

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 685**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/45** (2006.01)

**A61K 31/7076** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2009 PCT/US2009/054058**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010 WO10019954**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2009 E 09807420 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2331115**

54 Título: **Purina nucleósido fosforilasa como activador enzimático de profármacos de nucleósidos**

30 Prioridad:

**13.07.2009 US 225012 P**  
**15.08.2008 US 89235 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2017**

73 Titular/es:

**THE UAB RESEARCH FOUNDATION (50.0%)**  
**1530 3rd Avenue South, AB 770**  
**Birmingham, Alabama 35294-0111, US y**  
**SOUTHERN RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PARKER, WILLIAM, B. y**  
**SORSCHER, ERIC, J.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 609 685 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

Purina nucleósido fosforilasa como activador enzimático de profármacos de nucleósidos

## Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 61/089.235 presentada el 15 de agosto de 2008 y la solicitud provisional estadounidense con número de serie 61/225.012 presentada el 13 de julio de 2009.

## Referencia de subvención

La investigación llevada a cabo en relación con esta invención estuvo apoyada en parte por la subvención CA119170 de los National Institutes of Health.

## 10 Campo de la invención

La invención se refiere a purina nucleósido fosforilasas de *Trichomonas vaginalis* silvestres y mutantes con cola como activador enzimático para sustratos de profármaco y en particular a sustratos de profármaco tales como 9-( $\beta$ -D-arabinofuranosil)-2-fluoroadenina (F-araA, fludarabina) y 2-CI-2'-desoxiadenosina (CI-dAdo, cladribina).

## Antecedentes de la invención

15 Una estrategia de activación de profármacos para alterar selectivamente células tumorales implica la expresión de un gen que codifica para una enzima exógena en las células tumorales y la administración de un sustrato para esa enzima. La enzima actúa sobre el sustrato generando una sustancia tóxica para las células tumorales seleccionadas como diana. Esta técnica tiene ventajas sobre la expresión de genes directamente tóxicos, tales como ricina, toxina diftérica o exotoxina de *Pseudomonas*. Estas ventajas incluyen la capacidad de: 1) valorar la alteración celular; 2) optimizar el índice terapéutico ajustando o bien los niveles de profármaco o bien de expresión de enzima recombinate; y 3) interrumpir la toxicidad omitiendo la administración del profármaco. Además, esta técnica usa profármacos con diferentes efectos sobre diferentes tipos de células, permitiendo que se ajuste el tratamiento según un estado patológico específico.

25 Se han descrito enzimas útiles en un enfoque de activación de profármacos e incluyen enzimas tales como timidina cinasa, citosina desaminasa y purina nucleósido fosforilasa (PNP), tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.338.678; 5.552.311; 6.017.896 y 6.207.150. Sin embargo, la eficacia del tratamiento tumoral usando técnicas de activación de profármacos es limitada en casos en los que están presentes efectos secundarios de la administración del sustrato. Por ejemplo, el profármaco ganciclovir, usado a menudo en combinación con timidina cinasa, puede provocar efectos inmunosupresores no deseados.

30 La búsqueda de una purina nucleósido fosforilasa particular con actividad de escisión para el importante agente quimioterápico F-araA no ha tenido éxito anteriormente debido en parte al gran número de candidatos a PNP que era necesario investigar y las dificultades que rodeaban al aislamiento y la expresión de cada PNP. Muchos microorganismos generan PNP que pueden escindir nucleósidos que contienen adenina para dar adenina. Para ilustrar, hay al menos 17 microorganismos solos que se notifica que expresan PNP incluyendo: *Leishmania donovani*; *Trichomonas vaginalis*; *Trypanosoma cruzi*; *Schistosoma mansoni*; *Leishmania tropica*; *Crithidia fasciculata*; *Aspergillus* y *Penicillium*; *Erwinia carotovora*; *Helix pomatia*; *Ophiodon elongates* (bacalao largo); *E. coli*, *Salmonella typhimurium*; *Bacillus subtilis*; Clostridium; micoplasmas; *Trypanosoma gambiense*; y *Trypanosoma brucei*.

40 Por tanto, existe la necesidad de un método de activación de profármacos para tratar tumores que mejore la eficacia y supere el problema de los efectos secundarios.

## Sumario

Se proporciona un procedimiento para inhibir una célula cancerosa proporcionando una enzima purina nucleósido fosforilasa de *Trichomonas vaginalis* (Tv-PNP) silvestre en proximidad a la célula cancerosa y exponiendo la enzima a un sustrato escindido por la enzima para producir un análogo de purina citotóxico, siendo el sustrato fludarabina, cladribina, análogo de cordicepina, análogo de 2',3'-didesoxiadenosina, 5'-metil(talo)-6-metilpurina-ribosido, 5'-metil(talo)-2'-desoxi-6-metilpurina-ribósido, 5'-metil(alo)-6-metilpurina-ribósido, 2-F-5'-desoxiadenosina o 2-F- $\alpha$ -L-lixo-adenina. La enzima Tv-PNP se proporciona mediante expresión en la célula cancerosa, o una célula próxima a la misma, o es a través de la administración de la enzima próxima a la célula diana. Las enzimas purina nucleósido fosforilasa mutantes con cola (tm-PNP) derivadas de diversos organismos también se proporcionan como composiciones novedosas operativas en el presente documento para la inhibición de células cancerosas.

Se proporciona un kit comercial para inhibir una célula cancerosa de mamífero que incluye una enzima Tv-PNP, una enzima tm-PNP o un vector que contiene una secuencia de ADN que puede expresarse en la célula cancerosa y que codifica para una enzima Tv-PNP, enzima tm-PNP, o una combinación de las mismas; y un sustrato de fludarabina,

cladribina, análogo de cordicepina, análogo de 2',3'-didesoxiadenosina, 5'-metil(talo)-6-metil-purina-ribósido, 5'-metil(talo)-2'-desoxi-6-metilpurina-ribósido, 5'-metil(alo)-6-metilpurina-ribósido, 2-F-5'-desoxiadenosina, o 2-F- $\alpha$ -L-lixo-adenina, o una combinación de tales sustratos.

- 5 También se proporciona una composición de lisado de células diana, Tv-PNP/tm-PNP y un profármaco que cuando se escinde por una Tv-PNP/tm-PNP produce un análogo de purina de producto de escisión citotóxico. Esta composición es particularmente útil en la dirección de terapias posteriores.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa los parámetros cinéticos de F-araA con PNP y Tv-PNP de *E. coli*;

- 10 la figura 2 representa la eficacia de F-araAMP (un profármaco o F-araA) frente a xenoinjertos de tumor en ratones en los que sólo el 10% de las células expresan Tv-PNP;

la figura 3 es un mapa de sitios de restricción de un clon de vector de la invención indicado como pCR4blunt-TvPNP;

la figura 4 es un mapa de sitios de restricción de un vector de adenovirus de la invención que expresa Tv-PNP indicado como pACCMV-TvPNP y que incluye el clon de la figura 3;

- 15 la figura 5 es un mapa de sitios de restricción de un vector de lentivirus de la invención que expresa Tv-PNP con coexpresión de EGFP e indicado como pWPI(+)-TvPNP y que incluye el clon de la figura 3;

la figura 6 es un mapa de sitios de restricción de un vector de lentivirus de la invención que expresa Tv-PNP sin coexpresión de EGFP e indicado como pHR<sup>+</sup>CMV-TvPNP y que incluye el clon de la figura 3;

la figura 7 es una secuencia de nucleótidos de tm-PNP expresable en adenovirus que se mapea en relación con una *E. coli* silvestre; y

- 20 la figura 8 es una secuencia de aminoácidos de tm-PNP codificada por la secuencia de nucleótidos de la figura 7 que muestra la adición de la cola resultante.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 25 El sujeto de la presente invención es una purina nucleósido fosforilasa aislada de *T. vaginalis*. Las purina nucleósido fosforilasas y nucleósido hidrolasas están presentes en diversos organismos incluyendo de manera ilustrativa mamíferos tales como seres humanos, y microorganismos, tales como *Leishmania donovani*; *Trichomonas vaginalis*; *Trypanosoma cruzi*; *Schistosoma mansoni*; *Leishmania tropica*; *Crithidia fasciculata*; *Aspergillus* y *Penicillium*; *Erwinia carotovora*; *Helix pomatia*; *Ophiodon elongates*; *Salmonella typhimurium*; *Bacillus subtilis*; *Clostridium*; micoplasmas; *Trypanosoma gambiense*; *Trypanosoma brucei*; *Sulfolobus solfataricus*; y *E. coli*.

- 30 Una nucleósido fosforilasa cataliza la reacción: nucleósido de purina + PO<sub>4</sub> → ribosa-1-PO<sub>4</sub> (o desoxirribosa-1-fosfato) + base de purina. La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos que codifican para enzimas de escisión de purinas de *Trichomonas vaginalis* nativas y secuencias de tm-PNP que tienen una actividad biológica sorprendentemente superior en la escisión de sustratos específicos en comparación con enzimas PNP silvestres relacionadas estructuralmente de otros organismos y la secuencia silvestre de la que se deriva la enzima de mutación con cola, respectivamente.

- 35 El término "actividad biológica" tal como se usa en el presente documento pretende significar una medición de la cantidad de producto final producido por la reacción de una cantidad especificada de una enzima de escisión de purina en presencia de un sustrato en un periodo de tiempo medido mediante un método apropiado tal como se muestra en el ejemplo 2.

- 40 Un compuesto que es un sustrato para la enzima para producir un análogo de purina citotóxico que altera el metabolismo, la función o la replicación de una célula se denomina en el presente documento de manera intercambiable "profármaco" o "sustrato."

El término "infección viral patógena" tal como se usa en el presente documento pretende significar infección por un virus que provoca una enfermedad o efectos patológicos.

- 45 El término "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa el presente documento pretende significar un material que no es biológicamente o de otra forma no deseado, que puede administrarse a un individuo sin provocar efectos biológicos no deseados significativos o interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

- 50 Según la presente divulgación la escisión de un profármaco por Tv-PNP o tm-PNP produce un análogo de purina citotóxico que inhibe una células diana cancerosa (o infectada viralmente). Se aprecia que no es necesario que el análogo de purina citotóxico se genere dentro de la célula cancerosa y en su lugar existe un efecto inespecífico en el que el análogo de purina citotóxico generado dentro de una célula tumoral puede desplazarse a células tumorales

vecinas y producir su destrucción. La concentración de análogo de purina citotóxico necesaria para inhibir una célula diana cancerosa o infectada viralmente depende de factores que incluyen la identidad del análogo de purina citotóxico, la velocidad de intercambio de fluido intercelular, la velocidad de transporte por la membrana de análogo de purina citotóxico celular, y las velocidades de incorporación en el ADN o ARN, y su eficacia como inhibidor de la síntesis de proteína.

Tv-PNP o tm-PNP es operativa para inhibir células diana infectadas viralmente o cancerosas de mamífero *in vitro* o *in vivo* y en un sujeto humano o no humano. Tv-PNP o tm-PNP se suministra *in vivo* mediante cualquiera de los procedimientos detallados en la patente estadounidense n.º 6.958.318 B2 como sustituto para la PNP de *E. coli* descrita en la misma. Estos procedimientos de suministro incluyen de manera ilustrativa vectores virales recombinantes; vectores bacterianos de *Clostridium*, *Salmonella* y *E. coli*; liposomas conjugados con anticuerpos; reintroducción de células del sujeto modificadas genéticamente para expresar la enzima Tv-PNP o tm-PNP; lipofección; virus tales como retrovirus, adenovirus, virus del herpes, virus del sarampión, virus adenoasociados, o un vacuivirus; e inyección directa de la enzima Tv-PNP o tm-PNP en proximidad a la célula cancerosa de mamífero.

La presente divulgación proporciona un método de al menos inhibir, y normalmente destruir células de mamífero que se replican o que no se replican, transfectadas o transducidas y células inespecíficas a través de las siguientes etapas: (a) transfectar o transducir células de mamífero seleccionadas como diana con un ácido nucleico que codifica para una Tv-PNP o tm-PNP o proporcionar tal enzima directamente en proximidad a las células seleccionadas como diana; y (b) poner en contacto las células seleccionadas como diana que expresan o que están dotadas de la enzima de escisión Tv-PNP con un sustrato para la enzima para producir una base de purina tóxica en cantidades mayores que las producidas por PNP de *E. coli* con sustitución o silvestre y otras PNP destruyendo de ese modo las células seleccionadas como diana y también células inespecíficas que no expresan o no contienen la enzima de escisión. Por tanto, en presencia de sustrato, la enzima de escisión Tv-PNP o tm-PNP produce un producto tóxico. La operación de la invención puede producirse *in vitro* o *in vivo*, con células de mamífero humano o no humano u otras células.

