar metástasis, es decir, una célula cancerosa.

Como se usa en este documento, "células de mamífero" incluye referencias a células derivadas de mamíferos incluyendo seres humanos, ratas, ratones, cobayas, chimpancés, o macacos. Las células pueden cultivarse *in vivo* o *in vitro*.

La expresión "selectivamente reactivo" se refiere, con respecto a un antígeno, a la asociación preferente de un anticuerpo, en su totalidad o en parte, con una célula o tejido que alberga ese antígeno y no con células o tejidos que carecen de ese antígeno. Se reconoce, por supuesto, que puede suceder un cierto grado de interacción no específica entre una molécula y una célula o tejido no diana. No obstante, la reactividad selectiva puede distinguirse mediada a través de reconocimiento específico del antígeno. Aunque los anticuerpos selectivamente reactivos se unen al antígeno, pueden hacerlo con baja afinidad. Por otro lado, la unión específica provoca una asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo y las células que albergan el antígeno que entre el anticuerpo unido y las células que carecen del antígeno. La unión específica normalmente provoca un aumento de más de 2 veces, preferiblemente mayor de 5 veces, más preferiblemente mayor de 10 veces y mucho más preferiblemente mayor de 100 veces en la cantidad de anticuerpo unido (por unidad de tiempo) a una célula o tejido que alberga el antígeno diana en comparación con una célula o tejido que carece del antígeno diana. La unión específica a una proteína en dichas condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína particular. Son apropiados diversos formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica.

La expresión "condiciones inmunológicamente reactivas" incluye referencias a condiciones que permiten que un anticuerpo generado contra un epítipo particular se una a ese epítipo a un grado detectablemente mayor que, y/o a la exclusión sustancial de, la unión a sustancialmente todos los demás epítopos. Las condiciones inmunológicamente reactivas son dependientes del formato de la reacción de unión a anticuerpo y normalmente son aquellas utilizadas en protocolos de inmunoensayo o aquellas condiciones encontradas *in vivo*. Véase Harlow y Lane, *supra*, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo. Preferiblemente, las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los métodos de la presente invención son "condiciones fisiológicas" que incluyen referencias a condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas dentro un mamífero vivo o una célula de mamífero. Aunque se reconoce que algunos órganos se someten a condiciones extremas, el entorno intra-orgánico e intracelular normalmente recae en aproximadamente pH 7 (es decir, de pH 6,0 a pH 8,0, más normalmente de pH 6,5 a 7,5), contiene agua como disolvente predominante, y existe a una temperatura por encima de 0 °C y por debajo de 50 °C. La osmolaridad está dentro del intervalo que es propicio de viabilidad y proliferación celular.

Los términos "paciente", "sujeto", "individuo" se refieren de forma intercambiable a un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un primate no humano, un mamífero domesticado (por ejemplo, un canino o felino), un mamífero de agricultura (por ejemplo, un bovino, porcino, ovino, equino), un mamífero de laboratorio (un ratón, rata, hámster,

conejo).

El término "co-administrar" se refiere a la presencia simultánea de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Los agentes activos que se co-administran pueden suministrarse de forma concurrente o secuencial.

Como se usa en este documento, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a retardar la aparición de, retrasar o revertir el progreso de, o aliviar o prevenir la enfermedad o afección a la que se aplica el término, o uno o más síntomas de dicha enfermedad o afección.

Los términos "inhibir", "reducir", "disminuir" con respecto al crecimiento o progresión tumoral o cancerosa se refiere a inhibir el crecimiento, propagación, metástasis de un tumor o cáncer en un sujeto en una cantidad medible usando cualquier método conocido en la técnica. El crecimiento, progresión o propagación de un tumor o cáncer se inhibe, reduce o disminuye si la carga tumoral está al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 80 %, o 100 % reducida en comparación con la carga tumoral antes de la co-administración de una PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica. En algunas realizaciones, el crecimiento, progresión o propagación de un tumor o cáncer se inhibe, reduce o disminuye en al menos aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, o más en comparación con la carga tumoral antes de la administración de la PE.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra que HA22-LR-8M tiene excelente actividad de eliminación celular contra células de leucemia linfática crónica (CLL) de pacientes CLL.

La Figura 2 ilustra que HA22-LR-8M tiene excelente actividad antitumoral contra tumores CA46 en ratones SCID. Se trataron ratones con tumores CA46 por vía intravenosa (i.v.) con 3 inyecciones de HA22 o HA22-LR-8M y se midió el tamaño de los tumores durante 23 días.

La Figura 3 ilustra la inmunogenicidad disminuida de HA22-LR-8M en comparación con LMB-9 en ratones que recibieron administraciones intravenosas de las inmunotoxinas.

La Figura 4 ilustra la inmunogenicidad disminuida de HA22-LR-8M en comparación con HA22 en ratones que recibieron administraciones intravenosas (i.v.) de las inmunotoxinas.

La Figura 5 muestra la actividad citotóxica específica de HA22 (círculo cerrado) y HA22-LR-8M (cuadrado cerrado) en células CA46 (Figura 5A); actividad antitumoral de HA22 y HA22-LR-8M (Figura 5B).

La Figura 6 muestra una comparación de las respuestas inmunológicas para HA22, HA22-8X, y HA22-LR-8M. La generación de los anticuerpos IgG contra las inmunotoxinas en ratones se ilustra en la Figura 6A. Las respuestas de IgM inducidas por las inmunotoxinas en ratones se muestran en la Figura 6B. La titulación del suero inmunizado se muestra en la Figura 6C. La cantidad de anticuerpos contra cada molécula mutante en sueros de ratones inmunizados con HA22 se muestra en la Figura 6D. La respuesta inmune secundaria para HA22 o inmunotoxinas HA22-LR-8M se muestra en la Figura 6E. La respuesta inmune de células B preexistentes que producen Ab para HA22 o inmunotoxinas HA22-LR-8M se muestra en la Figura 6F.

### Descripción detallada

#### 1. Introducción

Durante más de 15 años, se ha investigado la exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") para su uso como la parte tóxica de moléculas quiméricas tales como inmunotoxinas. Ese trabajo se plasma en el desarrollo de varias formas mutadas de PE en que se ha retenido la actividad citotóxica, aunque se ha reducido o eliminado la toxicidad no específica de la molécula. La mayoría de estos mutantes se han truncado para mejorar su penetración en el tumor. Algunos también tenían modificaciones además de truncamiento, tal como modificación de los restos carboxilo terminales o eliminación de la necesidad de escisión entre los restos 279 y 280 por la proteasa furina, para aumentar su citotoxicidad. Las inmunotoxinas que usan formas mutadas de PE han demostrado una considerable promesa terapéutica en ensayos clínicos humanos.

El uso de inmunotoxinas basadas en PE para el tratamiento de tumores sólidos en particular, sin embargo, se ha limitado a causa del desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra la inmunotoxina después de la primera administración. Estos anticuerpos se desarrollan antes de que la mayoría de los protocolos adopten una segunda administración de la inmunotoxina, y por lo tanto convierten el uso adicional de las inmunotoxinas en ineficaz contra tumores sólidos en pacientes expuestos previamente.

Los estudios subyacentes a la presente invención revelan que la respuesta inmune predominante de pacientes contra inmunotoxinas basadas en PE es contra la parte de PE de la inmunotoxina. Esta comprensión indica que la reducción de la antigenicidad de las moléculas de PE usadas para inmunotoxinas reduciría la antigenicidad global de

la inmunotoxina, y aumentaría su utilidad. Los estudios subyacentes a la presente invención revelan adicionalmente que la PE tiene siete epítopos principales, que pueden dividirse adicionalmente en un total de trece subepítopos.

Sorprendentemente, se ha descubierto que, para diez de los trece subepítopos de PE, la antigenicidad del epítipo o subepítopos puede reducirse o eliminarse mutando un único resto de aminoácido de PE. Por supuesto, como PE contiene una multiplicidad de epítopos antigénicos, ninguna mutación individual elimina la antigenicidad de la molécula completa de PE. Cada mutación individual de la presente invención, sin embargo, reduce la antigenicidad de un epítipo o subepítipo individual. Las mutaciones individuales por lo tanto reducen la antigenicidad de la molécula global de PE y cualquier inmunotoxina preparada con la PE mutada.

Los estudios subyacentes a la invención han demostrado adicionalmente que diversas mutaciones pueden combinarse para reducir la antigenicidad global de la molécula reteniendo al mismo tiempo la citotoxicidad de la molécula de PE. Se prepararon moléculas de PE en que 8 restos de aminoácido de diferentes epítopos o subepítopos, incluyendo los restos D406 y Q592, estaban mutados. Las PE con las mutaciones se prepararon en inmunotoxinas, y se ensayó su citotoxicidad. Para facilitar la comparación, las PE se prepararon en inmunotoxinas cada una de las cuales usaba el mismo epítipo de direccionamiento (un anticuerpo anti-CD22 de alta afinidad). Además, para facilitar la comparación, se usó la forma PE38 de PE como la PE en que se hicieron las sustituciones. Dada nuestra experiencia con muchas inmunotoxinas basadas en PE durante los pasados 15 años, el hecho de que todas las formas citotóxicas de PE compartan el mismo mecanismo de citotoxicidad para las células diana (ADP-ribosilación del factor de elongación 2), y el hecho de que las otras variantes de PE en curso sean simplemente la misma secuencia de aminoácidos con truncamientos particulares (o, en el caso de PE4E, cuatro mutaciones en el dominio la, en lugar de un truncamiento), se espera que los resultados obtenidos con PE38 sean directamente aplicables a otras formas de PE (tales como las formas ejemplares conocidas respetivamente como PE25, PE40, PE38, PE37, PE35, PE4E, PE38QQR, y PE38KDEL).

Se espera que, como inmunotoxinas, las PE mutadas ya preparadas, y otras modificadas de acuerdo con los contenidos de la presente invención, provoquen, cuando se preparan en inmunotoxinas, menos respuesta inmune *in vivo*, y que esta respuesta inmune disminuida se refleje por títulos inferiores de anticuerpos neutralizantes. El desarrollo de anticuerpos neutralizantes se ensaya de forma rutinaria en ensayo preclínico de inmunotoxinas y en protocolos de ensayo clínico de inmunotoxinas, y los títulos de anticuerpos inducidos por inmunotoxinas preparadas usando las PE de la invención pueden medirse por estos ensayos convencionales.

Los especialistas en la técnica apreciarán que las PE de la invención serán tan útiles como las PE mutadas previamente conocidas que se han preparado en inmunotoxinas y ensayado en ensayos clínicos. Como se indica, sin embargo, se espera que las inmunotoxinas preparadas con las PE de la invención presenten menos antigenicidad que las inmunotoxinas preparadas con moléculas de PE actualmente disponibles, y que de ese modo provoquen menos respuesta inmune en pacientes que las inmunotoxinas basadas en PE actualmente disponibles.

Las mutaciones de la presente invención pueden diseñarse fácilmente en PE ya modificadas (tales como las formas ejemplares conocidas respetivamente PE25, PE40, PE38, PE37, PE35, PE4E, PE38QQR, y PE38KDEL) para reducir su antigenicidad, y de ese modo reducir las respuestas inmunogénicas de los pacientes contra inmunotoxinas que las contienen. Por consiguiente, la invención proporciona un nuevo medio importante para aumentar la utilidad terapéutica de inmunocombinados basados en PE, tales como las diversas inmunotoxinas basadas en PE actualmente en ensayos clínicos.

Como se ha indicado, las PE mejoradas de la invención comprenden mutaciones de la molécula en posiciones específicas de la molécula de PE. Por convención, las posiciones en PE y sus variantes se indican en la técnica por referencia a la posición correspondiente en la secuencia de 613 aminoácidos de la molécula nativa de PE (SEC ID N° 1). Esta convención se sigue en este documento para permitir una fácil comparación entre variantes de PE y para promover la comprensión de los restos que se mutan en las PE de la invención. Por ejemplo, como se analiza en más detalle a continuación, en la mayoría de las formas clínicamente útiles de PE, el dominio la (aminoácidos 1-252) de la molécula se delecionan para reducir la unión no específica. Una PE con el dominio la delecionado tiene solamente 361 restos. No obstante, una referencia en este documento a D406 se refiere al aspartato encontrado en la posición 406 de la secuencia nativa de PE, independientemente del número de ese resto si se cuenta desde el extremo amino de la PE particular en que existe, mientras que R590 se refiere a la lisina encontrada en la posición 590 de PE nativa y así sucesivamente. La secuencia de aminoácidos de PE nativa (SEC ID N° 1) es bien conocida en la técnica y se expone, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n° 5.602.095.

Como se indica a continuación, en realizaciones preferidas, en las composiciones y métodos de la invención, el resto de aminoácido presente en la secuencia nativa de PE en las posiciones identificadas en este documento se reemplaza por un aminoácido seleccionado entre el grupo alanina, glicina o serina. La alanina, glicina y serina son particularmente preferidas como restos de reemplazo, siendo particularmente preferidas alanina y serina.

Para ser útil, la PE debe retener actividad citotóxica después de las sustituciones de los restos. Para ensayar la retención de la citotoxicidad por las PE alteradas para reducir su antigenicidad, se han preparado varias inmunotoxinas ejemplares. En una primera serie de estudios, se prepararon diecinueve inmunotoxinas. Para permitir

la comparación, cada una de estas inmunotoxinas usó el mismo resto de direccionamiento y cada una empezaba con la misma forma troncada de PE conocida como PE38. En cada una de las diecinueve inmunotoxinas, se reemplazó un resto diferente de PE38 por una mutación identificada como reductora de la antigenicidad de un epítipo o subepítipo particular de PE. La actividad citotóxica de estas diecinueve PE38 mutadas después se comparó con una inmunotoxina preparada con el mismo resto de direccionamiento y con PE38 inalterada (que por conveniencia se llamará la inmunotoxina "de tipo silvestre"). Se describen variantes de PE con antigenicidad reducida, por ejemplo, en la solicitud PCT n° PCT/US06/28986 (Publicada como WO 2007/016150).

Los estudios subyacentes a la invención revelaron aminoácidos cuyo reemplazo disminuía al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, y mucho más preferiblemente al menos 20 veces, la unión a más de dos anticuerpos monoclonales ("MAB") asignados al mismo epítipo. Se espera que la reducción de la unión de los MAB al epítipo se correlacione con una pérdida de antigenicidad del epítipo, y por lo tanto de moléculas de PE que contienen la mutación.