Como se usa en el presente documento el término "inhibir" es una alteración de una actividad fisiológica normal. Específicamente, inhibir se define como lisar, reducir la proliferación, reducir el crecimiento, aumentar o disminuir la expresión o la velocidad de degradación de un gen, ARN, proteína, lípido u otro metabolito, inducir apoptosis u otros mecanismos de muerte celular, o aumentar, disminuir o alterar de otra forma la función de una proteína o ácido nucleico.

En un aspecto de la presente divulgación la enzima Tv-PNP o tm-PNP se proporciona dirigiendo la enzima a las células. Más preferiblemente, la enzima Tv-PNP o tm-PNP se dirige a las células conjugando la enzima a un anticuerpo.

La enzima puede estar codificada por un gen proporcionado a las células. Por ejemplo, el gen proporcionado a las células codifica para Tv-PNP o tm-PNP y esta operativamente unido a un promotor de gen de tirosinasa. Alternativamente, el gen se proporciona en una molécula portadora tal como películas poliméricas, geles, micropartículas y liposomas.

En otra divulgación la presente divulgación proporciona un método de al menos inhibir, y normalmente destruir mediante lisis células de mamífero seleccionadas como diana que se replican o que no se replican y células inespecíficas. El procedimiento incluye las etapas de: (a) suministrar la Tv-PNP o tm-PNP a las células de mamífero seleccionadas como diana; y (b) poner en contacto las células seleccionadas como diana con una cantidad eficaz de un sustrato de nucleósido para la Tv-PNP o tm-PNP, en el que el sustrato es relativamente no tóxico para células de mamífero y se escinde por Tv-PNP o tm-PNP para producir una base de purina que es tóxica para las células de mamífero seleccionadas como diana y células inespecíficas en proximidad a las mismas y en una cantidad mayor que la proporcionada por PNP de *E. coli* mutante por sustitución o silvestre. Los ejemplos representativos de sustratos de análogo de purina incluyen fludarabina, cladribina, análogo de cordicepina, análogo de 2',3'-didesoxiadenosina, 5'-metil(talo)-6-metilpurina-ribósido, 5'-metil(talo)-2'-desoxi-6-metilpurina-ribósido, 5'-metil(alo)-6-metilpurina-ribósido, 2-F-5'-desoxiadenosina o 2-F- $\alpha$ -L-lixo-adenina.

La presente divulgación también proporciona una composición para destruir células de mamífero seleccionadas como diana, que incluye: (a) una enzima Tv-PNP o tm-PNP que escinde un sustrato de nucleósido de purina; y (b) una cantidad del sustrato de purina eficaz para destruir las células seleccionadas como diana cuando se escinden por la enzima.

La presente divulgación también se refiere a un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica para una proteína Tv-PNP o tm-PNP en donde el vector puede replicarse en un huésped y que incluye en unión operativa: a) un origen de replicación; b) un promotor; y c) una secuencia de ADN que codifica para dicha proteína Tv-PNP o tm-PNP. Preferiblemente, el vector es un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector viral adenoasociado, un vector de herpes, un vacuivirus, un vector viral o un plásmido.

La presente divulgación también se refiere a una célula huésped transfectada con el vector de la presente invención de modo que el vector expresa una proteína Tv-PNP o tm-PNP. Preferiblemente, tales células huésped se

seleccionan del grupo que consiste en células bacterianas, células de mamífero y células de insecto.

Se aprecia en el método que una célula huésped se transfecta o transduce opcionalmente con un vector *ex vivo* o *in vitro* y posteriormente se administra a un paciente, preferiblemente en o cerca de un sitio tumoral o ubicación de infección viral. Opcionalmente, se suministra una célula de manera sistémica.

- 5 Algunos de los procedimientos y las composiciones ejemplificadas en el presente documento implican transfectar células con el gen de Tv-PNP o tm-PNP y posteriormente tratar con un profármaco de nucleósido de purina no tóxico comparativo que se convierte en un análogo de purina tóxico. Un profármaco particularmente preferido es F-araA, pero se aprecia que otros profármacos también son operativos en la presente invención.

- 10 Tv-PNP o tm-PNP difiere de PNP en su aceptación más eficaz de adenina y determinados análogos de nucleósidos que contienen guanina como sustratos y se muestra en el presente documento que es sorprendentemente eficaz en la escisión de sustratos particulares en comparación con PNP estructuralmente similares de diferentes orígenes bacterianos y parásitos. PNP expresada en células tumorales escinde el nucleósido, liberando un análogo de purina tóxico. Los análogos de purina difunden libremente a través de las membranas celulares en comparación con monofosfatos de nucleósido tales como los generados usando HSV Thd cinasa que generalmente permanecen dentro de la célula en la que se forman. Un análogo de adenina tóxico formado tras la conversión por Tv-PNP o tm-PNP puede convertirse mediante la adenina fosforibosil transferasa en nucleótidos tóxicos y destruir todas las células transfectadas, y difundir fuera de la célula y destruir las células circundantes que no se transfectaron (células inespecíficas).

- 20 La composición tiene utilidad como sistema biológicamente funcional que puede funcionar para producir destrucción tal como destrucción lítica de una célula infectada viralmente o cancerosa diana. De manera ilustrativa, la composición y el método de la invención usan la acción enzimática de Tv-PNP sobre un profármaco para producir un análogo de purina citotóxico que puede transitar por la membrana celular y provocar lisis celular. A modo de ejemplo, una composición de este tipo proporciona información como el número de copias de enzimas Tv-PNP o tm-PNP presentes por volumen unitario, mientras que la razón molar de profármaco: producto de escisión citotóxico a partir de la misma es indicativa de la cinética de la actividad. Estos resultados de ensayo se obtienen fácilmente mediante HPLC convencional u otros ensayos. Para células diana tumorales, estos resultados cuando se acoplan con barridos de masa tumoral diferenciados en el tiempo proporcionan datos inestimables en cuanto a la naturaleza de los tratamientos posteriores con Tv-PNP o tm-PNP, tratamiento quimioterápico, quirúrgico o de adjunto, o una combinación de los mismos.

### 30 Regulación transcripcional de la secuencia que codifica para PNP

- En un aspecto preferido, Tv-PNP o tm-PNP se codifica en un gen procariota de manera que la expresión de la Tv-PNP o tm-PNP en células de mamífero se logra mediante la presencia de una secuencia reguladora transcripcional eucariota unida a las secuencias que codifican para PNP. El gen de Tv-PNP o tm-PNP puede expresarse de manera ilustrativa bajo el control de elementos promotores/potenciadores constitutivos fuertes que se obtienen dentro de plásmidos comerciales (por ejemplo, el promotor/potenciador temprano de SV40 (pSVK30 Pharmacia, Piscataway, NJ), repetición terminal larga del virus del sarcoma murino de Moloney (pBPV, Pharmacia), repetición terminal larga del virus de tumor mamario de ratón (pMSG, Pharmacia), y el promotor/potenciador temprano de citomegalovirus (pCMV $\beta$ , Clontech, Palo Alto, CA).

- 40 También pueden seleccionarse como diana poblaciones de células para su inhibición o destrucción usando secuencias reguladoras de la transcripción genéticas que restringen la expresión de la secuencia que codifica para Tv-PNP o tm-PNP a determinados tipos de células, una estrategia que se denomina selección como diana de la transcripción. Una secuencia reguladora candidata para la selección como diana de la transcripción satisface preferiblemente dos criterios importantes tal como se establece mediante experimentación: (i) la secuencia reguladora dirige una expresión génica suficiente para dar como resultado la producción de enzima en cantidades terapéuticas en células seleccionadas como diana, y (ii) la secuencia reguladora no dirige la producción de cantidades suficientes de enzima en células no seleccionadas como diana para alterar el enfoque terapéutico. En esta forma de selección como diana las secuencias reguladoras están unidas funcionalmente con las secuencias de Tv-PNP para producir un gen que se activa sólo en las células que expresan el gen a partir del que se derivaron las secuencias reguladoras. Las secuencias reguladoras que se ha mostrado que cumplen los criterios para la selección como diana de la transcripción en terapia génica incluyen secuencias reguladoras de los genes de inhibidor de leucoproteasa secretora, proteína tensioactiva A y  $\alpha$ -fetoproteína. Una variación de esta estrategia es utilizar secuencias reguladoras que confieren "capacidad de inducción" de modo que la administración local del inductor conduce a expresión génica local. Como ejemplo de esta estrategia, se han descrito secuencias inducidas por radiación y se han propugnado para aplicaciones de terapia génica (Weichselbaum, *et al.*, Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 24:565-567 (1992)) y son operativas en el presente documento.

Potenciadores/promotores específicos de tejido son operativos en la dirección de la expresión de Tv-PNP o tm-PNP, y de ese modo la toxicidad mediada por Tv-PNP o tm-PNP, a tejidos específicos. Por ejemplo, secuencias reguladoras genéticas de tirosinasa humana son suficientes para dirigir la toxicidad de Tv-PNP o tm-PNP a células de melanoma maligno. Secuencias de tirosinasa de ratón a partir de la región flanqueante en 5 prima (-769 pb desde

el sitio de inicio de la transcripción) del gen pueden dirigir la expresión del gen indicador a células de melanoma maligno. Aunque las secuencias de tirosinasa humana y de ratón en la región flanqueante en 5' son similares, Shibata *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 267:20584-20588 (1992) mostraron que las secuencias flanqueantes en 5' humanas en la misma región usada por Vile y Hart (-616 pb desde el sitio de inicio de la transcripción) no conferían expresión específica de tejido. Aunque Shibata *et al.* sugirieron que la región flanqueante en 5' no sería útil para dirigir la expresión génica a células que expresan tirosinasa (melanomas o melanocitos), un fragmento en el sentido de 5' ligeramente diferente al usado por Shibata *et al.* puede dirigir de hecho la expresión génica de PNP de *E. coli* o indicador específicamente a células de melanoma, tal como se muestra en la patente estadounidense n.º 6.017.896, figura 3 y funciona asimismo con Tv-PNP o tm-PNP.

Por tanto, secuencias de tirosinasa humana son útiles para dirigir la expresión de Tv-PNP o tm-PNP a células de melanoma humanas. Estas mismas secuencias son útiles para dirigir otra expresión génica terapéutica en células de melanoma o melanocitos. Pueden usarse otros elementos o secuencias reguladoras genéticas específicas de tejido para dirigir la expresión de un gen que codifica para una enzima de escisión de nucleósido de análogo de purina adecuada a tipos de células específicos distintos de melanomas.

#### 15 Suministro del gen de Tv-PNP o tm-PNP

Se proporcionan la construcción de virus recombinantes adecuados y el uso de adenovirus para la transferencia de Tv-PNP o tm-PNP dentro de células de mamífero. También puede usarse suministro génico no viral. Los ejemplos incluyen difusión de ADN en ausencia de cualquier portador o estabilizador ("ADN desnudo"), ADN en presencia de portadores o estabilizadores farmacológicos ("ADN formulado"), ADN complejo con proteínas que facilitan la entrada en la célula ("conjugados moleculares"), o ADN complejo con lípidos. El uso de suministro mediado por lípidos del gen de PNP bacteriano a células de mamífero se ejemplifica en el presente documento. Más particularmente, se demuestra la transferencia mediada por liposomas catiónicos de un plásmido que contiene un gen de PNP no humano. Otros métodos de transferencia génica son también generalmente aplicables debido a que el método particular para transferir el gen de Tv-PNP a una célula no es el único determinante del éxito de la inhibición de células diana. Por tanto, también puede usarse transducción génica utilizando un vector de transferencia derivado de virus, descrito adicionalmente a continuación. Tales métodos se conocen bien y pueden adaptarse fácilmente para su uso en las terapias de toxinas mediadas por genes descritas en el presente documento.