En el documento WO 2007/016150, las mutaciones que se descubrió que reducían la unión de los MAB al mismo epítipo en al menos 5 veces fueron E282, E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331, Q332, D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R490, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, y L597. Las posiciones de PE en que se encontraron mutaciones que reducían la unión de los MAB al mismo epítipo en al menos 10 veces fueron E282, E285, P290, R313, N314, D324, E327, E331, Q332, D403, R412, E431, R427, R432, R458, D461, R467, R490, R505, R513, E522, R538, E548, R576, y R590. Las posiciones de PE en que se encontraron mutaciones que reducían la unión de los MAB al mismo epítipo en al menos 20 veces fueron N314, D324, E327, E331, Q332, D403, R432, R467, R490, R505, R513, R538, R551, K590, y L597.

En estudios previos por el laboratorio de los presentes inventores, presentados en la solicitud PCT PCT/US2004/039617 (Publicación Internacional WO 2005/052006), se descubrió que mutando el resto R490 de PE en alanina se duplicaba la citotoxicidad de la molécula resultante de PE cuando se usaba como el resto de toxina de una inmunotoxina. Sorprendentemente, los estudios subyacentes a la presente invención muestran que la mutación de la arginina en la posición 490 de PE también elimina la unión de anticuerpo al epítipo 5 de PE. Por lo tanto, el reemplazo de la arginina en la posición 490 de PE con uno de los restos analizados anteriormente se espera que disminuya la antigenicidad de la molécula de PE. Se espera adicionalmente que la combinación del reemplazo de la arginina en la posición 490 de PE con el reemplazo de uno o más restos que reducen la unión a uno de los epítopos o subepítopos de PE diferentes al epítipo 5 reduzca adicionalmente la antigenicidad de la molécula y el desarrollo de anticuerpos contra la parte de PE de una inmunotoxina preparada con la PE resultante. Se indica que no se encontraron mutaciones que redujeran la unión al subepítipo IIa.

El documento WO 2005/052006 indica adicionalmente que la arginina en la posición 490 de PE puede mutarse en glicina, alanina, valina, leucina, o isoleucina. La actividad citotóxica aumentada y la inmunogenicidad disminuida son fenómenos separados. Por lo tanto, no todas las mutaciones que se espera que provoquen una actividad citotóxica aumentada se espera también que provoquen inmunogenicidad disminuida. Las mutaciones que hacen ambas cosas, tales como las mutaciones de R490 en glicina o, más preferiblemente, alanina, son particularmente deseables.

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que otros ciertos restos, concretamente D406 y Q592, pueden mutarse y también producir PE que pueden prepararse en inmunotoxinas con alta citotoxicidad y antigenicidad reducida.

Los especialistas en la técnica tendrán en cuenta que diversos tipos de moléculas pueden servir como base para dirigir las PE que contienen las mutaciones de la invención a células que el facultativo desea eliminar o inhibir. Como se evidencia del análisis anterior, los anticuerpos son un tipo especialmente preferido de agente de direccionamiento.

En otra realización preferida, la parte de direccionamiento, o resto, de la molécula quimérica es una citoquina, que puede usarse para dirigir las toxinas a células que sobreexpresan un receptor para la citoquina. Los receptores de IL-13, por ejemplo, son conocidos por sobreexpresarse fuertemente en el exterior de células de ciertos cánceres, tales como gliomas, y por actuar como factor de crecimiento autocrino en cánceres tales como carcinoma de células renales, sarcoma de Kaposi, y enfermedad de Hodgkin. Véase, por ejemplo, el documento WO 01/34645, el documento WO 03/039600 y la patente de Estados Unidos n° 6.518.061. IL-13 o diversos mutantes y formas circularmente permutadas de IL-13 pueden usarse para dirigir citotoxinas, tales como moléculas de PE que contienen una o más mutaciones de la invención a células que expresan el receptor de IL-13. Además, las diversas formas de IL-13, incluyendo formas circularmente permutadas, pueden usarse para dirigir las moléculas de PE con las mutaciones a células en los pulmones que expresan el receptor de IL-13 para reducir o detener los síntomas en afecciones tales como asma y rinitis alérgica, y a células en otras partes del cuerpo para reducir o detener síntomas de dermatitis atópica, y fibrosis hepática en esquistosomiasis, como se analiza en la publicación internacional WO 01/34645.

Además de las citoquinas, se conocen otros numerosos ligandos en la técnica y pueden usarse para dirigir las moléculas de PE de la invención a las células diana. Por ejemplo, se ha usado la transferrina como un medio para

dirigir toxinas a células que expresan receptores de transferrina. Asimismo, las células implicadas en una enfermedad o afección pueden abordarse si existe un antígeno en la superficie celular que se exprese de forma específica o preferente en células relacionadas con la enfermedad o afección, tales como gp120 en células infectadas por VIH, CD25 en células T que están implicadas en la enfermedad de injerto contra hospedador o diversas moléculas superficiales que se expresan en células cancerosas, tales como CEA, CD30, o CD33.

## 2. Moléculas de PE mejoradas con antigenicidad reducida

La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") nativa es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas. La secuencia de PE nativa se expone en la SEC ID N° 1 de la patente de Estados Unidos N° 5.602.095. El método de acción es la inactivación de la ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2). La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan en concierto para causar citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) media la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación al citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media la ADP ribosilación del factor de elongación 2. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) sigue sin definir, aunque una gran parte del mismo, los aminoácidos 365-380, puede delecionarse sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall, *et al.*, J Biol Chem 264:14256-61 (1989).

Las expresiones " exotoxina de *Pseudomonas*" y "PE" como se usan en este documento normalmente se refieren a una PE que se ha modificado a partir de la proteína nativa para reducir o eliminar la toxicidad no específica. Se conocen numerosas modificaciones de este tipo en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, eliminación del dominio Ia, diversas delecciones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de un único aminoácido y adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo tales como KDEL y REDL. Véase Siegall, *et al.*, J. Biol. Chem. 264:14256-14261 (1989). Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen aquellos que son citotóxicos con o sin posterior procesamiento proteolítico u otro procesamiento en la célula diana (por ejemplo, como una proteína o pre-proteína). Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen PE40, PE38 y sus variantes PE38QQR y PE38KDEL (en que PE38 tiene la secuencia KDEL añadida al extremo C-terminal), y PE35, como se analiza a continuación. En una realización preferida, el fragmento citotóxico de PE retiene al menos aproximadamente el 20 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 40 %, más preferiblemente aproximadamente el 50 %, incluso más preferiblemente el 75 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 %, y aún más preferiblemente el 95 % de la citotoxicidad de la PE nativa. En realizaciones particularmente preferidas, el fragmento citotóxico tiene al menos la citotoxicidad de PE nativa, y preferiblemente tiene más.

En realizaciones preferidas, la PE se ha modificado para reducir o eliminar la unión celular no específica, frecuentemente por delección del dominio Ia como se muestra en la patente de Estados Unidos 4.892.827, aunque esto también puede conseguirse, por ejemplo, por mutación de ciertos restos del dominio Ia. La patente de Estados Unidos 5.512.658, por ejemplo, describe que una PE mutada en que el dominio Ia está presente pero en que están remplazados los restos básicos del dominio Ia en las posiciones 57, 246, 247, y 249 con restos ácidos (ácido glutámico, o "E") muestra citotoxicidad no específica enormemente disminuida. Esta forma mutante de PE a veces se menciona como "PE4E."

PE40 es un derivado truncado de PE previamente descrito en la técnica. Véase, Pai, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:3358-62 (1991); y Kondo, *et al.*, J. Biol. Chem. 263:9470-9475 (1988). PE35 es un fragmento carboxilo-terminal de 35 kD de PE en que los restos de aminoácido 1-279 se han delecionado y la molécula comienza con una met en la posición 280 seguida de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de PE nativa. PE35 y PE40 se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5.602.095 y 4.892.827. Otro derivado es PE25, que contiene el fragmento de 11 restos del dominio II y all del dominio III. En algunas realizaciones, el derivado de PE contiene solamente el dominio III.

En algunas realizaciones preferidas, se emplea el fragmento citotóxico PE38. PE38 contiene los dominios de translocación y ADP ribosilación de PE pero no la parte de unión celular (Hwang, J. *et al.*, Cell, 48:129-136 (1987)). PE38 es una pro-proteína truncada de PE compuesta por los aminoácidos 253-364 y 381-613 que se activa en su forma citotóxica tras procesamiento dentro de una célula (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.608.039, y Pastan *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1333:C1-C6 (1997)). La secuencia de PE38 por lo tanto es conocida en la técnica, pero también podría determinarse fácilmente por el facultativo sustrayendo los restos indicados de la secuencia conocida de PE. Los especialistas en la técnica serán conscientes de que, debido a la degeneración del código genético, la secuencia de aminoácidos de PE38, de sus variantes, tales como PE38KDEL, y de otros derivados de PE analizados en este documento, puede estar codificada por una gran diversidad de secuencias de ácido nucleico, cualquiera de las cuales puede expresarse para producir el polipéptido deseado.

Como se ha indicado anteriormente, algo o todo el dominio 1b puede delecionarse, y las partes restantes unirse por un enlazador o directamente por un enlace peptídico. Algo de la parte amino del dominio II puede delecionarse. Y el extremo C-terminal puede contener la secuencia nativa de los restos 609-613 (REDLK), o puede contener una variación que se ha descubierto que mantiene la capacidad de la construcción de translocarse al citosol, tal como KDEL o REDL, y repeticiones de estas secuencias. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.854.044; 5.821.238; y 5.602.095 y el documento WO 99/51643. Aunque en realizaciones preferidas la PE es PE4E, PE40, o

PE38, puede usarse cualquier forma de PE en que se haya eliminado o reducido la citotoxicidad no específica hasta niveles en que no sucede toxicidad significativa para células no diana, en las inmunotoxinas de la presente invención siempre que siga teniendo capacidad de translocación y ribosilación de EF-2 en una célula diana.

- 5 En realizaciones preferidas, las moléculas de PE se modifican para que tengan una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de los restos de aminoácido normalmente presentes en las posiciones D406 y Q592 en el dominio III. Las sustituciones en las posiciones D406 y Q592 pueden combinarse con sustituciones de alanina, glicina, serina o glutamina en las posiciones R432, R467, R490, R513, E548 y K590 en el dominio III. En algunas realizaciones, además, se sustituye al menos un resto de aminoácido correspondiente a un resto de aminoácido en una posición seleccionada entre D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597 con una alanina, glicina, serina o glutamina. Las sustituciones de los restos en posiciones de sustitución en el dominio III, que son las posiciones de restos de aminoácido D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592 del dominio III se combinan preferiblemente con la eliminación de all del dominio Ia (por ejemplo, restos 1-252) y la eliminación de la mayoría del dominio II (por ejemplo, restos 251-273 y 285-394). En algunas realizaciones, la PE tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. En algunas realizaciones, la PE tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.

#### A. Variantes de PE modificadas de forma conservativa

- 20 Se entiende que la secuencia de PE nativa y las variantes analizadas anteriormente pueden tener sustituciones conservativas y retener capacidad citotóxica y, de forma deseable, antigenicidad reducida en comparación con la secuencia nativa de PE. En realizaciones preferidas, las variantes modificadas de PE o fragmentos citotóxicos de la misma tienen al menos un 80 % de similitud de secuencia, preferiblemente al menos un 85 % de similitud de secuencia, más preferiblemente al menos un 90 % de similitud de secuencia, y mucho más preferiblemente al menos un 95 % de similitud de secuencia a nivel de aminoácidos, con la PE de interés, tal como PE38.

- La expresión "variantes modificadas de forma conservativa" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias particulares de ácido nucleico, las variantes modificadas de forma conservativa se refieren a aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o si el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias de ácido nucleico esencialmente idénticas. A causa de la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por tanto, en cualquier posición donde se especifique una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico de este documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un especialista en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifique un polipéptido queda implícita en cada secuencia descrita.

- En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un especialista en la técnica reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, peptídica, polipeptídica, o proteica que alteren, añadan o delecionen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa" donde la alteración provoca la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

#### B. Ensayo de citotoxicidad o antigenicidad de PE

- 50 Las exotoxinas de *Pseudomonas* empleadas en la invención pueden ensayarse para el nivel deseado de citotoxicidad mediante ensayos bien conocidos para los especialistas en la técnica. Por tanto, los fragmentos citotóxicos de PE y variantes modificadas de forma conservativa de dichos fragmentos pueden ensayarse fácilmente para la citotoxicidad. Puede ensayarse una gran cantidad de moléculas candidatas de PE de forma simultánea para la citotoxicidad por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden ensayarse subgrupos de las moléculas candidatas para la citotoxicidad. Los subgrupos que reaccionan positivamente de las moléculas candidatas pueden subdividirse continuamente y re-ensayarse hasta que se defina el o los fragmentos citotóxicos deseados. Dichos métodos permite una rápida exploración de grandes cantidades de fragmentos citotóxicos o variantes conservativas de PE. La antigenicidad puede ensayarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los ensayos mostrados en el documento WO 2007/016150.

- 60 Las variantes preferidas de PE muestran citotoxicidad equivalente o mayor, por ejemplo, en comparación con una PE no sustituida, por ejemplo, PE38. Aunque habitualmente es preferible más citotoxicidad que menos, en la práctica se espera que la citotoxicidad reducida de estas formas mutadas de PE se compense en al menos alguna medida por la antigenicidad reducida de la PE y las inmunotoxinas preparadas con las mismas. Por tanto, incluso estas PE con citotoxicidad reducida encuentran uso. Además, acoplada con una mutación de PE que muestra citotoxicidad aumentada cuando se prepara en una inmunotoxina, la citotoxicidad de la PE puede ser más cercana a

la de la PE de tipo silvestre. Y, como la PE es una citotoxina muy potente, incluso las formas mutadas de PE con toxicidad considerablemente reducida respecto de la de la toxina nativa retienen potencia considerable como restos tóxicos.

### 5 3. Moléculas quiméricas

Los immunoconjugados de la invención incluyen, aunque sin limitación, moléculas en que existe un enlace covalente de una molécula de PE con un anticuerpo u otro agente de direccionamiento. La elección de un agente de direccionamiento particular depende de la célula particular a abordar. Con las moléculas de PE proporcionadas en este documento, un especialista en la técnica puede construir fácilmente diversos clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en secuencia pero que codifican la misma secuencia de PE y anticuerpo. Por tanto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican conjugados de anticuerpos y PE y proteínas de fusión de los mismos.

#### 15 a. Producción de immunoconjugados

##### i. Métodos no recombinantes

En una realización no recombinante de la invención, se une una molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo, a una molécula de PE de la presente invención usando cualquiera de varios medios conocidos para los especialistas en la técnica. Pueden usarse medios de unión tanto covalentes como no covalentes con moléculas de PE de la presente invención.

El procedimiento para unir una molécula de PE a un anticuerpo u otra molécula de direccionamiento ("TM") variará de acuerdo con la estructura química de la TM. Los polipéptidos normalmente contienen diversos grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH<sub>2</sub>) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo, por ejemplo, para provocar la unión de la molécula de PE.

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

Un "enlazador", como se usa en este documento, es una molécula que se usa para unir la TM a la molécula de PE. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con la molécula efectora. Los enlazadores adecuados son bien conocidos para los especialistas en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, enlazadores de carbono cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos, o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína). Sin embargo, en una realización preferida, los enlazadores se unirán a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula de PE de la TM cuando el immunoconjugado ha alcanzado su sitio diana. Por lo tanto, en estas circunstancias, los immunoconjugados comprenderán enlaces que se pueden escindir en las cercanías del sitio diana. La escisión del enlazador para liberar la molécula de PE de la TM puede inducirse por actividad enzimática o condiciones a las que se somete el immunoconjugado dentro de la célula diana o en las cercanías del sitio diana. Cuando el sitio diana es un tumor, puede usarse un enlazador que se escinde en condiciones presentes en el sitio del tumor (por ejemplo, cuando se expone a enzimas asociadas al tumor o pH ácido).

##### ii. Métodos recombinantes

Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden prepararse por cualquier método adecuado incluyendo, por ejemplo, clonación de secuencias apropiadas o por síntesis química directa por métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang, *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90-99 (1979); el método de fosfodiéster de Brown, *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109-151 (1979); el método de dietilfosforamidita de Beaucage, *et al.*, Tetra. Lett. 22:1859-1862 (1981); el método de fosforamidita triéster en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automático como se describe en, por ejemplo, Needham-VanDevanter, *et al.* Nucl. Acids Res. 12:6159-6168 (1984); y, el método en soporte sólido de la patente de Estados Unidos N° 4.458.066. La síntesis química procedimiento un oligonucleótido monocatenario. Éste puede convertirse en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una ADN polimerasa usando el hebra sencilla como molde. Un especialista en la técnica reconocería que aunque la síntesis química de ADN está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas mediante ligamiento de secuencias más cortas.

En una realización preferida, las secuencias de ácido nucleico de esta invención se preparan por técnicas de



clonación. Ejemplos de técnica apropiadas de clonación y secuenciación, y se encuentran instrucciones suficientes para dirigir a los especialistas en la técnica a través de muchos ejercicios de clonación en Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª ED.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), Berger y Kimmel (eds.), GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, Academic Press, Inc., San Diego CA (1987)), o Ausubel, *et al.* (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY (1987). La información de productos de fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información útil. Dichos fabricantes incluyen la compañía química SIGMA (Saint Louis, MO), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen, San Diego, CA, y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas para los especialistas en la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican la PE nativa también pueden modificarse para formar los inmunoconjugados de la presente invención. La modificación por mutagénesis dirigida al sitio es bien conocida en la técnica. Los ácidos nucleicos que codifican PE pueden amplificarse por métodos *in vitro*. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia auto-sostenido (3SR). Los especialistas en la técnica conocen bien una amplia diversidad de métodos de clonación, células hospedadoras, y metodologías de amplificación *in vitro*.

En una realización preferida, los inmunoconjugados se preparan insertando el ADNc que codifica un anticuerpo u otra TM de elección en un vector que comprende el ADNc que codifica una PE deseada de la invención. La inserción se hace de modo que el agente de direccionamiento (para facilidad de análisis, el análisis de este documento asumirá que el agente de direccionamiento es un Fv, aunque podrían sustituirse otros agentes de direccionamiento con igual efecto) y la PE se lean en fase, es decir, en un polipéptido continuo que contiene una región Fv funcional y una región PE funcional. En una realización particularmente preferida, el ADNc que codifica una PE de la invención se liga con un scFv de modo que la toxina se localice en el extremo carboxilo del scFv. En otras realizaciones preferidas, el ADNc que codifica una PE de la invención se liga a un scFv de modo que la toxina se localice en el extremo amino del scFv.

Una vez aislados y clonados los ácidos nucleicos que codifican una PE, anticuerpo, o un inmunoconjugado de la presente invención, se puede expresar la proteína deseada en una célula modificada de forma recombinante tal como células bacterianas, vegetales, le levadura, insecto y mamífero. Se espera que los especialistas en la técnica estén informados de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas incluyendo *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levaduras, y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y de mieloma. No se harán intentos por describir en detalle los diversos métodos conocidos para la expresión de proteínas en procariotas o eucariotas. En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican las proteínas aisladas de la invención normalmente se conseguirá uniendo de forma funcional el ADN o ADNc a un promotor (que es constitutivo o inducible), seguido de incorporación en un casete de expresión. Los casetes pueden ser adecuados para la replicación e integración en procariotas o eucariotas. Los casetes de expresión típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de inicio, y promotores útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Para obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción, y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli* esto incluye un promotor tal como los promotores de T7, trp, lac, o lambda, un sitio de unión al ribosoma y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción. Para células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y preferiblemente un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias donantes yceptoras de corte y ajuste. Los casetes de la invención pueden transferirse a la célula hospedadora elegida por métodos bien conocidos tales como transformación con cloruro de calcio o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para células de mamífero. Las células transformadas por los casetes pueden seleccionarse por resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los casetes, tales como los genes *amp*, *gpt*, *neo* e *hyg*.

Un especialista en la técnica reconocería que pueden hacerse modificaciones a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención (es decir, PE o un inmunoconjugado formado a partir de una PE de la invención) sin disminuir su actividad biológica. Pueden hacerse algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión, o incorporación de la molécula de direccionamiento en una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas para los especialistas en la técnica e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de inicio, aminoácidos adicionales colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción localizados convenientemente, o aminoácidos adicionales (tales como poli His) para ayudar en las etapas de purificación.

Además de los métodos recombinantes, los inmunoconjugados y las PE de la presente invención también pueden construirse como completo o en parte usando síntesis convencional de péptidos. La síntesis en fase sólida de los

polipéptidos de la presente invención de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud puede conseguirse uniendo el aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble seguido de adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Se describen técnicas para la síntesis en fase sólida por Barany y Merrifield, THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY. VOL. 2: SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS, PARTE A. pág. 3-284; Merrifield, *et al.* J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156 (1963), y Stewart, *et al.*, SOLID PHASE Peptide Synthesis, 2ª ED., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Las proteínas de mayor longitud pueden sintetizarse por condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Los métodos para formar enlaces peptídicos por activación de un extremo carboxilo terminal (por ejemplo, mediante el uso del reactivo de acoplamiento N,N'-diciclohexilcarbodiimida) son conocidos para los especialistas en la técnica.

### iii. Purificación

Una vez expresados, los inmunoconjugados recombinantes y PE de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, y similares (véase, en líneas generales, R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95 % de homogeneidad, y del 98 al 99 % o más de homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, si tienen que usarse de forma terapéutica, los polipéptidos deben estar sustancialmente libres de endotoxina.

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

A menudo, las proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias se aíslan a partir de cuerpos de inclusión y requieren solubilización usando desnaturalizantes fuertes, y posterior repliegamiento. Durante la etapa de solubilización, como se sabe bien en la técnica, debe estar presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un tampón ejemplar con un agente reductor es: Tris 0,1 M pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE (ditioeritritol) 0,3 M. Puede suceder reoxidación de los enlaces disulfuro en presencia de reactivos de tiol de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena, *et al.*, Biochemistry 9: 5015-5021 (1970), y especialmente como se describe por Buchner, *et al.*, *supra*.

La renaturalización se consigue normalmente por dilución (por ejemplo, factor 100) de la proteína desnaturalizada y reducida en tampón de repliegamiento. Un tampón ejemplar es Tris 0,1 M, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8 mM, y EDTA 2 mM.

Como modificación al protocolo de purificación de anticuerpos de dos cadenas, se solubilizan y reducen por separado las regiones de cadena pesada y ligera y después se combinan en la solución de repliegamiento. Se obtiene un rendimiento preferido cuando estas dos proteínas se mezclan en una proporción molar de modo que no se exceda un exceso molar de 5 veces de una proteína sobre la otra. Es deseable añadir glutatión oxidado en exceso u otros compuestos de bajo peso molecular oxidantes a la solución de repliegamiento después de completarse la redistribución rédox.

### b. Resto de direccionamiento

#### i. Marcadores de superficie celular diana

El componente de direccionamiento de la molécula quimérica puede ser contra un marcador de superficie celular. El marcador de superficie celular puede ser una proteína o un carbohidrato. El antígeno de superficie celular puede ser un antígeno asociado a tumor. Preferiblemente, el marcador de superficie celular se expresa exclusivamente, se expresa preferentemente o se expresa a niveles mayores clínicamente relevantes en células cancerosas u otras células de proliferación aberrante. Los antígenos de superficie celular que son dianas para moléculas quiméricas son bien conocidos en la técnica, y se resumen, por ejemplo, en Mufson, Front Biosci (2006) 11:337-43; Frankel, Clin Cancer Res (2000) 6:326-334 y Kreitman, AAPS Journal (2006) 8(3):E532-E551.

Dianas ejemplares de marcadores de superficie celular incluyen receptores de superficie celular. El receptor de superficie celular que puede abordarse usando una toxina de la presente invención incluye, aunque sin limitación, receptor de transferrina, receptor de EGF, CD19, CD22, CD25, CD21, CD79, mesotelina y cadherina. Antígenos adicionales de superficie celular expuestos a terapia dirigida por inmunotoxina incluyen sin limitación MUC1, MAGE, PRAME, CEA, PSA, PSMA, GM-CSFR, CD56, HER2/neu, erbB-2, CD5, CD7. Se conocen otros antígenos asociados a tumor de superficie celular y encuentran uso como dianas.

Las dianas antigénicas pueden encontrarse en numerosos tipos diferentes de células cancerosas, incluyendo sin limitación neuroblastoma, carcinoma de intestino, carcinoma de recto, carcinoma de colon, carcinoma por poliposis

- adenomatosa familiar, cáncer colorrectal hereditario no por poliposis, carcinoma esofágico, carcinoma labial, carcinoma de laringe, carcinoma hipofaringe, carcinoma de lengua, carcinoma de glándula salivar, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma folicular de tiroides, carcinoma anaplásico de tiroides, carcinoma renal, carcinoma renal de parénquima, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello del útero, carcinoma de cuerpo uterino, carcinoma endometrial, carcinoma de corion, carcinoma pancreático, carcinoma de próstata, carcinoma de testículo, carcinoma de mama, carcinoma urinario, melanoma, tumores cerebrales, glioblastoma, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos periféricos, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, leucemia linfática aguda (ALL), leucemia linfática crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma por leucemia de células T adultas, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma bronquial, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico, mieloma múltiple, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma de coroides, seminoma, rhabdomyosarcoma, craneofaringioma, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Ewing, y plasmocitoma.
- En algunas realizaciones, el marcador de superficie celular es mesotelina. Cánceres ejemplares cuyo crecimiento, propagación y/o progresión puede reducirse o inhibirse por direccionamiento a mesotelina incluyen cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma pulmonar, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical y cáncer pancreático.
- En algunas realizaciones, el marcador de superficie celular es CD22. Cánceres ejemplares cuyo crecimiento, propagación y/o progresión puede reducirse o inhibirse por direccionamiento a CD22 incluyen leucemia de células capilares, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), linfoma no Hodgkin, linfoma linfocítico pequeño (SLL) y leucemia linfática aguda (ALL).
- En algunas realizaciones, el marcador de superficie celular es CD25. Cánceres ejemplares cuyo crecimiento, propagación y/o progresión puede reducirse o inhibirse por direccionamiento a CD25 incluyen leucemias y linfomas, incluyendo leucemia de células capilares, y linfoma de Hodgkin.
- En algunas realizaciones, el marcador de superficie celular es un carbohidrato, por ejemplo, antígeno Lewis Y. Cánceres ejemplares cuyo crecimiento, propagación y/o progresión puede reducirse o inhibirse por direccionamiento al antígeno Lewis Y incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer pulmonar y cáncer pancreático.
- En algunas realizaciones, el marcador de superficie celular es CD33. Cánceres ejemplares cuyo crecimiento, propagación y/o progresión puede reducirse o inhibirse por direccionamiento a CD33 incluyen leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielomonocítica crónica (CML), y trastornos mieloproliferativos.

## ii. Restos de direccionamiento de anticuerpo

- En una realización preferida, el resto de direccionamiento es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo que se une específicamente a un marcador superficial en una célula. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la molécula química es una inmunotoxina.
- En otra realización preferida, el resto de direccionamiento es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un marcador superficial en una célula. Un fragmento de anticuerpo preferido es un Fv de cadena sencilla. En este documento se describe la construcción y caracterización de inmunotoxinas basadas en citotoxina donde la citotoxina está fusionada a un scFv. Otros fragmentos de anticuerpo preferidos a los que puede fusionarse una toxina o fragmento citotóxico incluyen el fragmento Fab', Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, un anticuerpo estabilizado por hélice, un diacuerpo, un anticuerpo estabilizado por disulfuro, y un anticuerpo de un único dominio (por ejemplo, un anticuerpo de camélido).
- La fusión de una citotoxina a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser al extremo N-terminal o C-terminal del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Dicha fusión normalmente se consigue empleando tecnologías de ADN recombinante.
- Se conocen en la técnica numerosos anticuerpos para su uso en una inmunotoxina y encuentran uso en las presentes composiciones y métodos. Anticuerpos ejemplares contra antígenos tumorales incluyen sin limitación anticuerpos contra el receptor de transferrina (por ejemplo, HB21 y variantes del mismo), anticuerpos contra CD22 (por ejemplo, RFB4 y variantes del mismo), anticuerpos contra CD25 (por ejemplo, anti-Tac y variantes del mismo), anticuerpos contra mesotelina (por ejemplo, SS1, SSP1, HN1, HN2, MN y variantes de los mismos) y anticuerpos contra el antígeno Lewis Y (por ejemplo, B3 y variantes del mismo).
- Se han descrito anticuerpos para su inclusión en una inmunotoxina y que encuentran uso en la presente invención, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.242.824 (anti-receptor de transferrina); 5.846.535 (anti-CD25); 5.889.157 (anti-Lewis Y); 5.981.726 (anti-Lewis Y); 5.990.296 (anti-Lewis Y); 7.081.518 (anti-mesotelina); 7.355.012 (anti-CD22 y anti-CD25); 7.368.110 (anti-mesotelina); 7.470.775 (anti-CD30); 7.521.054 (anti-CD25); 7.541.034 (anti-

CD22); en la publicación de patente de Estados Unidos N° 2007/0189962 (anti-CD22), y se han revisado en, por ejemplo, Frankel, Clin Cancer Res (2000) 6:326-334 y Kreitman, AAPS Journal (2006) 8(3):E532-E551.