El método de suministro del gen de Tv-PNP o tm-PNP depende de su forma, y un método adecuado resultará evidente para un experto en la técnica. Tales métodos incluyen de manera ilustrativa administración mediante inyección, transformación biolística y lipofección. El uso de suministro mediado por lípidos del gen de PNP a células de mamífero se ejemplifica en el presente documento. Más particularmente, se demuestra la transferencia mediada por liposomas catiónicos de un plásmido que contiene un gen de PNP no humano. Sin embargo, también podrán aplicarse otros métodos de transferencia génica debido a que el método particular para transferir el gen de PNP a una célula no es el único determinante del éxito de la alteración de células tumorales. Por tanto, también puede usarse transducción génica, utilizando un vector de transferencia derivados de virus, descrito adicionalmente a continuación. Tales métodos se conocen bien y pueden adaptarse fácilmente para su uso en las terapias de toxinas mediadas por genes descritas en el presente documento. Además, estos métodos pueden usarse para seleccionar como diana determinadas enfermedades y poblaciones de células usando las características de direccionamiento de un portador particular del gen que codifica para una enzima de escisión de nucleósido de análogo de purina adecuada tal como Tv-PNP o tm-PNP.

Se han usado bacterias anaerobias apatógenas para suministrar selectivamente genes foráneos al interior de células tumorales. Por ejemplo, esporas de *Clostridium acetobutylicum* inyectadas por vía intravenosa en ratones que llevan tumores germinaron sólo en las zonas necróticas de tumores que tenían una baja tensión de oxígeno. Usando el ensayo para la actividad de PNP descrito a continuación, se encontró que *Clostridium perfringens* presentaba una actividad enzimática que podía convertir MeP-dR en MeP. Este hallazgo sugiere un mecanismo para expresar selectivamente la actividad de PNP en masas tumorales con centros necróticos, anaerobios. Por tanto, pueden infectarse tumores con cepas de *Clostridium* que expresan Tv-PNP o tm-PNP y luego exponerse a un sustrato apropiado, tal como fludarabina. La actividad de PNP de las bacterias *Clostridium* que crecen en el centro anaerobio del tejido tumoral convierte entonces el sustrato en un análogo de purina tóxico, que entonces se libera localmente alterando las células tumorales. Adicionalmente, pueden usarse opcionalmente otras bacterias incluyendo *E. coli* y *Salmonella* para suministrar un gen de Tv-PNP o tm-PNP al interior de tumores.

Otros sistemas de suministro que pueden funcionar en la presente divulgación incluyen de manera ilustrativa vehículos tales como liposomas "furtivos" y otros liposomas conjugados con anticuerpos (incluyendo direccionamiento de fármacos mediado por lípidos a carcinoma colónico), direccionamiento mediado por receptor de ADN a través de ligandos específicos de células, direccionamiento tumoral dirigido por linfocitos y direccionamiento retroviral terapéutico altamente específico de células de glioma murino *in vivo*. (S.K. Huang *et al.*, Cancer Research, 52:6774-6781 (1992); R.J. Debs *et al.*, Am. Rev. Respir. Dis., 135:731-737 (1987); K. Maruyama *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:5744-5748 (1990); P. Pinnaduwaage y L. Huang, Biochemistry, 31:2850-2855 (1992); A. Gabizon y Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6949-6953 (1988); S. Rosenberg *et al.*, New England J. Med., 323:570-578 (1990); K. Culver *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3155-3159 (1991); G.Y. Wu y C.H. Wu, J. Biol.

Chem., 263, No. 29:14621-14624 (1988); Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3410-3414 (1990); Curiel *et al.*, Human Gene Ther., 3:147-154 (1992); Litzinger, Biochimica et Biophysica Acta, 1104:179-187 (1992); Trubetskoy *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta, 1131:311-313 (1992)). El presente enfoque, dentro de contexto de un mecanismo de direccionamiento génico o bien dirigido a células tumorales en división o bien a la neovascularización tumoral, ofrece una tecnología mejorada mediante la cual puede establecerse un pequeño subconjunto de células tumorales dentro de una masa tumoral en crecimiento, lo que mediaría en la necrosis e involución tumoral rápida tras la señal apropiada, tal como tras la administración del profármaco de sustrato para una enzima de escisión de nucleósido de análogo de purina de *T. vaginalis* o tm-PNP presente en, o próxima a, las células diana.

#### 10 Métodos de tratamiento

El método de tratamiento incluye de manera ilustrativa transfectar o administrar de otra forma un gen de Tv-PNP o tm-PNP de la invención a células junto con la exposición de las células con el gen de Tv-PNP o tm-PNP o proteína a un sustrato apropiado. El sustrato se convierte en un análogo de purina tóxico que inhibe o destruye las células que expresan el gen de Tv-PNP o tm-PNP así como las células inespecíficas en las proximidades de las células que expresan el gen de Tv-PNP o tm-PNP, dependiendo de la concentración de análogo de purina citotóxico. El gen de Tv-PNP o tm-PNP se administra de manera ilustrativa directamente a las células seleccionadas como diana o de manera sistémica en combinación con una composición de direccionamiento, tal como a través de la selección de un vector viral o formulación de suministro particular. Las células se tratan preferiblemente *in vivo*, dentro del paciente que va a tratarse, o se tratan *in vitro*, luego se inyectan en el paciente. Tras la introducción del gen de Tv-PNP o tm-PNP en las células en el paciente, se administra el profármaco, de manera sistémica o local, en una cantidad eficaz para convertirse mediante la Tv-PNP o tm-PNP en un análogo de purina citotóxico en relación con células seleccionadas como diana. Se aprecia que el profármaco se suministra opcionalmente antes de, junto con, o posteriormente a la administración de la Tv-PNP o tm-PNP de la invención. Preferiblemente, el profármaco se administra posteriormente a la administración del Tv-PNP o tm-PNP.

25 Debido a las dificultades en la transfección de grandes números de células dianas o la administración de enzima Tv-PNP o tm-PNP, la cinética de escisión de esta enzima en relación con otras PNP proporciona resultados terapéuticos sorprendentemente beneficiosos con sustratos de importancia clínica tales como F-araA.

#### Tratamiento de tumores

El gen de Tv-PNP o tm-PNP se usa opcionalmente como parte de una estrategia para tratar tumores sólidos metastásicos, tales como melanoma, carcinoma pancreático, de hígado o colónico. En este método, se usa opcionalmente ADN de plásmido que contiene un gen de Tv-PNP o tm-PNP bajo el control de promotores específicos de tumor. Por ejemplo, el promotor de tirosinasa es altamente específico para mediar en la expresión en células de melanoma y no conduce a expresión génica en la mayoría de los tipos de tejido. El gen de Tv-PNP o tm-PNP bajo el control regulador de este promotor se activa predominantemente dentro de un tumor de melanoma y no en otra parte dentro de un paciente tal como se evidencia para PNP de *E. coli* en la patente estadounidense n.º 6.017.896. Se usan promotores específicos para otros tipos de tumores, por ejemplo, promotores activos en las células endoteliales que se dividen rápidamente presentes en todos los tumores sólidos para activar específicamente Tv-PNP o tm-PNP sólo dentro de un tumor primario o metastásico. En este procedimiento, se suministra ADN de plásmido que contiene Tv-PNP o tm-PNP bajo el control de un promotor específico de tumor a células usando liposomas catiónicos. Por ejemplo, basándose en estudios con animales, podrían usarse 100-400 mg de ADN de plásmido complejado 1200-3600 micromoles de una mezcla 1:1 de los lípidos DOTMA (bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-trimetilamonio) y DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) para suministrar el gen de Tv-PNP o tm-PNP a metástasis tumorales en pacientes. Entonces puede administrarse un profármaco en las cantidades descritas anteriormente. El tratamiento médico de tumores puede realizarse para beneficio financiero y terapéutico.

El gen de Tv-PNP se usa opcionalmente para activar profármacos para el tratamiento de cáncer de cerebro humano. En este procedimiento, se inyecta una línea celular que produce partículas retrovirales que contienen el gen de Tv-PNP o tm-PNP en un tumor del sistema nervioso central (SNC) dentro de un paciente. Puede hacerse funcionar un escáner de IRM para inyectar apropiadamente la línea celular productora de retrovirus dentro de la masa tumoral. Debido a que el retrovirus es completamente activo sólo dentro de células en división y la mayoría de las células en división dentro del cráneo de un paciente con cáncer están dentro del tumor, el retrovirus es principalmente activo en el propio tumor, en vez de en células no malignas dentro del cerebro. Las características clínicas del paciente incluyendo la localización y el tamaño tumoral determinan la cantidad de células productoras que han de inyectarse. Por ejemplo, se proporciona un volumen de células productoras en el intervalo de 30 inyecciones de 100 microlitros cada una (volumen total de 3 ml con aproximadamente  $1 \times 10^8$  células productoras/ml inyectados) bajo orientación estereotáctica para tumores inaccesibles quirúrgicamente. Para tumores a los que puede realizarse una aproximación intraoperatoria, se inyectan alícuotas de 100  $\mu$ l (a aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/ml) con volúmenes inyectados totales de hasta 10 ml usando transferencia génica de Tv-PNP o tm-PNP, seguido por administración de F-araAMP (un profármaco de F-araA). Esta estrategia está diseñada para permitir tanto destrucción inespecífica como toxicidad en células que no se dividen y está diseñada para lograr una involución tumoral mucho mayor que los intentos anteriores usando HSV dThd cinasa y ganciclovir.

La destrucción de poblaciones seleccionadas de células se logra dirigiendo el suministro del gen de Tv-PNP o tm-PNP. Se aprovecha el tropismo natural o la fisiología de los vectores virales en la selección como diana de tipos de células específicos. Por ejemplo, los retrovirus demuestran una actividad aumentada en células en replicación. La transferencia génica mediada por retrovirus selectiva a células cancerosas en replicación que crecen dentro de un sitio en donde las células normales (no malignas) no están replicándose es un método de direccionamiento terapéuticamente poderoso en estudios clínicos tanto con animales como con seres humanos. Alternativamente, el vector viral se administra directamente a un sitio específico tal como un tumor sólido concentrando de ese modo el gen en las células tumorales en contraposición a los tejidos circundantes. Este concepto de suministro selectivo se ha demostrado en el suministro de genes a tumores en ratones mediante vectores de adenovirus. Pueden desarrollarse conjugados moleculares de modo que el ligando que se une al receptor se una no sólo a tipos de células selectivos, tal como se ha demostrado para la selección como diana mediada por lectina de cáncer de pulmón.

El direccionamiento de un gen que codifica para una Tv-PNP o tm-PNP o la expresión del gen en una fracción pequeña de las células en una masa tumoral seguido administración del sustrato es adecuado para mediar en la involución de la reducción o estasis tumoral.

#### Tratamiento de células infectadas viralmente

Además de inhibir, y a menudo destruir las células tumorales, los procedimientos descritos en el presente documento también pueden usarse para destruir células infectadas viralmente. En una realización de destrucción de virus, el método de transferencia génica seleccionado se elige por su capacidad para dirigir la expresión de la enzima de escisión en células infectadas viralmente. Por ejemplo, las células infectadas viralmente utilizan secuencias génicas virales especiales para regular y permitir la expresión génica tales como promotores específicos de virus. Tales secuencias no están presentes en células no infectadas. El gen de Tv-PNP o tm-PNP se orienta apropiadamente con respecto a un promotor viral de este tipo para generar expresión selectiva de la enzima de escisión dentro de células infectadas viralmente. Las células infectadas viralmente son susceptibles de ese modo a la administración de F-araA u otros sustratos diseñados para convertirse en una forma tóxica.

#### Administración de células modificadas por ingeniería genética

También se proporciona una célula huésped transformada con un vector de la presente divulgación.

Para determinadas aplicaciones, se seleccionan células que reciben el gen de Tv-PNP o tm-PNP y se administran a un paciente. Este método implica lo más comúnmente la transferencia *ex vivo* del gen que codifica para la enzima de escisión Tv-PNP o tm-PNP. Las células que reciben los genes de la invención se administran al paciente huésped en donde producen la proteína terapéutica hasta que el profármaco, tal como F-araA, se administra para eliminar las células modificadas por ingeniería genética. Este método es útil en terapias celulares tales como las usadas mioblastos que no se replican modificados por ingeniería genética para la producción de tirosina hidroxilasa dentro del cerebro (Jiao *et al.*, Nature, 362:450 (1993)).