También se conocen en la técnica numerosas inmunotoxinas usadas satisfactoriamente contra el cáncer y en enfermedad aguda de injerto contra hospedador, y encuentran uso en las presentes composiciones y métodos, es decir, reemplazando la citotoxina con una PE mejorada de la presente invención. Pueden encontrarse inmunotoxinas ejemplares, por ejemplo, en la red mundial a Internet en clinicaltrials.gov e incluyen sin limitación LMB-2 (anti-Tac(Fv)-PE38), BL22 y HA22 (RFB4(dsFv)-PE38), SS1P (SS1(dsFv)-PE38), HB21-PE40. Se describen inmunotoxinas adicionales de uso en las patentes enumeradas anteriormente y en este documento, y se revisan en, por ejemplo, Frankel, Clin Cancer Res (2000) 6:326-334 y Kreitman, AAPS Journal (2006) 8(3):E532-E551.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es la parte Fv de HA22. HA22 es una forma mejorada recientemente desarrollada de BL22. En HA22, los restos SSY en la CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo ("V<sub>H</sub>") se mutaron en THW. En comparación con su anticuerpo parental, RFB4, HA22 tiene un aumento de 5-10 veces en la actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares CD22-positivas y es hasta 50 veces más citotóxico para células de pacientes con CLL y HCL (Salvatore, G., *et al.*, Clin Cancer Res, 8(4):995-1002 (2002); véase también, la solicitud del mismo propietario que la presente PCT/US02/30316, publicación internacional WO 03/027135).

SS1P ha demostrado eliminar específicamente líneas celulares que expresan mesotelina y causar regresiones de tumores que expresan mesotelina en ratones (Hassan, R. *et al.*, Clin Cancer Res 8:3520-6 (2002); Onda, M. *et al.*, Cancer Res 61:5070-7 (2001)). Basándose en estos estudios y los datos de seguridad apropiados, se están realizando 2 ensayos en fase I con SS1P en el National Cancer Institute en pacientes con cánceres que expresan mesotelina (Chowdhury, P. S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95:669-74 (1998); Hassan, R. *et al.*, Proc Am Soc Clin Oncol 21:29a (2002)). Además, otras terapias que abordan la mesotelina están en desarrollo en preclínico (Thomas, A.M. *et al.*, J Exp Med 200:297-306 (2004)). HN1 y HN2 son anticuerpos humanos anti-mesotelina, descritos, por ejemplo, en Feng, *et al.*, Mol Cancer Ther (2009) 8(5): 1113-8.

HA22-LR y SS1P-LR son variantes lisosómicas resistentes de las inmunotoxinas HA22 y SS1P donde se han eliminado grupos de escisión para proteasas lisosómicas. Estas variantes se describen, por ejemplo, en Weldon, *et al.*, Blood, (2009) 113(16):3792-800 y en el documento WO 2009/032954.

### iii. Restos de direccionamiento no de anticuerpo

En otra realización preferida, el resto de direccionamiento es un ligando que se une específicamente a un receptor sobre una superficie celular. El ligando puede ser cualquier ligando que se una a un marcador de superficie celular. Un ligando preferido es VEGF, Fas, TRAIL, una citoquina (por ejemplo, IL-2, IL-15, IL-4, IL-13), una linfoquina, una hormona, un factor de crecimiento (por ejemplo, TGF $\alpha$ , factor de crecimiento neuronal, factor de crecimiento epidérmico).

## 4. Composiciones farmacéuticas y administración

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica o un medicamento que comprende al menos una proteína quimérica de la presente invención, preferiblemente una toxina dirigida, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica o medicamento puede administrarse a un paciente para el tratamiento de una afección incluyendo, aunque sin limitación, una enfermedad maligna o cáncer.

### a. Formulación

Las composiciones farmacéuticas o medicamentos para su uso en la presente invención pueden formularse por técnicas convencionales usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en este documento y en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> Ed., University of the Sciences en Filadelfia, Lippencott Williams y Wilkins (2005). Las proteínas quiméricas de la presente invención pueden formularse para su administración por cualquier vía adecuada, incluyendo mediante inhalación, por vía tópica, nasal, oral, parenteral, o rectal. Por tanto, la administración de la composición farmacéutica puede hacerse por inyección intradérmica, subdérmica, intravenosa, intramuscular, intranasal, de inhalación, intracerebral, intratraqueal, intra-arterial, intraperitoneal, intravesical, intrapleural, intracoronaria, subcutánea o intratumoral, con una jeringa y otros dispositivos. También se contempla la administración transdérmica, como son la administración por inhalación o en aerosol. Pueden administrarse comprimidos y cápsulas por vía oral, rectal o vaginal.

Las composiciones para administración comúnmente comprenderán una solución de la proteína quimérica, preferiblemente una toxina dirigida, disuelta en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Puede usarse diversos vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas convencionales de esterilización bien conocidas. Las composiciones pueden contener

sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se necesite para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes del fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

Las composiciones de toxina dirigida de esta invención son adecuadas para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa o administración en una cavidad corporal.

Las proteínas quiméricas, preferiblemente toxinas dirigidas, de la presente invención pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma monodosis, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones inyectables son preferiblemente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y se preparan preferiblemente supositorios a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen de aproximadamente el 0,1 al 75 %, preferiblemente de aproximadamente el 1 al 50 %, del ingrediente activo.

Pueden prepararse formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones de toxina dirigida de la presente invención en forma de implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas particulados. Para una amplia revisión de los sistemas de suministro de proteínas véase, Banga, A.J., THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, PA, (1995). Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas, y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas, y microcápsulas más pequeñas de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  se mencionan generalmente como nanopartículas, nanoesferas, y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de modo que solamente se administran por vía intravenosa nanopartículas. Las micropartículas son normalmente de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter J., COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, pág. 219-342 (1994); y Tice y Tabibi, TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, pág. 315-339 (1992).

Pueden usarse polímeros para liberación controlada por iones de composiciones de toxina dirigida de la presente invención. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en el control del suministro del fármaco portado (Langer R., Accounts Chem. Res., 26:537-542 (1993)). Por ejemplo, el copolímero de bloque, polaxámero 407 existe como un líquido viscoso aunque móvil a bajas temperaturas pero forma un gel semisólido a temperatura corporal. Ha demostrado ser un vehículo eficaz para formulación y suministro sostenido de interleuquina-2 recombinante y ureasa (Johnston *et al.*, Pharm. Res., 9:425-434 (1992); y Pec *et al.*, J. Parent. Sci. Tech., 44(2):58-65 (1990)). Como alternativa, se ha usado hidroxipatita como microvehículo para liberación controlada de proteínas (Ijntema *et al.*, Int. J. Pharm., 112:215-224 (1994)). En otro aspecto más, se usan liposomas para liberación controlada así como para dirigir los fármacos de los fármacos encapsulados en lípido (Betageri *et al.*, LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para el suministro controlado de proteínas terapéuticas. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.055.303, 5.188.837, 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 4.957.735 y 5.019.369, 5.055.303; 5.514.670; 5.413.797; 5.268.164; 5.004.697; 4.902.505; 5.506.206, 5.271.961; 5.254.342 y 5.534.496.

Las formulaciones adecuadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad eficaz de una composición de la presente invención con un vehículo. Los vehículos preferidos incluyen disolventes absorbibles farmacológicamente aceptables para ayudar al paso a través de la piel del hospedador. Por ejemplo, hay dispositivos transdérmicos en forma de un vendaje que comprende un miembro de refuerzo, un depósito que contiene la composición opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera de control de la velocidad para suministrar la composición a la piel del hospedador a una velocidad controlada y predeterminada durante un periodo prolongado de tiempo, y medios para fijar el dispositivo a la piel. También pueden usarse formulaciones transdérmicas de matriz.

Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y los ojos, son preferiblemente soluciones acuosas, pomadas, cremas o geles bien conocidos en la técnica. Éstas pueden contener solubilizantes, estabilizantes, agentes potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

Para administración oral, una composición farmacéutica o un medicamento puede adoptar la forma de, por ejemplo,

un comprimido o una cápsula preparada por medios convencionales con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se prefieren comprimidos y cápsulas de gelatina que comprenden el ingrediente activo, es decir, una composición de la presente invención, junto con (a) diluyentes o cargas, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa (por ejemplo, etil celulosa, celulosa microcristalina), glicina, pectina, poliácridatos y/o hidrogenofosfato de calcio, sulfato de calcio, (b) lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio, estearatos metálicos, dióxido de silicio coloidal, aceite vegetal hidrogenado, almidón de maíz, benzoato sódico, acetato sódico y/o polietilenglicol; para comprimidos también (c) aglutinantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona y/o hidroxipropil metilcelulosa; si se desea (d) disgregantes, por ejemplo, almidones (por ejemplo, almidón de patata o almidón sódico), glicolato, goma de agar, ácido algínico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; (e) agentes humectantes, por ejemplo, lauril sulfato sódico, y/o (f) absorbentes, colorantes, aromas y edulcorantes.

Los comprimidos pueden recubrirse con película o recubrirse de forma entérica de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes, o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agentes de suspensión, por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina o goma arábiga; vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados; y conservantes, por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico. Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes, agentes aromatizantes, colorantes, y/o edulcorantes según sea apropiado. Si se desea, las preparaciones para administración oral pueden formularse adecuadamente para dar liberación controlada de la composición activa.

Para administración por inhalación, la proteína quimérica, preferiblemente un anticuerpo y/o toxina dirigida puede suministrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, 1,1,1,2-tetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo de la proteína quimérica, preferiblemente un anticuerpo y/o toxina dirigida y una base en polvo adecuada, por ejemplo, lactosa o almidón.

Las composiciones también pueden formularse en composiciones rectales, por ejemplo, supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases convencionales de supositorio, por ejemplo, manteca de cacao u otros glicéridos.

Además, las composiciones pueden formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de larga acción pueden administrarse por implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, la composición puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas monodosis que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina metálica o de plástico, por ejemplo, un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede venir acompañado por instrucciones para su administración.

## **b. Dosificación**

En una realización de la presente invención, una composición farmacéutica o medicamento se administra a un paciente a una dosis terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar, o controlar una enfermedad o afección maligna, tal como cáncer. La composición farmacéutica o medicamento se administra a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta terapéutica o de diagnóstico eficaz en el paciente. Una respuesta terapéutica o de diagnóstico eficaz es una respuesta que detiene al menos parcialmente o ralentiza los síntomas o complicaciones de la enfermedad o afección maligna. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz".

La dosificación de proteínas quiméricas, preferiblemente toxinas dirigidas, o composiciones administradas depende de la especie de animal de sangre caliente (mamífero), el peso corporal, edad, estado individual, área superficial del área a tratar y la forma de administración. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza, y grado de cualquier efecto adverso que acompañe a la administración de un compuesto particular en un sujeto particular. Una dosificación unitaria para administración a un mamífero de aproximadamente 50 a 70 kg puede contener entre aproximadamente 5 y 500 mg del ingrediente activo. Normalmente, una dosificación del compuesto de la presente invención, es una dosificación que es suficiente para conseguir el efecto deseado.

Los programas óptimos de dosificación pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de proteína quimérica, preferiblemente toxina dirigida, en el cuerpo de un sujeto. En general, la dosificación es de 1 ng a 1.000 mg por kg de peso corporal y puede darse una vez o más al día, a la semana, al mes, o al año. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Un especialista en la técnica será capaz de determinar la dosificación óptima para la administración de una proteína quimérica, preferiblemente una toxina dirigida, a un ser humano siguiendo protocolos establecidos conocidos en la técnica y la descripción de este documento.

Las dosificaciones óptimas, la toxicidad, y la eficacia terapéutica de las composiciones pueden variar dependiendo de la potencia relativa de las composiciones individuales y pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la DD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción  $DL_{50}/DE_{50}$ . Se prefieren composiciones que muestran grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse composiciones que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichas composiciones al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células normales y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de, por ejemplo, estudios en animales (por ejemplo, roedores y monos) pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de compuestos de la presente invención recae preferiblemente dentro del intervalo de concentraciones en circulación que incluye la  $DE_{50}$  con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración. Para cualquier composición para su uso en los métodos de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluye la  $CI_{50}$  (la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición la mitad de la máxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En general, la dosis equivalente de una proteína quimérica, preferiblemente una toxina dirigida es de aproximadamente 1 ng/kg a 100 mg/kg para un sujeto típico.

Una composición típica de toxina dirigida de la presente invención para administración intravenosa sería de aproximadamente 0,1 a 10 mg por paciente por día. Pueden usarse dosificaciones desde 0,1 hasta aproximadamente 100 mg por paciente por día. Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los especialistas en la técnica y se describen en más detalles en publicaciones tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Ed., University of the Sciences en Filadelfia, Lippencott Williams y Wilkins (2005).

La dosis ejemplares de las composiciones descritas en este documento, incluyen cantidades de miligramos o microgramos de la composición por kilogramo de sujeto o peso de la muestra (por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo. Se entiende además que las dosis apropiadas de una composición dependen de la potencia de la composición con respecto al efecto deseado a conseguir. Cuando tiene que administrarse una o más de estas composiciones a un mamífero, un médico, veterinario, o investigador puede prescribir, por ejemplo, una dosis relativamente baja en primer lugar, aumentando posteriormente la dosis hasta obtener una respuesta apropiada. Además, se entiende que el nivel específico de dosis para cualquier sujeto mamífero particular dependerá de diversos factores incluyendo la actividad de la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, género, y dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos, y el grado de expresión o actividad a modular.