#### Suministro directo de la enzima PNP a células

Se administra opcionalmente proteína Tv-PNP o tm-PNP con o sin un profármaco directamente a células diana en vez del gen de Tv-PNP o tm-PNP. De manera ilustrativa, se fabrica una enzima Tv-PNP o tm-PNP que puede escindir nucleósidos de análogo de purina mediante técnicas de proteínas recombinantes disponibles usando un kit disponible comercialmente. Como ejemplo de un método para producir la proteína Tv-PNP bacteriana, se liga la secuencia que codifica para Tv-PNP en el sitio de clonación múltiple de pGEX-4T-1 (Pharmacia, Piscataway, NJ) para que esté "en marco" con la proteína de fusión glutatión-s-transferasa (GST) usando técnicas convencionales (obsérvese que el sitio de clonación de este vector permite la inserción de secuencias codificantes en los tres posibles marcos de lectura de traducción posibles para facilitar esta etapa). El plásmido resultante contiene la secuencia que codifica para la fusión GST-PNP bajo el control transcripcional del promotor *tac* procariota inducible con IPTG. Se transforman células de *T. vaginalis* con el plásmido recombinante y el promotor *tac* inducido con IPTG. Se lisan las células inducidas con IPTG, y se purifica la proteína de fusión GST-PNP mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de glutatión Sepharose 4B. Se eluye la proteína de fusión GST-PNP, y se elimina la parte de GST de la molécula mediante escisión con trombina. Todas estas técnicas y reactivos están disponibles comercialmente (Pharmacia, Piscataway, NJ). Otros métodos para la producción de proteínas recombinantes se describen en detalle en manuales de laboratorio publicados.

Puesto que la Tv-PNP o tm-PNP activa profármacos para dar toxinas difusibles, el suministro de la proteína PNP al exterior de las células diana antes de la administración del profármaco es operativo para inducir un efecto terapéutico. La proteína Tv-PNP o tm-PNP puede administrarse a células diana mediante una amplia variedad de técnicas. Un ejemplo es la aplicación directa de la proteína con o sin un portador a un tejido diana tal como inyectando directamente una masa tumoral dentro de un sitio accesible. Otro ejemplo es la unión de la proteína Tv-PNP o tm-PNP a un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno en el sitio tumoral. (Villa *et al.*, "A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature *in vivo*". Int. J. Cancer. 1 de junio de 2008; 122(11):2405-13. Nissim *et al.*, "Historical development of

monoclonal antibody therapeutics". Handbook of Exp. Pharmacol. 2008; (181):3-18.)

Se han descrito anteriormente métodos para unir proteínas funcionales a anticuerpos monoclonales. El anticuerpo monoclonal conjugado con Tv-PNP o tm-PNP se administra de manera sistémica, por ejemplo por vía intravenosa (i.v.), y se une específicamente al tejido diana. La administración sistémica posterior del profármaco dará como resultado la producción local de toxina difusible en las proximidades del sitio tumoral. Varios estudios demostraron el uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral. Otros ligandos, además de anticuerpos monoclonales, pueden seleccionarse por su especificidad por una célula diana y someterse a prueba según los métodos enseñados en el presente documento.

El suministro de proteínas a dianas específicas se logra opcionalmente usando liposomas. Se describen métodos para producir liposomas (por ejemplo, *Liposomes: A Practical Approach*). Los liposomas pueden dirigirse a sitios específicos mediante la inclusión de ligandos o anticuerpos específicos en su superficie exterior. Un ejemplo ilustrativo son poblaciones de células de hígado específicas seleccionadas como diana por la inclusión de asialofetina en la superficie liposómica (Van Berkel *et al.*, Targeted Diagnoses and Therapy, 5:225-249 (1991)). Formulaciones liposómicas específicas también pueden lograr un suministro dirigido tal como se ejemplifica de la mejor manera mediante los denominados liposomas furtivos que suministran preferentemente fármacos a tumores implantados (Allen, Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer, 405-415 (1989)). Tras haberse inyectado o implantado los liposomas, se aclara el liposoma no unido de la sangre, y se trata el paciente con el profármaco de análogo de purina, tal como F-araA, que se escinde por la Tv-PNP en el sitio seleccionado como diana. De nuevo, este procedimiento requiere sólo la disponibilidad de un vehículo de direccionamiento apropiado. En un sentido más amplio, la estrategia de direccionamiento puede extenderse al suministro específico del profármaco tras el suministro de o bien el gen o bien la proteína PNP.

Alternativamente, un compuesto es un fragmento de polipéptido biológicamente activo de proteína Tv-PNP que se administra a un sujeto. Un fragmento de péptido o péptido biológicamente activo es opcionalmente una forma mutante de Tv-PNP. Se aprecia que la mutación del aminoácido conservado en cualquier sitio particular se muta preferiblemente a glicina o alanina. Se aprecia además que la mutación a cualquier aminoácido cargado de manera neutra, cargado, hidrófobo, hidrófilo, sintético, no natural, no humano u otro puede funcionar de manera similar. Un mutante todavía más preferido implica una mutación del marco de lectura para eliminar el codón de terminación terminal TAA y en su lugar expresar una Tv-PNP mutante con cola (tmTv-PNP).

Se hacen opcionalmente modificaciones y cambios en la estructura (primaria, secundaria o terciaria) de la proteína Tv-PNP silvestre que están englobadas dentro del compuesto que pueden dar como resultado o no una molécula que tiene características similares a los polipéptidos a modo de ejemplo dados a conocer en el presente documento. Se aprecia que cambios en residuos de aminoácido conservados tienen un impacto lo más probablemente sobre la actividad de la proteína resultante. Sin embargo, se aprecia además que cambios en aminoácidos que pueden funcionar para la interacción con ligandos, resistencia o promoción de la degradación de la proteína, tráfico intracelular o extracelular, secreción, interacción proteína-proteína, modificación postraducciona tal como glicosilación, fosforilación, sulfatación, y similares, pueden dar como resultado actividad aumentada o disminuida de un compuesto de la invención al tiempo que se retiene parte de la capacidad para alterar o mantener una actividad fisiológica. Se sabe que se producen determinadas sustituciones de aminoácidos para otros aminoácidos en una secuencia sin pérdida de actividad apreciable.

Al hacer tales cambios, se considera el índice terapéutico de los aminoácidos. Según la presente divulgación pueden sustituirse determinados aminoácidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático similar y todavía dan como resultado un polipéptido con actividad biológica similar. A cada aminoácido se le asigna un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y características de carga. Esos índices son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Sin pretender limitarse a una teoría particular, se cree que el carácter hidropático relativo del aminoácido determina la estructura secundaria del polipéptido resultante, lo que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas. Se sabe en la técnica que un aminoácido puede sustituirse por otro aminoácido que tiene un índice hidropático similar y todavía obtener un polipéptido funcionalmente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , se prefieren particularmente los que están dentro de  $\pm 1$ , y se prefieren incluso más los que están dentro de  $\pm 0,5$ .

Tal como se explicó de manera resumida anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Los expertos en la técnica conocen bien sustituciones a modo de ejemplo que pueden tener en consideración diversas de las características anteriores e incluyen(residuo original: sustitución a modo de ejemplo): (Ala: Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gln, His), (Asp: Glu, Cys, Ser), (Gln: Asn), (Glu: Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gln), (Ile: Leu, Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met: Leu, Tyr), (Ser: Thr), (Thr: Ser), (Tyr: Trp, Phe) y (Val: Ile, Leu). Aspectos de esta divulgación contemplan por tanto equivalentes funcionales o biológicos equivalentes de un polipéptido tal como se expuso anteriormente. En particular, las realizaciones de los polipéptidos

pueden incluir variantes que tienen una identidad de secuencia de aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% y el 95% con el polipéptido de interés.

Se aprecia además que cualquier sustitución de ácido nucleico en el gen que codifica para Tv-PNP o un fragmento del mismo que puede funcionar para producir cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente o para actuar como una mutación silenciosa tal como para producir un codón sinónimo puede hacerse funcional de manera similar en el presente documento. Tales sustituciones y métodos para su producción se reconocen fácilmente por los expertos en la técnica.

Se ha encontrado sorprendentemente que un tm-PNP tiene mayor actividad de escisión en relación con la PNP silvestre correspondiente para un organismo dado. Una tm-PNP según la presente invención implica preferiblemente una mutación del marco de lectura dentro de las 150 bases de ácido nucleico terminales asociadas con la secuencia de nucleótidos de PNP de manera que se suprime un codón de terminación común a todas las secuencias silvestres de PNP conocidas a través de un desplazamiento del marco y se añade una cola terminal a la secuencia de aminoácidos de tm-PNP expresada, teniendo la cola entre 10 y 50 residuos de aminoácido adicionales. Se aprecia que el desplazamiento del marco en la secuencia de nucleótidos de PNP silvestre se produce fácilmente a través de inserción o deleción de una o más bases de nucleótido con la condición de que las inserciones o deleciones de bases de nucleótido no sean un múltiplo de 3 en el sentido de 5' del codón de terminación. La cola resultante corresponde a un aminoácido que se codifica a partir de una región de secuencia de nucleótidos de PNP adyacente en relación con el codón de terminación de la secuencia de nucleótidos silvestre o se añade. El valor de índice terapéutico de la cola de una tm-PNP y la longitud de la cola de entre 10 y 50 residuos de aminoácido de longitud parecen ser factores importantes en la escisión preferente que tales enzimas tm-PNP ejercen sobre el sustrato de profármaco clínicamente importante de F-araA en relación con MeP-dR. Sin querer restringirse a una teoría particular, se cree que la cola de una tm-PNP de la invención modifica el acceso del ligando al sitio de unión al profármaco de tm-PNP en relación con la enzima silvestre.

#### Administración de sustratos

Se usa opcionalmente la fórmula de Freidenreich *et al.*, Cancer Chemother. Rep., 50:219-244, (1966) para determinar la dosis tolerada máxima de sustrato para un sujeto humano. Por ejemplo, la administración de manera sistémica a ratones de 25 mg (MeP-dR) por kg al día durante 9 días (9 dosis en total) dio como resultado algo de toxicidad pero no mortalidad. A partir de este resultado, se determinó una dosificación para ser humano de 75 mg de MeP-dR/m<sup>2</sup> según la fórmula: 25 mg/kg x 3=75 mg/m<sup>2</sup>. Se espera que esta cantidad o ligeramente menor maximice la destrucción de células tumorales en seres humanos sin matar al sujeto generando de ese modo un perfil de eficacia con respecto a seguridad favorable. Esta norma de eficacia se acepta en el campo de la terapia contra el cáncer. Más preferiblemente, los niveles de fármacos administrados oscilan entre aproximadamente el 10% y el 1% de la dosificación tolerada máxima (por ejemplo, 7,5 mg/m<sup>2</sup>-0,75 mg/m<sup>2</sup>). Se entiende que los modos de administración que permiten que el sustrato permanezca localizado en o cerca del sitio del tumor serán eficaces a dosis menores que los sustratos administrados de manera sistémica.

El sustrato puede administrarse por vía oral, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), mediante inyección intramuscular, mediante inyección intratumoral, mediante inyección intraperitoneal o por vía transdérmica. La cantidad exacta de sustrato requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad, el peso, el estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad que está tratándose, la ubicación y el tamaño del tumor, el compuesto particular usado, su modo de administración, y similares. Puede determinarse una cantidad apropiada por un experto habitual en la técnica usando sólo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento. Generalmente, la dosificación estará preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5-50 mg/m<sup>2</sup>, cuando se considera MePdR por ejemplo, o un equivalente funcional. Para un profármaco tal como fludarabina, la dosificación estará normalmente en, o por debajo de las dosis que ya se sabe que son seguras en el sujeto.

Dependiendo del modo de administración pretendido, el sustrato puede administrarse en composiciones farmacéuticas en forma de formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos o suspensiones, preferiblemente en forma de dosificación unitaria adecuada para administración individual de una dosificación precisa. Las composiciones incluirán una cantidad eficaz del sustrato seleccionado en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores o diluyentes. El término "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que no es biológicamente o de otra forma no deseado, que puede administrarse a un individuo junto con el sustrato seleccionado sin provocar efectos biológicos no deseados significativos o interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

Para composiciones sólidas, los portadores sólidos no tóxicos convencionales incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Pueden prepararse composiciones líquidas administrables farmacéuticamente, por ejemplo, disolviendo o dispersando un compuesto activo con adyuvantes farmacéuticos óptimos en un excipiente, tal como agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares para formar de ese modo una disolución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse también puede

contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, por ejemplo, acetato de sodio u oleato de trietanolamina. Se conocen métodos reales de preparación de tales formas de dosificación, o resultarán evidentes para los expertos en la técnica; por ejemplo, véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

- 5 Para administración oral, gránulos o polvos finos pueden contener agentes de dilución, dispersión y/o tensioactivos, y pueden presentarse en agua o en un jarabe, en cápsulas o sobres en estado seco o en una suspensión o disolución no acuosa en la que pueden incluirse agentes de suspensión, en comprimidos en los que pueden incluirse aglutinantes y lubricantes, o en una suspensión en agua o un jarabe. Cuando es deseable o necesario, pueden añadirse agentes saborizantes, conservantes, de suspensión, espesantes o emulsionantes. Se prefieren  
10 comprimidos y gránulos para formas de administración oral, y éstas pueden estar recubiertas.

La administración parenteral es generalmente mediante inyección. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, o bien disoluciones o bien suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución o antes de la inyección, o como una suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones.

#### Vectores que contienen ácidos nucleicos que codifican para Tv-PNP

- 15 La presente divulgación proporciona un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica para una Tv-PNP. El vector puede contener además un elemento regulador operativamente unido a la secuencia de nucleótidos de manera que la secuencia de nucleótidos se transcribe y se traduce en un huésped. Preferiblemente, el vector es un virus o un plásmido. Los ejemplos ilustrativos de vectores virales adecuados incluyen un retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado, un virus vaccinia, un virus del herpes y una construcción viral quimérica tal como un vector  
20 adenoretroviral. Entre los vectores de adenovirus útiles están adenovirus humanos tales como adenovirus de tipo 2 ó 5 y adenovirus de origen animal que incluyen manera ilustrativa los de origen aviar, bovino, canino, murino, ovino, porcino o de simios.

- El uso de vectores derivados de virus adenoasociados para la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo* se ha descrito de manera extensa por ejemplo en la patente estadounidense n.º 4.797.368 y la patente estadounidense n.º  
25 5.139.941. En general, se delecionan los genes rep y/o cap y se reemplazan por el gen que va a transferirse. Se preparan partículas virales recombinantes mediante cotransfección de dos plásmidos dentro de una línea celular infectada con un virus auxiliar humano. Los plásmidos transfectados incluyen un primer plásmido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para una PNP de la presente invención que está flanqueada por dos regiones de repeticiones invertidas del virus, y un segundo plásmido que porta los genes de encapsidación (rep y cap) del virus. Las partículas virales recombinantes se purifican entonces mediante técnicas convencionales.  
30

#### Expresión de PNP

- Las enzimas Tv-PNP de la presente divulgación se transcriben y se traducen *in vivo* e *in vitro*. Con el fin de producir las proteínas *in vivo*, se introduce un vector que contiene ácidos nucleicos que codifican para una Tv-PNP específica en las células, *in vivo* o *ex vivo*. Esto puede incluir la reintroducción de células de nuevo en el animal, por medio de  
35 un vector tal como se explica resumidamente en el presente documento. En otro aspecto la proteína de interés se produce *in vitro*, o bien en una célula o en un sistema libre de células. La proteína producida de esta manera se usa *in vitro* o se introduce en una célula o animal para producir un resultado deseado.

- La expresión de una Tv-PNP en células de mamífero puede requerir una secuencia reguladora de la transcripción eucariota unida a las secuencias que codifican para Tv-PNP. El gen de Tv-PNP puede expresarse bajo el control de  
40 elementos promotores/potenciadores constitutivos fuertes que están contenidos dentro de plásmidos comerciales (por ejemplo, el promotor/potenciador temprano de SV40 (pSVK30 Pharmacia, Piscataway, NJ), la repetición terminal larga del virus del sarcoma murino de Moloney (pBPV, Pharmacia), la repetición terminal larga del virus de tumor mamario de ratón (pMSG, Pharmacia) y el promotor/potenciador temprano de citomegalovirus (pCMV $\beta$ , Clontech, Palo Alto, CA).

- 45 Pueden usarse otros elementos y secuencias reguladoras genéticas específicos de tejido para dirigir la expresión de un gen que codifica para una enzima de escisión de nucleósido de análogo de purina adecuada a tipos de células específicos distintos de melanomas, por ejemplo, promotores específicos de tejido incluyendo de manera ilustrativa un promotor de albúmina, proteína de unión a ácido graso intestinal, suero lácteo, neurofilamento, piruvato cinasa, vilina y actina alfa de músculo liso.

- 50 Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran esquemas de reacción específicos y compuestos de la invención específicos y productos intermedios según la presente divulgación. Se describen en el presente documento métodos que implican técnicas biológicas convencionales. Tales técnicas se conocen generalmente en la técnica y se describen en detalle en tratados de metodología tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas). Se describen métodos inmunológicos (por ejemplo, preparación de anticuerpos  
55 específicos de antígeno, inmunoprecipitación e inmunotransferencia), por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, ed. Coligan *et al.*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991; y *Methods of Immunological Analysis*, ed.

Masseyeff *et al.*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992.

Se ilustran diversos aspectos de la presente divulgación mediante los siguientes ejemplos no limitativos. Los ejemplos son para fines ilustrativos y no son una limitación sobre cualquier práctica de la presente divulgación. Aunque los ejemplos se refieren generalmente a células, tejido, fluidos o sujetos mamíferos, una persona que tiene un conocimiento habitual en la técnica reconoce que técnicas similares y otras técnicas conocidas en la técnica trasladan fácilmente los ejemplos a otros mamíferos tales como seres humanos. Los reactivos ilustrados en el presente documento reaccionan de manera cruzada comúnmente entre especies de mamífero o están disponibles comercialmente reactivos alternativos con propiedades similares, y un experto habitual en la técnica entiende fácilmente dónde pueden obtenerse tales reactivos.

10 Selección de sustratos

Los sustratos adecuados se caracterizan por ser relativamente no tóxicos para una célula de mamífero en comparación con el análogo de base de purina escindido citotóxico. A continuación se enumeran algunos ejemplos ilustrativos de sustratos. Se incluyen abreviatura(s) común(es) después de algunos de los compuestos y separados por un punto y coma:

- 15 9-( $\beta$ -D-arabinofuranosil)-2-fluoroadenina; F-araA, fludarabina  
 9-(2-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil]-6-metilpurina; MeP-dR  
 9-( $\beta$ -D-ribofuranosil)-2-amino-6-cloro-1-deazapurina; ACDP-R  
 7-( $\beta$ -D-ribofuranosil)-3-deazaguanina  
 2-fluoro-2'-desoxiadenosina; F-dAdo
- 20 9-(5-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metilpurina  
 2-fluoro-5'-desoxiadenosina  
 2-cloro-2'-desoxiadenosina; Cl-dAdo, cladribina  
 5'-amino-5'-desoxi-2-fluoroadenosina  
 9-(5-amino-5-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metilpurina
- 25 9-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(2,3-didesoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metilpurina  
 2',3'-didesoxi-2-fluoroadenosina  
 9-(3-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil]-6-metilpurina  
 2-fluoro-3'-desoxiadenosina
- 30 9-( $\alpha$ -L-lixofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-( $\alpha$ -L-lixofuranosil)-6-metilpurina  
 9-(6-desoxi- $\beta$ -D-alofuranosil)-6-metilpurina  
 9-(6-desoxi- $\beta$ -D-alofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(6-desoxi- $\alpha$ -L-talofuranosil)-6-metilpurina
- 35 9-(6-desoxi- $\alpha$ -L-talofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(2,6-didesoxi- $\beta$ -D-alofuranosil)-6-metilpurina  
 9-(2,6-didesoxi- $\beta$ -D-alofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(2,6-didesoxi- $\alpha$ -L-talofuranosil)-6-metilpurina  
 9-(2,6-didesoxi- $\alpha$ -L-talofuranosil)-2-fluoroadenina
- 40 9-(6,7-didesoxi- $\alpha$ -L-hept-6-inofuranosil)-6-metilpurina

- 9-(6,7-didesoxi- $\alpha$ -L-hept-6-inofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(6,7-didesoxi- $\beta$ -D-hept-6-inofuranosil)-6-metilpurina  
 9-(6,7-didesoxi- $\beta$ -D-hept-6-inofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(2,6,7-tridesoxi- $\alpha$ -L-hept-6-inofuranosil)-6-metilpurina  
 5 9-(2,6,7-tridesoxi- $\alpha$ -L-hept-6-inofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(2,6,7-tridesoxi- $\beta$ -D-hept-6-inofuranosil)-6-metilpurina  
 9-(2,6,7-tridesoxi- $\beta$ -D-hept-6-inofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(2,3-didesoxi-3-hidroximetil- $\alpha$ -D-ribofuranosil)-6-tioguanina  
 9-(5,5-di-C-metil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-2-fluoro-adenina  
 10 9-(5,5-di-C-metil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metilpurina  
 9-(5-desoxi-5-yodo- $\beta$ -D-ribofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(5-desoxi-5-yodo- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metilpurina  
 9-(5-desoxi-5-metiltio- $\beta$ -D-ribofuranosil)-2-fluoroadenina  
 9-(5-desoxi-5-metiltio- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metilpurina  
 15 Se encuentran ejemplos adicionales en Ichikawa E. y Kato K., Curr. Med. Chem. 2001 Mar; 8(4): 385-423.

Se aprecia que se esperaba que algunos sustratos se tolerasen mejor que otros. Por ejemplo, FaraA se escinda a una velocidad más rápida por Tv-PNP en comparación con otras enzimas conocidas de modo que se proporcionan mayores opciones terapéuticas.

#### Ejemplo 1: Síntesis de vectores de expresión de Tv-PNP

- 20 Se obtiene ADN genómico de *T. vaginalis* con un primer clon de ADN a partir de una cepa resistente a metronidazol (R: CDC955) y un segundo clon de ADN a partir de una cepa sensible (S3: CDC520). Se amplifica el gen de TvPNP mediante PCR usando los siguientes cebadores a partir de ambas muestras usando AccuPrime Pfx supermix (Invitrogen). Los cebadores se diseñan basándose en la secuencia de TvPNP descargada de sitio web del proyecto del genoma de tricomonas TIGR. La secuencia está disponible actualmente en GenBank (XM\_001323400). Los  
 25 cebadores de Tv-PNP usados en el presente documento incluyen los sitios de restricción entre paréntesis en los mismos: cebador directo TvPNP-F: 5'-GTTAACGGATCCATGGCAACACCCATAACTCTGCT-3' (HpaI y BamHI) (SEQ ID NO: 1). Cebadores inversos de Tv-PNP TvPNP-R: 5'-  
 30 TCTAGAGTTAACGTCCTTATAATTTGATTGCTGCTTC-3' (XbaI y HpaI) (SEQ ID NO: 2) y TvPNP-R1: 5'-ATAGTTTAGATCCGAGGACCAATCAT-3' (SEQ ID NO: 3). La secuencia de nucleótidos de Tv-PNP silvestre se ilustra como SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos de Tv-PNP silvestre es SEQ ID NO: 5.

- Se realiza la primera ronda de PCR usando los cebadores TvPNP-F y Tv-PNPR1. Entonces se realiza PCR anidada (segunda ronda) usando el producto de la PCR de primera ronda y los cebadores TvPNP-F y TvPNP-R. El producto de PCR se clona en el vector pCR4Blunt-Topo (Invitrogen) y se secuencia (ID de clon = pCR4 Blunt-TvPNP) tal como se representa en la figura 3. La cepa S contiene un cambio de base con respecto a la secuencia de TIGR, pero no cambia el codón Arg102 (CGC -> CGT). Puesto que el clon R coincide con la secuencia de TIGR, se usa el clon TvPNP(R) para la clonación adicional. Para generar adenovirus que expresan TvPNP, se digiere TvPNP(R) de la figura 3 con EcoRI y XbaI y se clona en los sitios EcoRI y XbaI del vector de transferencia de adenovirus pACCMV.pLpA. Se cotransfecta el pACCMV-TvPNP tal como se representa en la figura 4 con pJM17 (Microbix) para obtener Ad-TvPNP recombinante por medio de recombinación homóloga en células 293. Se identifica el Ad-TvPNP resultante mediante PCR específica de Tv-PNP y ensayo de actividad de Tv-PNP.  
 40

- Se usan dos vectores diferentes para generar virus Lenti-TvPNP. Se clona TvPNP(R) tal como se representa en la figura 3 en un vector pWPI modificado (originalmente de Addgene.org; que se modifica para contener más sitios de restricción para fin de clonación (pWPI-linker(+))). El vector pWPI expresa proteína fluorescente verde (EGFP) potenciada bajo el control del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Se aísla TvPNP(R) de pCR4Blunt-TvPNP usando PmeI y XbaI, luego se clona en los sitios SnaBI y SpeI del vector pWPI-linker(+) de la figura 5. PmeI y SnaBI cortan con extremos romos y XbaI y SpeI generan las mismas proyecciones.  
 45

Se clona TvPNP(R) por separado en el vector pHR'CMV Luc W Sin-18 (según J. Bio. Chem., publicado el 1 de octubre de 2004 como manuscrito M410370200) en lugar del gen de luciferasa para generar líneas celulares que expresan TvPNP sin coexpresar EGFP. Se aísla TvPNP(R) de pCR4Blunt-TvPNP usando BamHI y HpaI, luego se

clona en los sitios BamHI y XhoI (con extremos romos usando el fragmento Klenow) del vector pHR'CMV Luc W Sin-18 representado en la figura 6.