En una realización de la presente invención, una composición farmacéutica o medicamento que comprende una proteína quimérica, preferiblemente una toxina dirigida, de la presente invención se administra, por ejemplo, en una dosis diaria en el intervalo de aproximadamente 1 mg de compuesto por kg de peso del sujeto (1 mg/kg) a aproximadamente 1 g/kg. En otra realización, la dosis es una dosis en el intervalo de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg. En otra realización más, la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg. Una dosis preferida es de aproximadamente 10 mg/kg. La dosis diaria puede administrarse una vez al día o dividirse en subdosis y administrarse en múltiples dosis, por ejemplo, dos veces, tres veces, o cuatro veces al día. Sin embargo, como apreciará un especialista en la técnica, las composiciones descritas en este documento pueden administrarse en diferentes cantidades y en diferentes momentos. Los especialistas en la técnica también apreciarán que ciertos factores pueden influir en la dosificación y cronología requerida para tratar de forma eficaz a un sujeto, incluyendo, aunque sin limitación, la gravedad de la enfermedad o afección maligna, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una

cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos.

Dosis ejemplares de ABT-263 son dosis diarias de 100-500 mg según lo necesario. Puede administrarse ABT-263 a una concentración de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. Dosis ejemplares de ABT-737 son aproximadamente 50-200 mg/kg, por ejemplo, dosis diarias de aproximadamente 100 mg/kg.

Después del tratamiento satisfactorio, puede ser deseable que el sujeto experimente terapia de mantenimiento para evitar la recidiva de la enfermedad o afección maligna tratada.

### **c. Administración**

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad o afección maligna, tal como cáncer, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general de la salud del paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es esa que proporciona alivio subjetivo de uno o más síntomas o una mejora objetivamente identificable observada por el médico u otro observador cualificado.

La determinación de una cantidad eficaz pertenece a las capacidades de los especialistas en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en este documento. Generalmente, una cantidad eficaz o efectiva de un inmunoconjugado se determina administrando primero una dosis baja o cantidad pequeña del inmunoconjugado, y después aumentando gradualmente la dosis o dosificaciones administradas, añadiendo una segunda o tercera medicación según lo necesario, hasta que se observe un efecto deseado en el sujeto tratado con efectos secundarios mínimos o no tóxicos.

Se administran dosis únicas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y frecuencia requerida y tolerada por el paciente. En cualquier caso, la composición debe proporcionar una cantidad suficiente de las proteínas de esta invención para tratar de forma eficaz al paciente. Preferiblemente, la dosificación se administra una vez pero puede aplicarse periódicamente hasta conseguir un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifiquen la interrupción de la terapia. Generalmente, la dosis es suficiente para tratar o mejorar síntomas o signos de enfermedad sin producir toxicidad inaceptable al paciente.

Para conseguir el efecto terapéutico deseado, las composiciones pueden administrarse durante múltiples días a la dosis diaria terapéuticamente eficaz. Por tanto, la administración terapéuticamente eficaz de composiciones para tratar una enfermedad o afección maligna descrita en este documento en un sujeto puede requerir administración periódica (por ejemplo, diaria) que continúe durante un periodo que varía de tres días a dos semanas o más. Normalmente, las composiciones se administrarán durante al menos tres días consecutivos, a menudo durante al menos cinco días consecutivos, más a menudo durante al menos diez, y a veces durante 20, 30, 40 o más días consecutivos. Aunque las dosis diarias consecutivas son una vía preferida para conseguir una dosis terapéuticamente eficaz, puede conseguirse un efecto terapéuticamente beneficioso incluso si los compuestos o composiciones no se administran diariamente, siempre que la administración se repita de forma suficientemente frecuente para mantener una concentración terapéuticamente eficaz de la composición en el sujeto. Por ejemplo, se puede administrar una composición en días alternos, cada tres días o, si se emplean intervalos mayores de dosis y se toleran por el sujeto, una vez a la semana.

Entre los diversos usos de las toxinas dirigidas de la presente invención se incluyen diversas enfermedades causadas por células humanas específicas que pueden eliminarse por la acción tóxica de la proteína de fusión. Por ejemplo, las células abordadas podrían expresar un marcador de superficie celular tal como mesotelina, CD22 o CD25.

### **5. Métodos para inhibir el crecimiento tumoral**

Las composiciones de la presente invención encuentran uso en diversos modos. Por ejemplo, las moléculas de PE de la presente invención, por ejemplo, como partes de una molécula quimérica, encuentran uso para (i) inducir la apoptosis en una célula que alberga uno o más marcadores superficiales, (ii) inhibir crecimiento indeseado, hiperproliferación o supervivencia de una célula que alberga uno o más marcadores de superficie celular, (iii) tratar una afección, tal como un cáncer, y (iv) proporcionar terapia para un mamífero que ha desarrollado una enfermedad causada por la presencia de células que albergan uno o más marcadores de superficie celular.

Puede usarse cualquier célula o célula tumoral que exprese uno o más marcadores de superficie celular, preferiblemente un receptor de superficie celular, por ejemplo, como se describe en este documento, para poner en práctica un método de la presente invención. Una célula o célula tumoral preferida que exprese un marcador superficial se selecciona entre el grupo que consiste en neuroblastoma, carcinoma de intestino, carcinoma de recto, carcinoma de colon, carcinoma por poliposis adenomatosa familiar, cáncer colorrectal hereditario no por poliposis,



carcinoma esofágico, carcinoma labial, carcinoma de laringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de lengua, carcinoma de glándula salivar, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma folicular de tiroides, carcinoma anaplásico de tiroides, carcinoma renal, carcinoma renal de parénquima, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello del útero, carcinoma de cuerpo uterino, carcinoma endometrial, carcinoma de corion, carcinoma pancreático, carcinoma de próstata, carcinoma de testículo, carcinoma de mama, carcinoma urinario, melanoma, tumores cerebrales, glioblastoma, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos periféricos, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, leucemia linfática aguda (ALL), leucemia linfática crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma por leucemia de células T adultas, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma bronquial, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico, mieloma múltiple, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma de coroides, seminoma, rhabdomyosarcoma, craneofaringioma, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Ewing, y plasmocitoma.

Los métodos de la presente invención pueden ponerse en práctica *in vitro* o *in vivo*. Cuando se hace referencia a una célula, se entiende que este término también incluye una población de células, es decir, más de una célula.

#### **Uso de composiciones para inducir apoptosis en una célula que alberga uno o más marcadores de superficie celular**

La apoptosis desempeña un papel central tanto en el desarrollo como en la homeostasis de organismos multicelulares. "Apoptosis" se refiere a muerte celular programada y se caracteriza por ciertas características celulares, tales como formación de vesículas de la membrana, condensación y fragmentación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y un patrón de tinción positivo "TUNEL" (marcage final por mella de UTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal). Una etapa posterior en el proceso apoptótico es la degradación de la membrana plasmática, que vuelve a las células apoptóticas permeables a diversos colorantes (por ejemplo, yoduro de propidio).

La apoptosis puede inducirse por múltiples vías de señalización independientes que convergen en un mecanismo efector final que consiste en múltiples interacciones entre varios receptores de muerte y sus ligandos, que pertenecen a la superfamilia de receptores/ligandos de factor de necrosis tumor (TNF). Los receptores de muerte mejor caracterizados son CD95 ("Fas"), TNFR1 (p55), el receptor de muerte 3 (DR3 o Apo3/TRAMO), DR4 y DR5 (apo2-TRAIL-R2). El mecanismo efectos final de la apoptosis es la activación de una serie de proteinasas denominadas caspasas. La activación de estas caspasas provoca la escisión de una serie de proteínas celulares vitales y muerte celular.

La presente invención proporciona métodos para inducir la apoptosis en una célula que expresa uno o más marcadores de superficie celular. En un aspecto, el método para inducir la apoptosis en una célula comprende la etapa de exponer o poner en contacto la célula que expresa uno o más marcadores de superficie celular, tal como un receptor de superficie celular, a una PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula química, como se describe en este documento. Normalmente, las células se exponen a o se ponen en contacto con cantidades eficaces del inmunocnjugado, donde el contacto provoca la inducción de apoptosis.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inducir que una célula tumoral que expresa uno o más marcadores de superficie celular experimente la apoptosis, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula química.

#### **Uso de composiciones para inhibir el crecimiento, la hiperproliferación o la supervivencia de una célula que alberga uno o más marcadores de superficie celular**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar estrategias terapéuticas mejoradas para el tratamiento de cánceres usando las composiciones de la invención. En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inhibir al menos uno de crecimiento indeseado, hiperproliferación, o supervivencia de una célula. Este método comprende la etapa de poner en contacto una célula que expresa un marcador superficial con una cantidad eficaz de una PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula química, como se describe en este documento, donde la etapa de contacto provoca la inhibición de al menos uno de crecimiento indeseado, hiperproliferación, o supervivencia de la célula. En una realización, este método comprende la etapa de determinar si la célula expresa uno o más marcadores de superficie celular, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Normalmente, las células se exponen a o se ponen en contacto con cantidades eficaces del inmunocnjugado, donde el contacto provoca la inhibición de al menos uno de crecimiento indeseado, hiperproliferación, o supervivencia de la célula.

Por tanto, en un aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento de una población de células que albergan uno o más marcadores de superficie celular. En una realización preferida, este método comprende las etapas de (a) poner en contacto una población de células con una proteína química que comprende (i) un resto de direccionamiento que se une específicamente a al menos uno de los marcadores de superficie celular y (ii) una PE de la presente invención, por ejemplo, con sustituciones de Gly, Ala o Ser en D406 y

Q592. De ese modo se inhibe el crecimiento de la población de células.

Muchos tumores forman metástasis. Por tanto, en otro aspecto de la presente invención, las composiciones de la presente invención se usan para evitar la formación de una metástasis. Este método comprende la etapa de administrar a una célula tumoral una composición de la presente invención donde la administración provoca la prevención de metástasis. En una realización preferida, la composición comprende una toxina dirigida que comprende un anticuerpo contra un antígeno de superficie celular y una PE de la presente invención. Normalmente, las células se exponen a o se ponen en contacto con cantidades eficaces del inmunoconjugado, donde el contacto provoca la prevención de metástasis.

#### **Uso de composiciones para tratar el cáncer**

Los métodos de la presente invención pueden ponerse en práctica *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona una PE de la invención para su uso en un método para tratar a un sujeto una afección cancerosa. Este método comprende la etapa de administrar a un sujeto que se ha diagnosticado con un cáncer cantidades terapéuticamente eficaces de la molécula mejorada de PE, como se describe en este documento, donde la afección cancerosa se caracteriza por crecimiento indeseado o proliferación de una célula que expresa uno o más marcadores de superficie celular, y donde la etapa de administración provoca el tratamiento del sujeto.

En una realización preferida, la composición comprende una inmunotoxina con una PE mejorada de la presente invención, o variantes de la misma. Normalmente, las células se exponen a o se ponen en contacto con cantidades eficaces de la inmunotoxina, donde el contacto provoca el tratamiento del sujeto.

Las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar cualquier cáncer descrito en este documento, por ejemplo, aquellos sometidos a tratamiento con una inmunotoxina. En una realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer pulmonar que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Un cáncer pulmonar incluye, aunque sin limitación, carcinoma broncogénico [células escamosas, células pequeñas indiferenciadas, células grandes indiferenciadas, adenocarcinoma], carcinoma alveolar [bronquiolar], adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma, SCLC, y NSCLC.

En otra realización de la presente invención, se usa una composición de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un sarcoma que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Un sarcoma incluye, aunque sin limitación, cánceres tales como angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma.

En otra realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer gastrointestinal que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Un cáncer gastrointestinal incluye, aunque sin limitación cánceres de esófago [carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma], estómago [carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma], páncreas [adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, VIPoma], intestino delgado [adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma], e intestino grueso [adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma].

En una realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer del tracto genitourinario que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Los cánceres del tracto genitourinario incluyen, aunque sin limitación cánceres de riñón [adenocarcinoma, tumor de Wilms (nefroblastoma), linfoma, leucemia, carcinoma de células renales], vejiga y uretra [carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma], próstata [adenocarcinoma, sarcoma], y testículo [seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, tumor de células de Leydig, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma].

En otra realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención se usa para tratar a un sujeto que padece un cáncer de hígado que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Un cáncer de hígado incluye, aunque sin limitación, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, y hemangioma.

En una realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer de piel que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Los cánceres de piel incluyen, aunque sin limitación, melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, nevus, nevus displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, y psoriasis.

En una realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer ginecológico que expresa uno o más marcadores de

superficie celular. Los cánceres ginecológicos incluyen, aunque sin limitación, cáncer de útero [carcinoma de endometrio], cuello del útero [carcinoma cervical, displasia cervical pre-invasiva], ovarios [carcinoma de ovario (cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma endometriode, adenocarcinoma de células claras, carcinoma no clasificado), tumores de células de la granulosa-teca, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno y otros tumores de células germinales], vulva [carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma], vagina [carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide (rabdiosarcoma embrionario), y trompas de Falopio [carcinoma].

En otra realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer óseo que expresa uno o más marcadores de superficie celular. El cáncer óseo incluye, aunque sin limitación, sarcoma osteogénico [osteosarcoma], fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno [sarcoma de células del retículo], mieloma múltiple, tumor maligno de gigantocitos, cordoma, osteocondroma [exostosis osteocartilaginosa], condroma benigno, condroblastoma, fibroma condromixioide, osteoma osteoide, y tumores de gigantocitos.

En una realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer del sistema nervioso que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Los cánceres del sistema nervioso incluyen, aunque sin limitación, cánceres de cráneo [osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, enfermedad de Paget del hueso], meninges [meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis], cerebro [astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma (pinealoma), glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos], y médula espinal [neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma].

En una realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer hematológico que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Los cánceres hematológicos incluyen, aunque sin limitación, cáncer de sangre [leucemia mieloide (aguda y crónica), leucemia de células capilares, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico], enfermedad de Hodgkin, y linfoma no Hodgkin (linfoma maligno).