Ejemplo 2: Identificación de profármacos candidatos para enzimas Tv-PNP

5 El siguiente método es útil para identificar sustratos que se escinden más eficazmente por la Tv-PNP silvestre que por la PNP de *E. coli* silvestre u otras PNP. Los profármacos identificados mediante este método pueden evaluarse adicionalmente entonces en estudios en animales para la determinación de la toxicidad, adecuadamente para su administración con diversos portadores farmacéuticos, y otras propiedades farmacológicas.

10 El método mide cuantitativamente la escisión de sustratos *in vitro*. Se combinan los nucleósidos análogos de purina (0,1 mM en 500  $\mu$ l de HEPES 100 mM, pH 7,4, fosfato de potasio 50 mM) con Tv-PNP 100  $\mu$ g/ml o PNP de *E. coli* silvestre. Se incuban las mezclas de reacción a 25°C durante 1 hora, y se detienen las reacciones sometiendo a ebullición cada muestra durante 2 minutos. La concentración de proteína y el tiempo de ensayo varían dependiendo de la actividad de la enzima para un sustrato particular. Cada muestra se analiza mediante HPLC de fase inversa para medir la conversión de sustrato en producto. Los análogos de nucleósido y purina se eluyen de una columna Spherisorb ODSI (5  $\mu$ m) (Keystone Scientific, Inc., State College, PA) con un disolvente que contiene dihidrogenofosfato de amonio 50 mM (95%) y acetonitrilo (5%). Se detectan los productos mediante absorbancia a 254 nm, y se identifican comparando sus tiempos de retención y espectros de absorción con muestras de control auténticas.

20 La tabla 1 muestra la actividad de la enzima PNP de *E. coli* silvestre en comparación con Tv-PNP silvestre en presencia de diversos sustratos. Se someten a prueba numerosos compuestos para determinar su eficacia como sustrato para Tv-PNP en comparación paralela con PNP de *E. coli*. Los compuestos incluyen diversos análogos de adenosina, de inosina, de MeP-dR y de adenosina sustituida con flúor o cloro. Se incuban las enzimas con 100 micromolar de cada compuesto enumerado en la tabla y se determina la velocidad de escisión enzimática mediante separación por HPLC de la base del nucleósido. Tal como se muestra en la tabla 1, Tv-PNP escinde F-araA a una velocidad (32.000 nanomoles por miligramo por hora) que es aproximadamente 23 veces la velocidad a la que PNP de *E. coli* escinde F-araA (1.250 nanomoles por miligramo por hora). El resultado se confirma además tal como se muestra en la figura 1 en que la eficacia catalítica de Tv-PNP con F-araA es 25 veces la eficacia catalítica de PNP de *E. coli* con FaraA ( $V_{max}/K_m$  de 944 frente a 38). Se aprecia que una mayor actividad biológica de la enzima Tv-PNP permite una mayor actividad en la alteración del crecimiento celular anómalo cuando la Tv-PNP se usa para el tratamiento de estados patológicos usando F-araA como sustrato de profármaco. Puesto que se notifica que F-araA provoca respuestas completas en tumor que expresa enzima PNP de *E. coli* silvestre, un aumento de al menos 23 veces en la generación de F-Ade tóxica usando la combinación de Tv-PNP silvestre y F-araA conduce a una actividad antitumoral mejorada.

35 Se observa también a partir de la tabla 1 que Tv-PNP tiene mayores actividades hacia 2-Cl-2'-desoxiadenosina (Cl-dAdo, cladribina) en comparación con PNP de *E. coli*. La Tv-PNP escinde Cl-dAdo a una actividad específica de 320.000 nanomoles por miligramo por hora mientras que la misma Cl-dAdo se escinde por *E. coli* a una actividad específica de sólo 39.000 nanomoles por miligramo por hora.

Tabla 1 Comparación de la actividad de sustratos de Tv-PNP y PNP de *E. coli* silvestre; un "-" representa ausencia de escisión detectada.

Sustrato	PNP de <i>T. vaginalis</i>	PNP de <i>E. coli</i>
Adenosina	501.000	398.000
9- $\beta$ -D-arabinofuranosil-adenina	38.000	610
9- $\beta$ -D-xilofuranosil-adenina	2	<2
3'-desoxiadenosina (cordicepina)	2.000	<2
2',3'-didesoxiadenosina	640	<2
5'-desoxiadenosina	50.000	8.400
5'-amino-5'-desoxiadenosina	4.200	540
5'-carboxamida de adenosina	33	<1
9- $\beta$ -D-piranosil-adenina	2	<1
2'-O <sup>metil</sup> -adenosina	<10	<1
9- $\alpha$ -L-lixofuranosil-adenina	22.000	3.700
Inosina	154.000	342.000
2'-desoxiinosina	660.000	733.000
9- $\beta$ -D-arabinofuranosil-hipoxantina	48	61
9- $\beta$ -D-arabinofuranosil-guanina	16	310
7- $\beta$ -D-ribosil-hipoxantina	2.300	5.200
7- $\beta$ -D-ribosil-6-tioguanina	435	66
Guanosina	14.000	156.000

9-β-D-ribofuranosil-6-metilpurina	155.000	96.000
9-[5-desoxi-β-D-ribofuranosil]-6-metilpurina	3.600	406
9-[2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-6-metilpurina	484.000	528.000
9-[β-D-arabinofuranosil]-6-metilpurina	570	14
9-[2-desoxi-α-D-ribofuranosil]-6-metilpurina	<8	<1
9-[5-metil-(talo)-β-D-ribofuranosil]-6-metilpurina	8.400	915
9-[5-metil-(alo)-β-D-ribofuranosil]-6-metilpurina	223	47
9-[5-metil-(talo)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-6-metilpurina	103.000	3.600
9-[5,5-dimetil-β-D-ribofuranosil]-6-metilpurina	<8	<1
9-α-L-lixofuranosil-6-metilpurina	10.000	320
7-[2-desoxi-α-L-lixofuranosil]-6-metilpurina	<8	<1
9-[5-desoxi-α-L-lixofuranosil]-6-metilpurina	246	20
9-[5-desoxi-5-yodo-α-L-lixofuranosil]-6-metilpurina	<8	<1
2-F-2'-desoxiadenosina (F-dAdo)	400.000	435.000
2-F-adenosina	185.000	215.000
9-β-D-arabinofuranosil-2-F-adenina (fludarabina)	32.000	1.250
2-F-5'-desoxi-adenosina	50.000	29.000
9-α-L-lixofuranosil-2-F-adenina	28.200	7.800
2-Cl-2'-desoxiadenosina (Cl-dAdo)	352.000	39.000
2-Cl-2'-desoxiadenosina (β-L)	<8	<1
2-Cl-2'-desoxiadenosina (α-L)	<8	<1

Tv-PNP y PNP de *E. coli* silvestre son sustancialmente similares tanto en estructura como en funcionalidad. El presente descubrimiento y la cuantificación de que Tv-PNP y *E. coli* difieren enormemente en la eficacia de escisión de profármacos para dar compuestos citotóxicos es contradictoria con la comprensión convencional de que Tv-PNP no tiene actividad apreciable hacia F-araA (Wang *et al.*, id.), indicando la novedad de esta observación.

- 5 Mediante este análisis, Tv-PNP tiene más actividad para fludarabina, cladribina, análogo de cordicepina, análogo de 2',3'-didesoxiadenosina, 5'-metil(talo)-6-metilpurina-ribósido, 5'-metil(talo)-2'-desoxi-6-metilpurina-ribósido, 5'-metil(alo)-6-metilpurina-ribósido, 2-F-5'-desoxiadenosina o 2-F-α-L-lixo-adenina en comparación con PNP de *E. coli* silvestre. Por tanto, estos sustratos son profármacos candidatos preferidos que pueden elegirse para evaluación adicional para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento para tratar un estado patológico y en particular los profármacos disponibles comercialmente en calidad de USP.

Ejemplo 3: Comparación de la capacidad de diversos PNP para escindir MeP-dR y F-araA.

- 15 Se compara la actividad de escisión relativa de PNP de diversos orígenes para determinar la enzima óptima para la escisión de los importantes agentes quimioterápicos MeP-dR y F-araA mediante el procedimiento del ejemplo 2. Se incuban enzimas de diversas puridades con F-araA o MeP-dR 100 μM y se determina la tasa de escisión midiendo la producción de producto (MeP o F-Ade) mediante HPLC tal como se describe en el ejemplo 2. Los resultados se proporcionan en la tabla 2.

Tabla 2

Organismo	MeP-dR	F-araA nmoles/mg/h	MeP-dR/F-araA
PNP humana	35	<1	>35
PNP de <i>T. vaginalis</i>	536.000	30.000	18
PNP de <i>E. coli</i>	528.000	1.250	422
PNP de <i>A. areogenes</i>	6.638	10	464
PNP de <i>A. Laidlawii</i>	6.090	19	320
PNP de <i>Klebsiella sp</i>	11.432	32	357
PNP de <i>Salmonella typhimurium</i>	9.150	20	458
PNP de <i>B. cereus</i>	1.400.000	13.000	108
PNP de <i>Tularemia</i>	4.900	18	272
Hidrolasa de <i>T. Bruceii</i>	750	<1	>750
Mutante de PNP de <i>E. Coli</i> M65V	1823	3,9	469
tm-PNP	948	4,8	198

Ejemplo 4: Expresión de PNP de E. Coli con cola terminal de 30 residuos (tm-PNP) y escisión de profármaco

- 20 Se clonó una secuencia de nucleótidos derivada de PNP de *E. coli* silvestre correspondiente a 2.134 bases de nucleótido en los sitios EcoRI y XbaI del vector de transferencia de adenovirus pACCMV.plpA. Esta secuencia varía con respecto a PNP de *E. coli* silvestre en que carece de una base de adenosina que por lo demás está presente

como residuo 1634. Esta delección de una base para producir "GGTAA" en PNP de *E. coli* silvestre habría sido "GAG" (239° codón correspondiente a ácido glutámico) y "TAA" correspondiente a un codón de terminación. El desplazamiento del marco resultante produce una cola de 30 aminoácidos en lugar de un ácido glutámico como extremo terminal (239° residuo) de ácido glutámico encontrado en PNP de *E. coli* silvestre. Se proporciona una secuencia congénica correspondiente a esta PNP mutante con cola en la figura 7 con los codones de iniciación (atg) y terminación (taa) de la PNP mutante con cola resaltados así como la región de desplazamiento del marco de la secuencia del vector de transferencia de adenovirus. Por lo demás, una secuencia de nucleótidos que se extiende entre las bases 919 y 1632 de la figura 7 corresponde a una secuencia de nucleótidos de PNP silvestre.

La secuencia de aminoácidos de la tm-PNP producida por la expresión de la secuencia de nucleótidos de la figura 7 se proporciona en la figura 8. La cola de 30 aminoácidos proporcionada en lugar del ácido glutámico terminal en PNP de *E. coli* silvestre se resalta en la figura 8 y se ilustra como SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos clonada en el vector de transferencia de adenovirus (SEQ ID NO: 6) incluye una secuencia de nucleótidos que se extiende entre las bases 919 y 1722 (SEQ ID NO: 7) que incluye un mutante de cola de 30 aminoácidos (SEQ ID NO: 8) en lugar del residuo de aminoácido de ácido glutámico terminal encontrado en PNP de *E. coli* silvestre.

Se sometió a prueba la tm-PNP resultante para determinar su capacidad para escindir MeP-dR y F-araA tal como se detalla en el ejemplo 3. Esta tm-PNP tenía una razón de MeP-dR/F-araA de 198. Esto corresponde a una razón de PNP de *E. coli* silvestre de 422 (tabla 2) y representa una selectividad de escisión de F-araA de 2,3 veces. Por consiguiente, tm-PNP representa una enzima preferida para su uso con el profármaco F-araAMP en el tratamiento de tumores sólidos.

La tm-PNP se compara favorablemente en su capacidad de escisión con mutantes por sustitución de PNP de *E. coli*. Se detallan varias PNP de *E. coli* con mutación por sustitución en el documento WO 03/035012 e incluyen una sustitución de residuo de aminoácido valina en lugar de metionina en la posición 65 (contando desde la fMET) de la secuencia de proteína de PNP de *E. coli* silvestre (M65V). La razón de los sitios EcoRI y XbaI del virus de transferencia de adenovirus pACCMV.pLpA para M65V que carece de una cola de aminoácido de la invención para enzima purificada era de 593, mientras que la enzima expresada en tumores en los que se inyectó un vector de adenovirus que codifica para la PNP de *E. coli* mutante por sustitución era de 469±52. Como con todos los resultados de razón de escisión, estos resultados se normalizan basándose en cantidades equimolares de sustrato.

Experimentos de eficacia *in vivo* indican que tm-PNP muestra una actividad antitumoral considerablemente mayor en relación con M65V atribuyéndose estas diferencias a razones de sitios EcoRI y XbaI diferentes de vector de transferencia de adenovirus pACCMV.pLpA.

#### Ejemplo 5: Expresión de PNP de *E. Coli* con cola terminal de 24 residuos (tm-PNP) y escisión de profármaco

La secuencia de nucleótidos de la figura 7 se modifica para insertar una base de adenosina después de la base 1705 para crear un codón de terminación (TAA) con una cola de 24 aminoácidos añadida en lugar de ácido glutámico en el extremo terminal de PNP de *E. coli* silvestre. Esta tm-PNP con cola de 24 aminoácidos añadida es una secuencia clonada en un vector de transferencia de adenovirus pACCMV.pLpA tal como se detalla en el ejemplo 4 y se proporciona en SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos expresada se proporciona en SEQ ID NO: 10.

#### Ejemplo 6: tmTv-PNP con cola terminal de 30 residuos

Se repite el procedimiento del ejemplo 4 con una delección de TAA a partir de Tv-PNP y una cola de polipéptido añadida en un vector de expresión de adenovirus. Esta tmTv-PNP con cola de 30 aminoácidos es una secuencia clonada en un vector de transferencia de adenovirus pACCMV.pLpA tal como se detalla en el ejemplo 4 y se proporciona en SEQ ID NO: 11. La secuencia de aminoácidos expresada se proporciona en SEQ ID NO: 12.

#### **Lista de secuencias**

<110> The UAB Research Foundation  
Southern Research Institute

<120> PURINA NUCLEÓSIDO FOSFORILASA COMO ACTIVADOR ENZIMÁTICO DE PROFÁRMACOS DE NUCLEÓSIDOS

<130> P6983EPPC

<140> Documento EP09807420.6

<141> 17-08-2009

<150> Documento US 61/089.235

<151> 15-08-2008

<150> Documento US 61/225.012

<151> 13-07-2009

ES 2 609 685 T3

<160> 12  
 <170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> *Trichomonas vaginalis*

10 <400> 1  
 gttaacggat ccatggcaac accccataac tctgct 36

<210> 2  
 <211> 37  
 15 <212> ADN  
 <213> *Trichomonas vaginalis*

<400> 2  
 20 tctagagtta acgtccttat aattgattg ctgctc 37

<210> 3  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> *Trichomonas vaginalis*

25 <400> 3  
 atagtttaga tccgaggacc aatcat 26

<210> 4  
 30 <211> 720  
 <212> ADN  
 <213> *Trichomonas vaginalis*

<400> 4  
 35 ctttcatggc aacaccccat aactctgctc aggttggcga ttcgctgaa acagtcctca 60  
 tgtgcggtga tccactccgc gctaagctca ttgctgagac atatcttgaa aatccaaagc 120

ttgtcaacaa tgttcgtggc attcaaggct acaccggcac atacaagga aagccaatct 180

ctgtcatggg ccatggtatg ggcttgccat caatctgcat ctatgcagag gagctttact 240

ccacatacaa ggtcaagaca atcatccgtg ttggtacatg cggcgcgaatt gacatggaca 300

tccacacacg cgatatcggt atcttcacct ctgctggtag aaactccaag atcaacagaa 360

tccgcttcat ggatcacgat tatccagcca cagcatcttt cgatggtggt tgcgccttag 420

ttgatgctgc taaggaactc aacatcccag ctaaggctcg taagggattc tcaacagatc 480

tcttctacaa tccacaaacc gaactcgcac agctcatgaa caagttccac ttcctcgctg 540

ttgaaatgga atctgctggc ctcttcccaa ttgctgacct ttatggcgca agagctggct 600

gcatctgcac agtttcagat cacatcctcc accatgaaga aacaacagcc gaagaacgcc 660

agaactcctt ccaaaacatg atgaagatcg cacttgaagc agcaatcaaa ttataaggac 720

<210> 5  
 <211> 236  
 40 <212> PRT  
 <213> *Trichomonas vaginalis*

ES 2 609 685 T3

<400> 5

Met Ala Thr Pro His Asn Ser Ala Gln Val Gly Asp Phe Ala Glu Thr  
1 5 10 15

Val Leu Met Cys Gly Asp Pro Leu Arg Ala Lys Leu Ile Ala Glu Thr  
20 25 30

Tyr Leu Glu Asn Pro Lys Leu Val Asn Asn Val Arg Gly Ile Gln Gly  
35 40 45

Tyr Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Lys Pro Ile Ser Val Met Gly His Gly  
50 55 60

Met Gly Leu Pro Ser Ile Cys Ile Tyr Ala Glu Glu Leu Tyr Ser Thr  
65 70 75 80

Tyr Lys Val Lys Thr Ile Ile Arg Val Gly Thr Cys Gly Ala Ile Asp  
85 90 95

Met Asp Ile His Thr Arg Asp Ile Val Ile Phe Thr Ser Ala Gly Thr  
100 105 110  
Asn Ser Lys Ile Asn Arg Ile Arg Phe Met Asp His Asp Tyr Pro Ala  
115 120 125

Thr Ala Ser Phe Asp Val Val Cys Ala Leu Val Asp Ala Ala Lys Glu  
130 135 140

Leu Asn Ile Pro Ala Lys Val Gly Lys Gly Phe Ser Thr Asp Leu Phe  
145 150 155 160

Tyr Asn Pro Gln Thr Glu Leu Ala Gln Leu Met Asn Lys Phe His Phe  
165 170 175

Leu Ala Val Glu Met Glu Ser Ala Gly Leu Phe Pro Ile Ala Asp Leu  
180 185 190

Tyr Gly Ala Arg Ala Gly Cys Ile Cys Thr Val Ser Asp His Ile Leu  
195 200 205

His His Glu Glu Thr Thr Ala Glu Glu Arg Gln Asn Ser Phe Gln Asn  
210 215 220

Met Met Lys Ile Ala Leu Glu Ala Ala Ile Lys Leu  
225 230 235

ES 2 609 685 T3

<210> 6  
<211> 2134  
<212> ADN  
<213> *Trichomonas vaginalis*

5

<400> 6  
tctaggcggc cgcgatctat acattgaatc aatattggca attagccata ttagtcattg 60  
gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat ctatatcata 120  
atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttgacat tgattattga 180  
ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc 240  
gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 300  
tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 360  
aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 420  
caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgcctggcat tatgcccagt 480  
acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgetatta 540

ES 2 609 685 T3

ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcggtg atagcggttt gactcacggg 600  
gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 660  
gggactttcc aaaatgtcgt aataacccccg ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg 720  
tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc cggtcgcgcg 780  
aattcgagct cggtagcccg ggatccgggtg gtgggtgcaaa tcaaagaact gtcctcagt 840  
ggatggtgcc tttacttteta ggctgtacg gaagtgttac ttctgcteta aaagctgegg 900  
aattgtacc gcggccgcat ggctaccca cacattaatg cagaaatggg cgatttcgct 960  
gacgtagttt tgatgccagg cgaccgctg cgtgcgaagt atattgctga aactttcctt 1020  
gaagatgccc gtgaagtga caacgttcgc ggtatgctgg gcttcaccgg tacttacaaa 1080  
ggccgcaaaa tttccgtaat gggtcacggg atgggtatcc cgtcctgctc catctacacc 1140  
aaagaactga tcaccgattt cggcgtgaag aaaattatcc gcgtgggttc ctgtggcgca 1200  
gttctgccgc acgtaaaact gcgcgacgtc gttatcggtg tgggtgcctg caccgattcc 1260  
aaagttaacc gcatccgttt taaagaccat gactttgccg ctatcgctga cttcgacatg 1320  
gtgcgtaacg cagtagatgc agctaaagca ctgggtattg atgctcgcgt gggtaacctg 1380  
ttctccgctg acctgttcta ctctccggac ggcgaaatgt tcgacgtgat ggaaaaatac 1440  
ggcattctcg gcgtggaaat ggaagcggct ggtatctacg gcgtcgcctgc agaatttggc 1500  
gcgaaagccc tgaccatctg caccgtatct gaccacatcc gactcacga gcagaccact 1560  
gccgctgagc gtcagactac cttcaacgac atgatcaaaa tcgcaactgga atccgttctg 1620  
ctgggcgata aaggtaagcg gccgcgggga tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag 1680  
cttgggatct ttgtgaagga acctacttc tgtgggtgta cataattgga caaactacct 1740  
acagagattt aaagctctaa ggtaaataa aaatttttaa gtgtataatg tgttaacta 1800  
ctgattctaa ttgtttgtgt attttagatt cacagtcca aggctcattt caggcccctc 1860  
agtcctcaca gtctgttcat gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt 1920  
gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattggt 1980  
gttgtaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat 2040  
ttcacaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgcctaa actcatcaat 2100  
gtatcttata atgtctggat cgcggccgcc taga 2134

<210> 7  
<211> 804  
<212> ADN  
<213> *Trichomonas vaginalis*

5

ES 2 609 685 T3

<400> 7  
atggctaccc cacacattaa tgcagaaatg ggcgatttcg ctgacgtagt tttgatgcca 60  
ggcgacccgc tgcgtgcgaa gtatattgct gaaactttcc ttgaagatgc ccgatgaagtg 120  
aacaacgttc gcggtatgct gggcttcacc ggtacttaca aaggccgcaa aatttccgta 180  
atgggtcacg gtatgggtat cccgtcctgc tccatctaca ccaagaact gatcaccgat 240  
ttcggcgtga agaaaattat ccgctggggg tccctgtggcg cagttctgcc gcacgtaaaa 300  
ctgcgcgacg tcgttatcgg tatgggtgcc tgcaccgatt ccaagttaa ccgcatccgt 360  
tttaaagacc atgactttgc cgctatcgct gacttcgaca tgggtgcgtaa cgcagtagat 420  
gcagctaaag cactgggtat tgatgctcgc gtgggtaacc tgttctccgc tgacctgttc 480  
tactctccgg acggcgaaat gttcgacgtg atggaaaaat acggcattct cggcgtggaa 540  
atggaagcgg ctggtatcta cggcgtcgtc gcagaatttg gcgcgaaagc cctgaccatc 600  
tgcaccgtat ctgaccacat ccgcactcac gagcagacca ctgccgctga gcgtcagact 660  
accttcaacg acatgatcaa aatcgactg gaatccgttc tgctgggcca taaaggtaag 720  
cggccgcggg gatcctctag agtcgacctg caggcatgca agcttgggat ctttgtgaag 780  
gaaccttact tctgtggtgt gaca 804

5 <210> 8  
<211> 268  
<212> PRT  
<213> *Trichomonas vaginalis*

10 <400> 8  
Met Ala Thr Pro His Ile Asn Ala Glu Met Gly Asp Phe Ala Asp Val  
1 5 10 15  
Val Leu Met Pro Gly Asp Pro Leu Arg Ala Lys Tyr Ile Ala Glu Thr  
20 25 30  
Phe Leu Glu Asp Ala Arg Glu Val Asn Asn Val Arg Gly Met Leu Gly  
35 40 45  
Phe Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Arg Lys Ile Ser Val Met Gly His Gly  
50 55 60