En una realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer mediado por interacción de unión de mesotelina-CA125. Cánceres ejemplares cuyo crecimiento, propagación y/o progresión están mediados al menos parcialmente por la unión de CA125/mesotelina incluyen cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma pulmonar y cáncer pancreático.

En una realización de la presente invención, se usa una inmunotoxina que comprende una PE de la presente invención para tratar a un sujeto que padece un cáncer de las glándulas suprarrenales que expresa uno o más marcadores de superficie celular. Un cáncer de las glándulas suprarrenales incluye, aunque sin limitación, neuroblastoma.

Los métodos para tratar un cáncer pueden comprender opcionalmente una o más de las siguientes etapas: obtener una muestra bioquímica de tejido o fluido de un individuo; explorar la muestra biológica para la expresión de uno o más marcadores de superficie celular, preferiblemente un receptor de superficie celular, por ejemplo poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo dirigido al marcador superficial, preferiblemente un receptor de superficie celular; o explorando la muestra biológica para la expresión de un polinucleótido de marcador superficial, preferiblemente un polinucleótido de receptor de superficie celular, por ejemplo detectando un ARNm de marcador superficial, preferiblemente, un ARNm de receptor de superficie celular. Esto puede hacerse usando tecnologías convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, transferencia de Western, transferencia de Northern o PCR.

#### **Uso de composiciones para tratar a un sujeto que ha desarrollado una enfermedad causada por la presencia de células que albergan uno o más marcadores de superficie celular**

También se proporciona una PE de la invención para su uso en un método para proporcionar terapia a un mamífero que ha desarrollado una enfermedad causada por la presencia o proliferación aberrante de células que albergan de forma preferente o sobre-expresan uno o más marcadores de superficie celular. En una realización preferida, este método comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una proteína quimérica que comprende (i) un resto de direccionamiento que se une específicamente a al menos un marcador superficial en dichas células y (ii) una PE de la presente invención, por ejemplo, con sustituciones de Gly, Ala o Ser en D406 y Q592A.

En una realización preferida, la proteína quimérica comprende una inmunotoxina con una PE de la presente invención, o variantes de la misma. Normalmente, las células se exponen a o se ponen en contacto con cantidades eficaces de la inmunotoxina, donde el contacto provoca el tratamiento del sujeto.

En otra realización, esta invención proporciona la eliminación de células diana *in vitro* o *ex vivo* usando las moléculas de PE de la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse moléculas quiméricas que comprenden las

moléculas de PE de la invención para depurar células abordadas de una población de células en un cultivo. Por tanto, por ejemplo, pueden depurarse células cultivadas de un paciente que tiene un cáncer que expresa un marcador de superficie celular abordado (por ejemplo, CD22, CD25, mesotelina, Lewis Y) de células cancerosas poniendo en contacto el cultivo con moléculas quiméricas dirigidas contra el marcador de superficie celular de interés, como se describe en este documento.

En algunos casos, las células diana pueden estar contenidas dentro de una muestra biológica. Una "muestra biológica" como se usa en este documento es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene células diana y células no diana. Dichas muestras incluyen, aunque sin limitación, tejido de biopsia, sangre, y células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos). Una muestra biológica se obtiene normalmente de un eucariota multicelular, preferiblemente un mamífero tal como rata, ratón, vaca, perro, cobaya, o conejo, y más preferiblemente un primate, tal como un macaco, chimpancé, o ser humano. Más preferiblemente, la muestra es de un ser humano.

## 6. Métodos para supervisar la enfermedad

La invención proporciona métodos para detectar la inhibición del crecimiento tumoral en un paciente que padece o es susceptible a un cáncer que puede tratarse con una toxina dirigida, por ejemplo, un cáncer con un marcador de superficie celular. Los métodos son particularmente útiles para controlar un curso de tratamiento que se está administrando a un paciente usando las moléculas de PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, como se describe en este documento. Los métodos pueden usarse para controlar tanto el tratamiento terapéutico sobre pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico sobre pacientes asintomáticos.

Los métodos de control implican determinar un valor basal de carga tumoral en un paciente antes de la administración de una dosificación de las moléculas de PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, y comparar éste con un valor de la carga tumoral después del tratamiento, o con la carga tumoral en un paciente que no recibe tratamiento.

Una disminución significativa (es decir, mayor del margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación típica desde la media de dichas mediciones) en el valor de la carga tumoral indica un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración de las moléculas de PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, ha bloqueado la progresión del crecimiento tumoral y/o metástasis).

En otras palabras, se determina un valor de control (es decir, una media y desviación típica) de la carga tumoral para una población de control o una población normal (por ejemplo, carga = cero). Normalmente, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de la carga tumoral en un paciente después de administrar las moléculas de PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, se comparan después con el valor de control. Una disminución significativa en la carga tumoral respecto al valor de control (por ejemplo, mayor de una desviación típica desde la media) indica un resultado de tratamiento positivo. Una ausencia de disminución significativa o un aumento indica un resultado de tratamiento negativo.

En otros métodos, se determina un valor de control de carga tumoral (por ejemplo, una media y desviación típica) a partir de una población de control de individuos que han experimentado tratamiento recibiendo un régimen de moléculas de PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula quimérica, como se describe en este documento. Los valores medidos de carga tumoral en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación típica) del valor de control, puede interrumpirse el tratamiento. Si el nivel de carga tumoral en un paciente está significativamente por encima del valor de control, se justifica la administración continuada del agente.

En otros métodos, se controla un paciente que no está recibiendo en ese momento tratamiento pero ha experimentado un curso previo de tratamiento para la carga tumoral para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de la carga tumoral en el paciente puede compararse con un valor de carga tumoral previamente conseguido en el paciente después de un curso previo de tratamiento. Un aumento significativo en la carga tumoral respecto a la medición previa (es decir, mayor de un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que puede reanudarse el tratamiento. Como alternativa, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación típica) determinado en una población de pacientes después de experimentar un curso de tratamiento. Como alternativa, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados de forma profiláctica que siguen sin síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran mejora de las características de la enfermedad. En todos estos casos, un aumento en la carga tumoral respecto al nivel de control (es decir, más de una desviación típica) es un indicador de que debe reanudarse el tratamiento en un paciente.

La muestra tisular para el análisis es normalmente sangre, plasma, suero, moco, biopsia tisular, tumor, fluido ascítico o fluido cefalorraquídeo del paciente. La muestra puede analizarse para indicaciones de neoplasia. La neoplasia o carga tumoral puede detectarse usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, observación visual de

una biopsia por un patólogo cualificado, u otras técnicas de visualización, por ejemplo, radiografía, ultrasonidos, imágenes de resonancia magnética (MRI).

## 7. Kits, recipientes, dispositivos y sistemas

Para su uso en las aplicaciones de diagnóstico, investigación, y terapéuticas descritas anteriormente, también se proporcionan por la invención kits y sistemas. Los kits de la presente invención comprenderán una molécula química que comprende una PE de la presente invención, por ejemplo, como parte de una molécula química. Las realizaciones de las presentes PE y moléculas químicas son como se describen en este documento.

Además, los kits y sistemas pueden incluir materiales de instrucciones que contienen directrices (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención. Las instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión en diversas formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Aunque los materiales de instrucciones normalmente comprenden materiales escritos o impresos no se limitan a ello. Se contempla por esta invención cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, aunque sin limitación medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan dichos materiales de instrucciones.

Puede prepararse una amplia diversidad de kits, sistemas, y composiciones de acuerdo con la presente invención, dependiendo del usuario pretendido del kit y sistema y las necesidades particulares del usuario.

Se proporcionan kits con dosis unitarias de la composición activa, por ejemplo en dosis orales, vaginales, rectales, transdérmicas, o inyectables (por ejemplo, para inyección intramuscular, intravenosa, o subcutánea). En dichos kits, además de los recipientes que contienen las dosis unitarias, habrá un prospecto que describe el uso y los beneficios consiguientes de la composición en el tratamiento de una enfermedad o afección maligna. Las composiciones activas adecuadas y dosis unitarias son las descritas en este documento anteriormente.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo por claridad y comprensión, será muy evidente para los especialistas en la técnica a la luz de los contenidos de esta invención que pueden hacerse ciertas variaciones, cambios, modificaciones y sustituciones de equivalentes a la misma sin alejarse necesariamente del espíritu y alcance de esta invención. Como resultado, las realizaciones descritas en este documento están sometidas a diversas modificaciones, cambios y similares, determinándose el alcance de esta invención únicamente por referencia a las reivindicaciones adjuntas a la misma. Los especialistas en la técnica reconocerán fácilmente diversos parámetros no críticos que podrían cambiarse, alterarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares. También se entiende que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Aunque cada uno de los elementos de la presente invención se describe en este documento conteniendo múltiples realizaciones, debe entenderse que, salvo que se indique otra cosa, cada una de las realizaciones de un elemento dado de la presente invención tiene capacidad para usarse con cada una de las realizaciones de los otros elementos de la presente invención y cada uno de dichos usos pretende formar una realización distinta de la presente invención.

Cualquier conflicto entre cualquier referencia citada en este documento y los contenidos específicos de esta memoria descriptiva se resolverán en favor de los últimos. Asimismo, cualquier conflicto entre una definición comprendida en la técnica de una palabra o expresión y una definición de la palabra o expresión mostrada específicamente en esta memoria descriptiva se resolverá en favor de la última.

Como puede apreciarse a partir de la descripción anterior, la presente invención tiene una amplia diversidad de aplicaciones.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que son solamente ilustrativos y no pretenden limitar la definición y alcance de la invención de ningún modo.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Epítomos eliminados en las presentes moléculas de PE: PE-LR-8M**Tabla 1**

| Epítomo eliminado | Mutaciones                             |
|-------------------|----------------------------------------|
| 1                 | LR ( $\Delta 251-273/\Delta 285-394$ ) |
| 2                 | LR, R467A                              |
| 3                 | LR                                     |
| 4                 | R432G, D406A                           |
| 5                 | R490A                                  |
| 6                 | E548A, R513A                           |
| 7                 | K590S, Q592A                           |

\*Los epítomos se describen, por ejemplo, en Onda, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2008 105(32):11311-6 y en el documento WO 2007/016150.

Ejemplo 2: Actividad citotóxica de HA22-LR-8M sobre células

HA22-LR-8M tiene citotoxicidad contra células Raji y CA46 que es comparable a HA22 y HA22-LR-6X. Se incubaron las células con diversas inmunotoxinas (por ejemplo, HA22, HA22-LR, HA22-LR-6X, HA22-LR-8M) durante 2 ó 3 días y se evaluó la viabilidad celular por un ensayo WST (es decir, se midió la proliferación celular usando la sal de tetrazolio WST-1 (los reactivos y kits están disponibles en Roche Applied Sciences)). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2**

| Inmunotoxina | CI <sub>50</sub> (ng/ml) | Línea celular |
|--------------|--------------------------|---------------|
| HA22         | 0,3                      | RAJI          |
| LR-8M        | 0,5                      | RAJI          |
| HA22         | 0,13                     | RAJI          |
| HA22-LR      | 0,4                      | RAJI          |
| HA22-LR-6X   | 0,3                      | RAJI          |
| HA22-LR-8M   | 0,2                      | RAJI          |
| HA22         | 0,33                     | CA46          |
| HA22-LR      | 0,3                      | CA46          |
| HA22-LR-6X   | 0,4                      | CA46          |
| HA22-LR-8M   | 0,33                     | CA46          |

HA22 - forma no mutada de PE38 HA22 LR - ( $\Delta 251-273/\Delta 285-394$ )  
 HA22 LR 6X - ( $\Delta 251-273/\Delta 285-394/R432G, R467A, R490A, R513A, E548S, K590S$ )  
 HA22 LR 8X - ( $\Delta 251-273/\Delta 285-394/D406A, R432G, R467A, R490A, R513A, E548S, K590S, Q592A$ )

Se ensayó la actividad de eliminación celular de HA22-LR-8M contra células de leucemia linfática crónica (CLL) de pacientes CLL. Se incubaron las células de pacientes con CLL con HA22 (que tiene una forma no mutada de PE38), HA22-LR o HA22-LR-8M y se determinó la concentración que reducía la viabilidad celular en un 50 % (CI<sub>50</sub>). La CI<sub>50</sub> para HA22-LR-8M es comparable a HA22-LR, y estaba enormemente mejorada sobre HA22. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 3: Actividad antitumoral e inmunogenicidad disminuida de HA22-LR-8M

Se ensayó la actividad antitumoral de HA22-LR-8M contra tumores CA46 en ratones SCID. Se trataron ratones con tumores CA46 por vía intravenosa (i.v.) con 3 inyecciones de HA22 o HA22-LR-8M y se midió el tamaño de los tumores durante 23 días. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Se ensayó la inmunogenicidad de HA22-LR-8M en comparación con LMB-9 en ratones que recibieron administraciones intravenosas de las inmunotoxinas de acuerdo con técnicas convencionales. Se inyectó a los ratones inmunotoxina LMB9 que tiene una forma no mutada de PE38 o HA22-LR-8M 4 veces a intervalos de 7 días por vía intravenosa. Seis (6) días después de cada inyección se obtuvo sangre de los animales y se midió su reactividad con LMB9 o HA22-LR-8M por ELISA. Se recogieron muestras de sangre y se almacenaron a menos 80 grados hasta el ensayo. No se provocó respuesta inmunogénica incluso después de 4 administraciones intravenosas de HA22-LR-8M medida sobre 28 días (Figura 3).

Se ensayó la inmunogenicidad de HA22-LR-8M en comparación con HA22 en ratones que recibieron administraciones intravenosas (i.v.) de las inmunotoxinas de acuerdo con técnicas convencionales. Se inyectó a los ratones i.v. cada 2 semanas 5 µg de inmunotoxina y se exanguinaron 10 días después. Se analizó el suero para anticuerpos que reaccionaban con la inmunotoxina inyectada por ELISA. No se provocó respuesta inmunogénica

incluso después de 5 administraciones intravenosas de HA22-LR-8M medida sobre 66 días (Figura 4).

#### Ejemplo 4: Estudios adicionales de las actividades biológicas de HA22-LR-8M

5 Se ensayó la actividad citotóxica específica de HA22 y HA22-LR-8M sobre células CA46 como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Figura 5A, HA22 (círculo cerrado) y HA22-LR-8M (cuadrado cerrado).

10 Actividad anti-tumoral de HA22 y HA22-LR-8M sobre ratones SCID (Figura 5B). Se trataron grupos de ocho ratones SCID que albergaban tumores CA46 en días alternos tres veces, como se indica por las flechas, con PBS/MSA al 0,2 % (cuadrado negro), o con tres dosis de HA22-LR-8M a 0,4 mg/kg (triángulo), 2,5 mg/kg (círculo), o 5,0 mg/kg (cuadrado gris). El tamaño del tumor se midió en días alternos y se calculó usando la fórmula  $(0,4 \times a \times b^2)$ . Los datos se expresan como la media + DT. Hubo diferencias significativas de la activación anti-tumoral en el día 24 y 27 ( $p < 0,05$ ).

15 Se compararon las respuestas inmunológicas contra HA22, HA22-8X, y HA22-LR-8M. La generación de los anticuerpos IgG contra las inmunotoxinas en ratones se ilustra en la Figura 6A. Grupos de ratones Balb/c ( $n=9$ ) recibieron HA22 (250 ug/kg, círculo), HA22-8X (250 ug/kg, cuadrado), o HA22-LR-8M (500 ug/kg, triángulo) i.v. cada 14 días (flechas) y se exanguinaron 10 días después de cada inyección. Se midieron los niveles de anticuerpos sobre inmunotoxinas respectivas usando ICC-ELISA de acuerdo con técnicas convencionales.

20 También se ensayaron las respuestas de IgM inducidas por las inmunotoxinas en ratones (Figura 6B). Se inyectó a ratones Balb/c (10 por grupo) por vía intravenosa cada 14 días HA22 (250 ug/kg, círculos), HA22-LR-8M (500 ug/kg, cuadrados) en PBS/MSA al 0,2 %, o PBS/MSA al 0,2 % solamente (triángulos) como control. Se exanguinó a los ratones 10 días después de cada inyección y se ensayaron los sueros diluidos 50 veces para IgM contra inmunotoxinas respectivas con ICC-ELISA. La titulación del suero inmunizado se muestra en la Figura 6C. El día 38 también se diluyeron en serie los sueros de ratones inmunizados con HA22 (círculos) y se compararon con los sueros de control inmunizados con PBS/MSA al 0,2 % (triángulos) solamente para IgM contra HA22. Los niveles de IgM se midieron usando ICC-ELISA con cada inmunotoxina.

30 Se ensayó la cantidad de anticuerpos contra cada molécula mutante en sueros de ratones inmunizados con HA22 (Figura 6D). 10 ratones Balb/c recibieron HA22 (250 ug/kg) i.v. cada 14 días (total 4 inyecciones) y se exanguinaron 10 días después de la 4ª inyección. Se midieron los niveles de anticuerpos contra HA22 usando ICC-ELISA con HA22. También se midió la reactividad cruzada de los sueros tratados con HA contra inmunotoxinas mutantes usando ICC-ELISA con las inmunotoxinas respectivas.

35 Se estudiaron las respuestas inmunes secundarias contra inmunotoxinas HA22 o HA22-LR-8M (Figura 6E). 4 semanas después de la inmunización primaria con HA22 (5 ug, 2 veces de inmunización con intervalo de 2 semanas), los ratones se volvieron a inmunizar con HA22 (cuadrados) o HA22-LR-8M (círculos). Se muestran los niveles específicos de IgG para cada inmunotoxina.

40 Respuesta inmune de células B que producen Ab preexistentes contra inmunotoxina HA22 o HA22-LR-8M (Figura 6F). En 15 semanas después de 3 ó 4 inmunizaciones i.v. con HA22 (5 ug/ratón), se seleccionaron 8 ratones que tenían bajo título (aproximadamente 103) de IgG específica anti-HA22, para estudio adicional de re-inmunización. Los ratones se volvieron a inmunizar con HA22 (cuadrados) o HA22-LR-8M (círculos). Se muestra cada título de IgG específica de inmunotoxina. Se expresó la cantidad de Ab respecto al mAb contra PE38 (IP30). Los datos se expresan como la media + DT. HA, HA22; LR, HA22-LR; LR8M, HA22-LR-8M; ns, no significativo; \*,  $p < 0,05$ .

50 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en este documento son con fines ilustrativos solamente y que los especialistas en la técnica sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos.

#### **Listado informal de secuencias**

##### **SEC ID Nº1 exotoxina A de Pseudomonas (PE) nativa**

55

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Glu | Glu | Ala | Phe | Asp | Leu | Trp | Asn | Glu | Cys | Ala | Lys | Ala | Cys | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Asp | Leu | Lys | Asp | Gly | Val | Arg | Ser | Ser | Arg | Met | Ser | Val | Asp | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ala | Ile | Ala | Asp | Thr | Asn | Gly | Gln | Gly | Val | Leu | His | Tyr | Ser | Met | Val |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Leu | Glu | Gly | Gly | Asn | Asp | Ala | Leu | Lys | Leu | Ala | Ile | Asp | Asn | Ala | Leu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser | Ile | Thr | Ser | Asp | Gly | Leu | Thr | Ile | Arg | Leu | Glu | Gly | Gly | Val | Glu |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Pro | Asn | Lys | Pro | Val | Arg | Tyr | Ser | Tyr | Thr | Arg | Gln | Ala | Arg | Gly | Ser |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Trp | Ser | Leu | Asn | Trp | Leu | Val | Pro | Ile | Gly | His | Glu | Lys | Pro | Ser | Asn |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ile | Lys | Val | Phe | Ile | His | Glu | Leu | Asn | Ala | Gly | Asn | Gln | Leu | Ser | His |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Met | Ser | Pro | Ile | Tyr | Thr | Ile | Glu | Met | Gly | Asp | Glu | Leu | Leu | Ala | Lys |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Leu | Ala | Arg | Asp | Ala | Thr | Phe | Phe | Val | Arg | Ala | His | Glu | Ser | Asn | Glu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Met | Gln | Pro | Thr | Leu | Ala | Ile | Ser | His | Ala | Gly | Val | Ser | Val | Val | Met |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ala | Gln | Thr | Gln | Pro | Arg | Arg | Glu | Lys | Arg | Trp | Ser | Glu | Trp | Ala | Ser |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gly | Lys | Val | Leu | Cys | Leu | Leu | Asp | Pro | Leu | Asp | Gly | Val | Tyr | Asn | Tyr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Leu | Ala | Gln | Gln | Arg | Cys | Asn | Leu | Asp | Asp | Thr | Trp | Glu | Gly | Lys | Ile |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Tyr | Arg | Val | Leu | Ala | Gly | Asn | Pro | Ala | Lys | His | Asp | Leu | Asp | Ile | Lys |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Pro | Thr | Val | Ile | Ser | His | Arg | Leu | His | Phe | Pro | Glu | Gly | Gly | Ser | Leu |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ala | Ala | Leu | Thr | Ala | His | Gln | Ala | Cys | His | Leu | Pro | Leu | Glu | Thr | Phe |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Thr | Arg | His | Arg | Gln | Pro | Arg | Gly | Trp | Glu | Gln | Leu | Glu | Gln | Cys | Gly |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Pro | Val | Gln | Arg | Leu | Val | Ala | Leu | Tyr | Leu | Ala | Ala | Arg | Leu | Ser | 290 | 295 | 300 |     |
| Trp | Asn | Gln | Val | Asp | Gln | Val | Ile | Arg | Asn | Ala | Leu | Ala | Ser | Pro | Gly | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Ser | Gly | Gly | Asp | Leu | Gly | Glu | Ala | Ile | Arg | Glu | Gln | Pro | Glu | Gln | Ala | 325 | 330 | 335 |     |
| Arg | Leu | Ala | Leu | Thr | Leu | Ala | Ala | Ala | Glu | Ser | Glu | Arg | Phe | Val | Arg | 340 | 345 | 350 |     |
| Gln | Gly | Thr | Gly | Asn | Asp | Glu | Ala | Gly | Ala | Ala | Asn | Ala | Asp | Val | Val | 355 | 360 | 365 |     |
| Ser | Leu | Thr | Cys | Pro | Val | Ala | Ala | Gly | Glu | Cys | Ala | Gly | Pro | Ala | Asp | 370 | 375 | 380 |     |
| Ser | Gly | Asp | Ala | Leu | Leu | Glu | Arg | Asn | Tyr | Pro | Thr | Gly | Ala | Glu | Phe | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Leu | Gly | Asp | Gly | Gly | Asp | Val | Ser | Phe | Ser | Thr | Arg | Gly | Thr | Gln | Asn | 405 | 410 | 415 |     |
| Trp | Thr | Val | Glu | Arg | Leu | Leu | Gln | Ala | His | Arg | Gln | Leu | Glu | Glu | Arg | 420 | 425 | 430 |     |
| Gly | Tyr | Val | Phe | Val | Gly | Tyr | His | Gly | Thr | Phe | Leu | Glu | Ala | Ala | Gln | 435 | 440 | 445 |     |
| Ser | Ile | Val | Phe | Gly | Gly | Val | Arg | Ala | Arg | Ser | Gln | Asp | Leu | Asp | Ala | 450 | 455 | 460 |     |
| Ile | Trp | Arg | Gly | Phe | Tyr | Ile | Ala | Gly | Asp | Pro | Ala | Leu | Ala | Tyr | Gly | 465 | 470 | 475 | 480 |
| Tyr | Ala | Gln | Asp | Gln | Glu | Pro | Asp | Ala | Arg | Gly | Arg | Ile | Arg | Asn | Gly | 485 | 490 | 495 |     |
| Ala | Leu | Leu | Arg | Val | Tyr | Val | Pro | Arg | Ser | Ser | Leu | Pro | Gly | Phe | Tyr | 500 | 505 | 510 |     |
| Arg | Thr | Ser | Leu | Thr | Leu | Ala | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Glu | Val | Glu | 515 | 520 | 525 |     |
| Arg | Leu | Ile | Gly | His | Pro | Leu | Pro | Leu | Arg | Leu | Asp | Ala | Ile | Thr | Gly | 530 | 535 | 540 |     |
| Pro | Glu | Glu | Glu | Gly | Gly | Arg | Leu | Glu | Thr | Ile | Leu | Gly | Trp | Pro | Leu | 545 | 550 | 555 | 560 |
| Ala | Glu | Arg | Thr | Val | Val | Ile | Pro | Ser | Ala | Ile | Pro | Thr | Asp | Pro | Arg | 565 | 570 | 575 |     |
| Asn | Val | Gly | Gly | Asp | Leu | Asp | Pro | Ser | Ser | Ile | Pro | Asp | Lys | Glu | Gln | 580 | 585 | 590 |     |
| Ala | Ile | Ser | Ala | Leu | Pro | Asp | Tyr | Ala | Ser | Gln | Pro | Gly | Lys | Pro | Pro | 595 | 600 | 605 |     |

Arg Glu Asp Leu Lys  
610

SEC ID Nº2 - PE con inmunogenicidad reducida

5 Xaa = Gly, Ala o Ser

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly  
Asp Gly Gly Xaa Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg  
Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Xaa Gly Tyr Val Phe Val  
Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly  
Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Xaa Gly Phe  
Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln  
Glu Pro Asp Ala Xaa Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val  
Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Xaa Thr Ser Leu Thr  
Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His  
Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Xaa Gly  
Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val  
Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp  
Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Xaa Glu Xaa Ala Ile Ser Ala Leu  
Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys

SEC ID Nº3 - PE-LR-8M

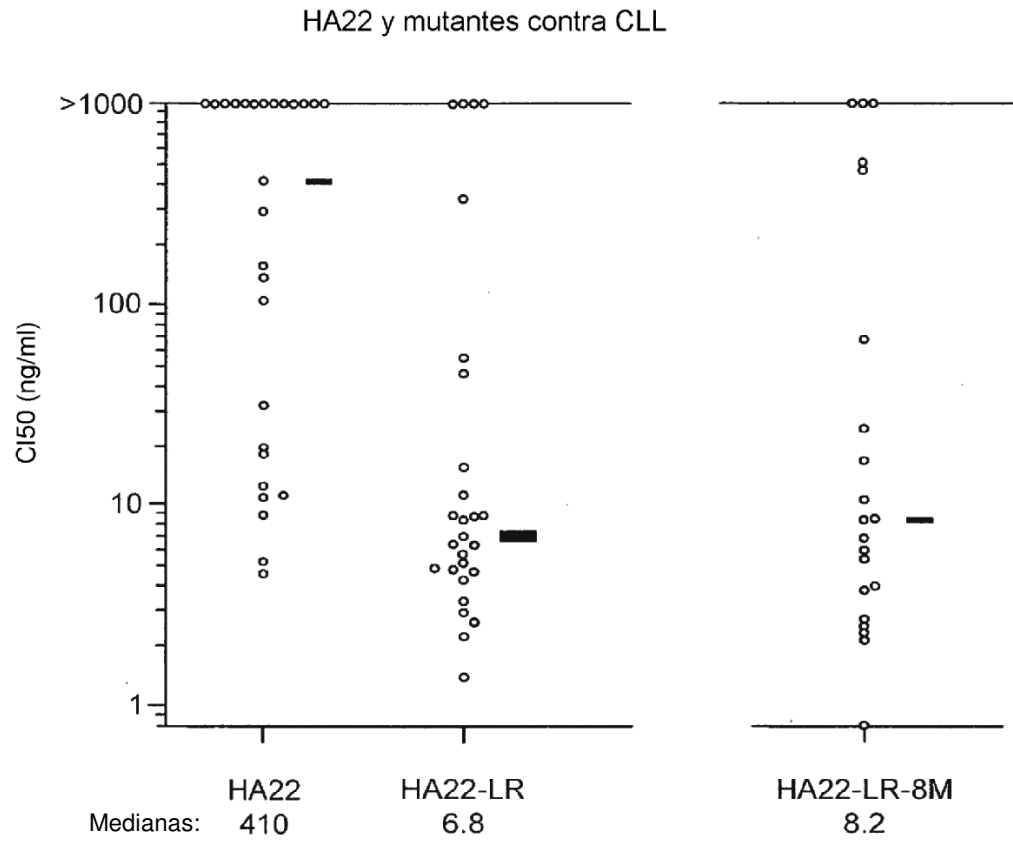
10 Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly  
Asp Gly Gly Ala Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg  
Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Gly Gly Tyr Val Phe Val  
Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly  
Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Ala Gly Phe  
Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln  
Glu Pro Asp Ala Ala Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val  
Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Ala Thr Ser Leu Thr  
Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His  
Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Ser Gly  
Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val  
Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp  
Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Ser Glu Ala Ala Ile Ser Ala Leu  
Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys

## REIVINDICACIONES

1. Una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") aislada, en donde dicha PE tiene los restos 1-273 y 285-394 eliminados y sustituciones de alanina, glicina o serina en lugar de los restos de aminoácidos D406 y Q592 correspondientes a un resto de aminoácido de la SEC ID N° 1.
2. La PE de la reivindicación 1, en donde dicha PE tiene adicionalmente una sustitución de alanina, glicina o serina de al menos un resto de aminoácido correspondiente a un resto de aminoácido de la SEC ID N° 1 seleccionado entre el grupo que consiste en R432, R467, R490, R513, E548, K590.
3. La PE de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde dicha PE tiene adicionalmente una sustitución de alanina, glicina o serina de al menos un resto de aminoácido correspondiente a un resto de aminoácido de la SEC ID N° 1 seleccionado entre el grupo que consiste en D403, R412, R427, E431, R458, D461, R505, E522, R538, R551, R576 y L597.
4. La PE de la reivindicación 1, en donde dicha PE tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.
5. La PE de la reivindicación 4, en donde dicha PE tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.
6. Una molécula quimérica que comprende (a) un resto de direccionamiento conjugado o fusionado con la exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La molécula quimérica de la reivindicación 6, en donde dicho resto de direccionamiento es un anticuerpo, citoquina, una linfoquina o un factor de crecimiento.
8. La molécula quimérica de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en un scFv, un dsFv, un Fab, un anticuerpo de un único dominio y un F(ab')<sub>2</sub>.
9. La molécula quimérica de la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo es contra un antígeno de superficie celular seleccionado entre el grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y.
10. La molécula quimérica de la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en B3, RFB4, SS1, MN, HN1, HN2 y HB21.
11. La molécula quimérica de la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo tiene una cadena ligera variable (VL) que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) y una cadena pesada variable (VH) que comprende tres CDR, en donde
  - (i) dicha CDR1 de VL tiene la secuencia QDIXXY, en la que XX se selecciona entre SN, HG, GR, RG y AR;
  - (ii) dicha CDR2 de VL tiene la secuencia YTS;
  - (iii) dicha CDR3 de VL tiene la secuencia QQGNTLPWT;
  - (iv) dicha CDR1 de VH tiene la secuencia GFAFSIYD;
  - (v) dicha CDR2 de VH tiene la secuencia ISSGGGTT;
  - (vi) dicha CDR3 de VH tiene la secuencia ARHSGYGXXXGVLFAY, en la que XXX se selecciona entre SSY, THW, YNW, TTW y STY.
12. La molécula quimérica de la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo tiene una cadena ligera variable (VL) que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) y una cadena pesada variable (VH) que comprende tres CDR, en donde
  - (i) dicha CDR1 de VL tiene la secuencia QDIHGY;
  - (ii) dicha CDR2 de VL tiene la secuencia YTS;
  - (iii) dicha CDR3 de VL tiene la secuencia QQGNTLPWT;
  - (iv) dicha CDR1 de VH tiene la secuencia GFAFSIYD;
  - (v) dicha CDR2 de VH tiene la secuencia ISSGGGTT;
  - (vi) dicha CDR3 de VH tiene la secuencia ARHSGYGTHWGVLFAY.
13. Una composición farmacéutica que comprende la molécula quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Un ácido nucleico aislado que codifica la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la molécula quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 para su uso en un método para inhibir el crecimiento indeseado o la proliferación de una célula que expresa uno o más marcadores de superficie celular en un sujeto.

16. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el sujeto tiene leucemia linfática crónica.

HA22-LR-8M tiene excelente actividad citotóxica sobre células de pacientes CLL



**FIG. 1**

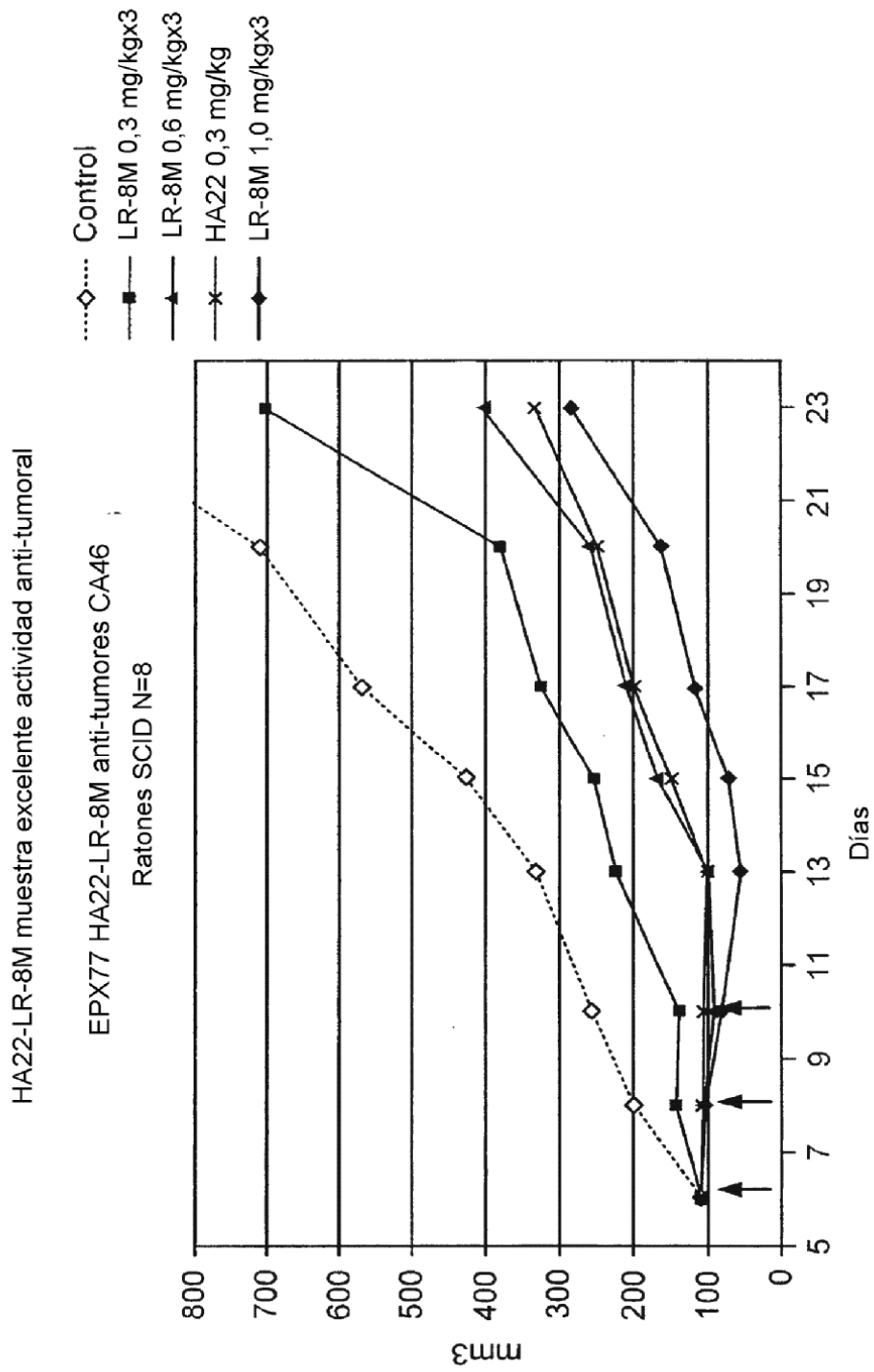
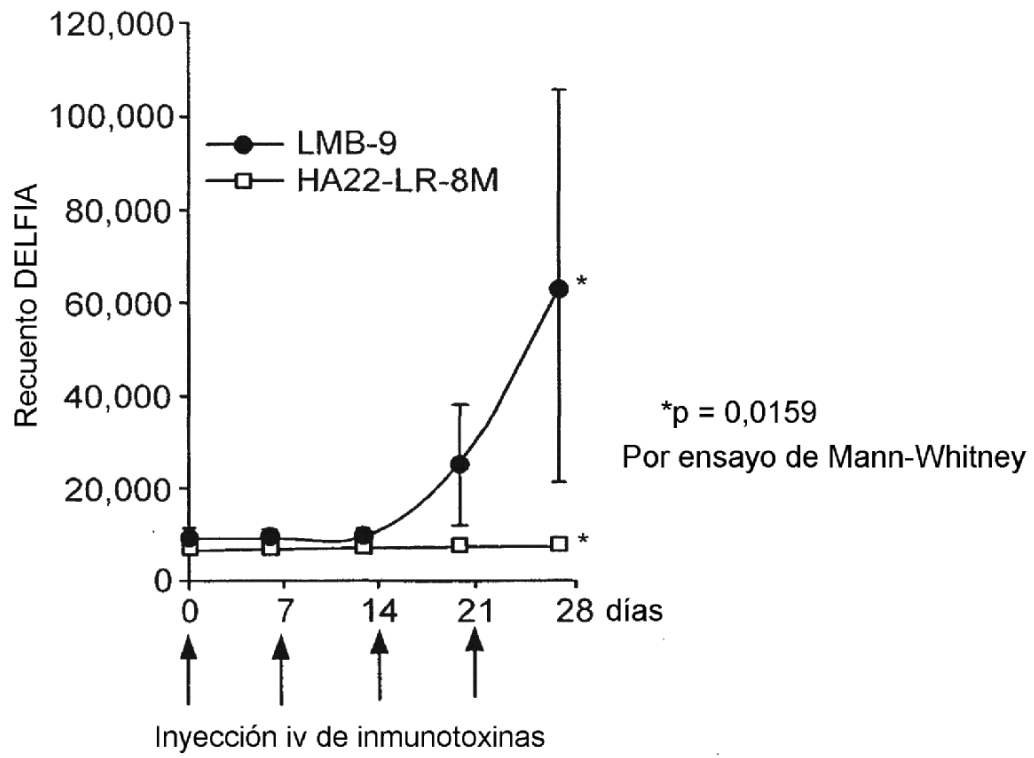


FIG. 2

Comparación de inmunogenicidad entre PE38 y  
nueva PE truncada, LR8M



**FIG. 3**

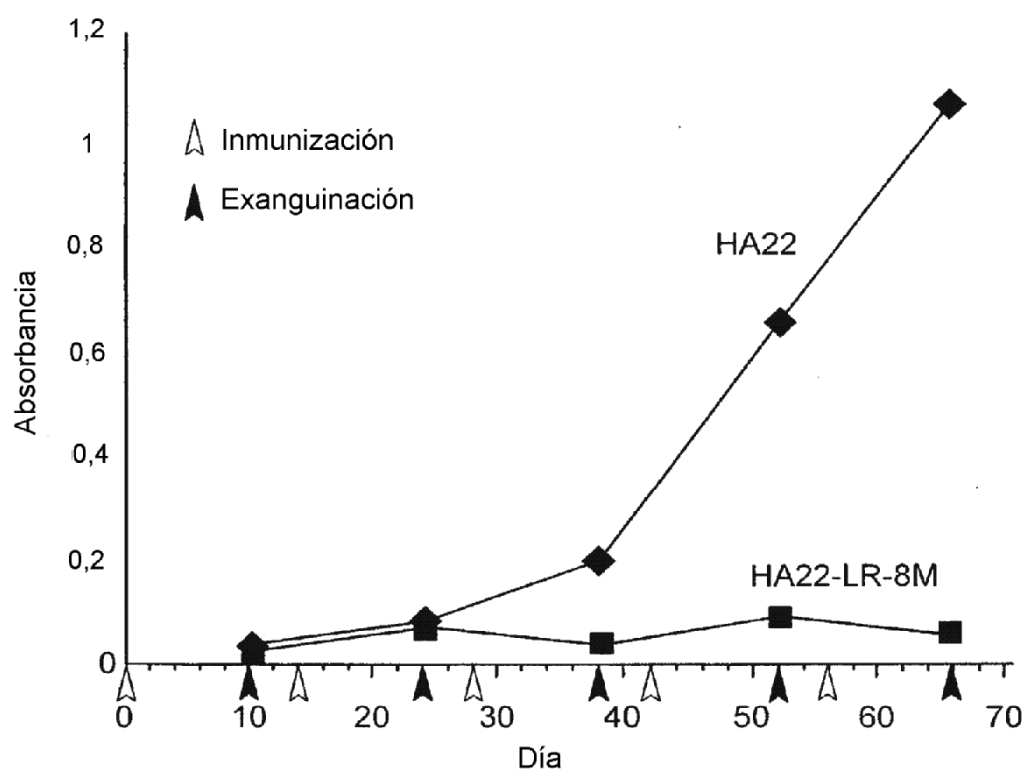
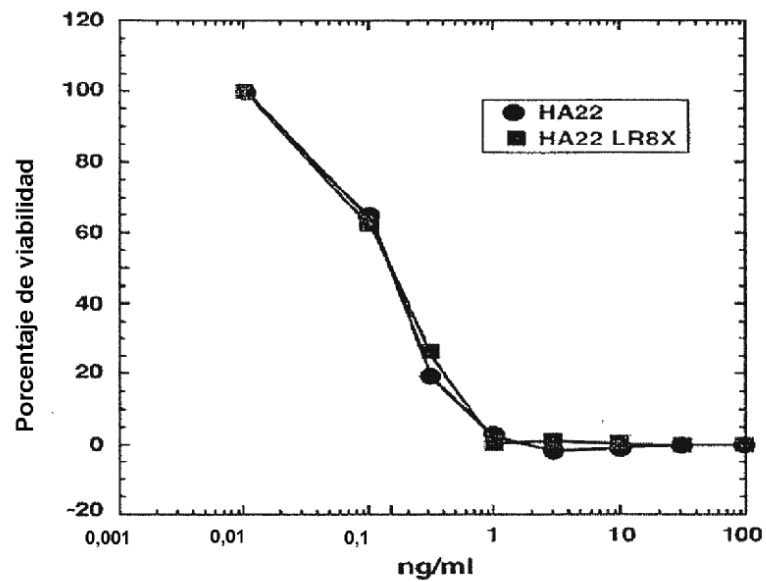
**FIG. 4**



Fig 5

A Actividad citotóxica de HA22 y HA22-LR-8M



B Estudio antitumoral de HA22-LR-8M