ES 2 609 685 T3

Met Gly Ile Pro Ser Cys Ser Ile Tyr Thr Lys Glu Leu Ile Thr Asp  
65 70 75 80

Phe Gly Val Lys Lys Ile Ile Arg Val Gly Ser Cys Gly Ala Val Leu  
85 90 95

Pro His Val Lys Leu Arg Asp Val Val Ile Gly Met Gly Ala Cys Thr  
100 105 110

Asp Ser Lys Val Asn Arg Ile Arg Phe Lys Asp His Asp Phe Ala Ala  
115 120 125

Ile Ala Asp Phe Asp Met Val Arg Asn Ala Val Asp Ala Ala Lys Ala  
130 135 140

Leu Gly Ile Asp Ala Arg Val Gly Asn Leu Phe Ser Ala Asp Leu Phe  
145 150 155 160

Tyr Ser Pro Asp Gly Glu Met Phe Asp Val Met Glu Lys Tyr Gly Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Glu Met Glu Ala Ala Gly Ile Tyr Gly Val Ala Ala Glu  
180 185 190

Phe Gly Ala Lys Ala Leu Thr Ile Cys Thr Val Ser Asp His Ile Arg  
195 200 205

Thr His Glu Gln Thr Thr Ala Ala Glu Arg Gln Thr Thr Phe Asn Asp  
210 215 220

Met Ile Lys Ile Ala Leu Glu Ser Val Leu Leu Gly Asp Lys Gly Lys  
225 230 235 240

Arg Pro Arg Gly Ser Ser Arg Val Asp Leu Gln Ala Cys Lys Leu Gly  
245 250 255

Ile Phe Val Lys Glu Pro Tyr Phe Cys Gly Val Thr  
260 265

<210> 9

<211> 2135

5 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 9

ES 2 609 685 T3

tctaggcggc cgcgatctat acattgaatc aatattggca attagccata ttagtcattg 60  
gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat ctatatcata 120  
atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttgacat tgattattga 180  
ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagttca tagcccatat atggagttcc 240  
gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 300  
tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 360  
aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc accctggcagt acatcaagtg tatcatatgc 420  
caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat tatgcccagt 480  
acatgacctt acgggaactt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 540  
ccatggtgat gcgggttttg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg 600  
gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 660  
gggactttcc aaaatgtcgt aataaccccg ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg 720  
tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc cggtcgcgcg 780  
aattcgagct cggtagccgg ggatccggtg gtggtgcaaa tcaagaact gtcctcagt 840  
ggatggtgcc tttacttcta ggctgtacg gaagtgttac ttctgctcta aaagctgcgg 900  
aattgtacc gcggccgcat ggtagccca cacattaatg cagaaatggg cgatttcgct 960  
gacgtagttt tgatgccagg cgaccgctg cgtgcgaagt atattgctga aactttcctt 1020  
gaagatgcc gtgaagtgaa caacgttcgc ggtatgctgg gcttcaccgg tacttacaaa 1080  
ggccgcaaaa tttccgtaat gggcacggt atgggtatcc cgtcctgctc catctacacc 1140  
aaagaactga tcaccgattt cggcgtgaag aaaattatcc gcgtgggttc ctgtggcgca 1200  
gttctgccgc acgtaaaact gcgacgctc gttatcggtg tgggtgcctg caccgattcc 1260  
aaagttaacc gcatccgttt taaagaccat gactttgccg ctatcgctga cttcgacatg 1320  
gtgcgtaacg cagtagatgc agctaaagca ctgggtattg atgctcgcgt gggtaacctg 1380  
ttctccgctg acctgttcta ctctccggac ggcgaaatgt tcgacgtgat ggaaaaatac 1440  
ggcattctcg gcgtggaaat ggaagcggct ggtatctacg gcgtcgcctgc agaatttggc 1500  
gcgaaagccc tgaccatctg caccgtatct gaccacatcc gcactcacga gcagaccact 1560  
gccgctgagc gtcagactac cttcaacgac atgatcaaaa tcgcaactgga atccgttctg 1620  
ctgggcgata aaggtaagcg gccgcgggga tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag 1680

ES 2 609 685 T3

cttgggatct ttgtgaagga accttaactt ctgtggtgtg acataattgg acaaactacc 1740  
 tacagagatt taaagctcta aggtaaatat aaaattttta agtgtataat gtgttaaact 1800  
 actgattcta attgtttgtg tatttttagat tcacagtccc aaggctcatt tcaggcccct 1860  
 cagtcctcac agtctgttca tgatcataat cagccatacc acattttagtag aggttttact 1920  
 tgcttttaaaa aacctcccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt 1980  
 tgttggttaac ttgtttattg cagcttataa tgggttataaaa taaagcaata gcatcacaaa 2040  
 tttcacaaaat aaagcatttt tttcaactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 2100  
 tgtatcttat catgtctgga tcgcggccgc ctaga 2135

<210> 10  
 <211> 262  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 10  
 Met Ala Thr Pro His Ile Asn Ala Glu Met Gly Asp Phe Ala Asp Val  
 1 5 10 15  
 Val Leu Met Pro Gly Asp Pro Leu Arg Ala Lys Tyr Ile Ala Glu Thr  
 20 25 30  
 Phe Leu Glu Asp Ala Arg Glu Val Asn Asn Val Arg Gly Met Leu Gly  
 35 40 45  
 Phe Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Arg Lys Ile Ser Val Met Gly His Gly  
 50 55 60  
 Met Gly Ile Pro Ser Cys Ser Ile Tyr Thr Lys Glu Leu Ile Thr Asp  
 65 70 75 80  
 Phe Gly Val Lys Lys Ile Ile Arg Val Gly Ser Cys Gly Ala Val Leu  
 85 90 95  
 Pro His Val Lys Leu Arg Asp Val Val Ile Gly Met Gly Ala Cys Thr  
 100 105 110  
 Asp Ser Lys Val Asn Arg Ile Arg Phe Lys Asp His Asp Phe Ala Ala  
 115 120 125

ES 2 609 685 T3

Ile Ala Asp Phe Asp Met Val Arg Asn Ala Val Asp Ala Ala Lys Ala  
130 135 140

Leu Gly Ile Asp Ala Arg Val Gly Asn Leu Phe Ser Ala Asp Leu Phe  
145 150 155 160

Tyr Ser Pro Asp Gly Glu Met Phe Asp Val Met Glu Lys Tyr Gly Ile  
165 170 175

Leu Gly Val Glu Met Glu Ala Ala Gly Ile Tyr Gly Val Ala Ala Glu  
180 185 190

Phe Gly Ala Lys Ala Leu Thr Ile Cys Thr Val Ser Asp His Ile Arg  
195 200 205

Thr His Glu Gln Thr Thr Ala Ala Glu Arg Gln Thr Thr Phe Asn Asp  
210 215 220

Met Ile Lys Ile Ala Leu Glu Ser Val Leu Leu Gly Asp Lys Gly Lys  
225 230 235 240

Arg Pro Arg Gly Ser Ser Arg Val Asp Leu Gln Ala Cys Lys Leu Gly  
245 250 255

Ile Phe Val Lys Glu Pro  
260

<210> 11

<211> 801

5 <212> ADN

<213> *Trichomonas vaginalis*

<400> 11

atggcaacac cccataactc tgctcagggt ggcgatttcg ctgaaacagt cctcatgtgc 60  
ggatgatccac tccgcgctaa gctcattgct gagacatatc ttgaaaatcc aaagcttgct 120  
aacaatgttc gtggcattca aggctacacc ggcacataca agggaaagcc aatctctgtc 180  
atgggccatg gtatgggctt gccatcaatc tgcattctatg cagaggagct ttactccaca 240  
tacaaggatc agacaatcat ccgtgttggt acatgcggcg caattgacat ggacatccac 300  
acacgcgata tcgttatctt cacctctgct ggtacaaaact ccaagatcaa cagaatccgc 360  
ttcatggatc acgattatcc agccacagca tctttcgatg ttgtttgcgc cttagttgat 420  
gctgctaagg aactcaacat cccagctaag gtcggtaagg gattctcaac agatctcttc 480

ES 2 609 685 T3

tacaatccac aaaccgaact cgcacagctc atgaacaagt tccacttcct cgctgttgaa 540  
atggaatctg ctggcctctt cccaattgct gacctttatg gcgcaagagc tggctgcatc 600  
tgcacagttt cagatcacat cctccacat gaagaaacaa cagccgaaga acgccagaac 660  
tccttccaaa acatgatgaa gatcgcactt gaagcagcaa tcaaattagg taagcggccg 720  
cggggatcct ctagagtoga cctgcaggca tgcaagcttg ggatctttgt gaaggaacct 780  
tacttctgtg gtgtgacata a 801

<210> 12

<211> 266

5 <212> PRT

<213> *Trichomonas vaginalis*

<400> 12

Met Ala Thr Pro His Asn Ser Ala Gln Val Gly Asp Phe Ala Glu Thr  
1 5 10 15

Val Leu Met Cys Gly Asp Pro Leu Arg Ala Lys Leu Ile Ala Glu Thr  
20 25 30

Tyr Leu Glu Asn Pro Lys Leu Val Asn Asn Val Arg Gly Ile Gln Gly  
35 40 45

Tyr Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Lys Pro Ile Ser Val Met Gly His Gly  
50 55 60

Met Gly Leu Pro Ser Ile Cys Ile Tyr Ala Glu Glu Leu Tyr Ser Thr  
65 70 75 80

Tyr Lys Val Lys Thr Ile Ile Arg Val Gly Thr Cys Gly Ala Ile Asp  
85 90 95

Met Asp Ile His Thr Arg Asp Ile Val Ile Phe Thr Ser Ala Gly Thr  
100 105 110

Asn Ser Lys Ile Asn Arg Ile Arg Phe Met Asp His Asp Tyr Pro Ala  
115 120 125

Thr Ala Ser Phe Asp Val Val Cys Ala Leu Val Asp Ala Ala Lys Glu  
130 135 140

ES 2 609 685 T3

Leu Asn Ile Pro Ala Lys Val Gly Lys Gly Phe Ser Thr Asp Leu Phe  
 145 150 155 160

Tyr Asn Pro Gln Thr Glu Leu Ala Gln Leu Met Asn Lys Phe His Phe  
 165 170 175

Leu Ala Val Glu Met Glu Ser Ala Gly Leu Phe Pro Ile Ala Asp Leu  
 180 185 190

Tyr Gly Ala Arg Ala Gly Cys Ile Cys Thr Val Ser Asp His Ile Leu  
 195 200 205

His His Glu Glu Thr Thr Ala Glu Glu Arg Gln Asn Ser Phe Gln Asn  
 210 215 220

Met Met Lys Ile Ala Leu Glu Ala Ala Ile Lys Leu Gly Lys Arg Pro  
 225 230 235 240

Arg Gly Ser Ser Arg Val Asp Leu Gln Ala Cys Lys Leu Gly Ile Phe  
 245 250 255

Val Lys Glu Pro Tyr Phe Cys Gly Val Thr  
 260 265

## REIVINDICACIONES

1. Sustrato escindible de enzima purina nucleósido fosforilasa de *Trichomonas vaginalis* para su uso en la inhibición de una célula cancerosa de mamífero o una célula viralmente infectada en el que dicho sustrato escindible se convierte en análogo de purina citotóxico mediante la proporción de una enzima purina nucleósido fosforilasa de *Trichomonas vaginalis* en proximidad a la célula de mamífero o la célula viralmente infectada en el que el sustrato escindible es 9-(β-D-arabinofuranosil)-2-fluoroadenina (fludarabina) y en el que la enzima purina nucleósido fosforilasa de *Trichomonas vaginalis* tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5 o en el que el sustrato escindible se selecciona del grupo que consiste en 9-(β-D-arabinofuranosil)-2-fluoroadenina (fludarabina), cladribina, 5'-metil(talo)-6-metil-purina-ribósido, 5'-metil(talo)-2'-desoxi-6-metilpurina-ribósido, 5'-metil(alo)-6-metilpurina-ribósido, 2-F-5'-desoxiadenosina y 2-F-α-L-lixo-adenina y en el que un mutante con cola de enzima purina nucleósido fosforilasa de *Trichomonas vaginalis* tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12
2. Sustrato escindible para su uso según la reivindicación 1, en el que se proporciona la enzima mediante la administración de un vector viral que codifica para una secuencia de nucleótidos para dicha enzima expresable en dicha célula.
3. Sustrato escindible para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que se proporciona dicha enzima mediante inyección directa, infección, lipofección o administración biolística de una secuencia de nucleótidos para la enzima expresable en la célula.
4. Sustrato escindible para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se proporciona dicha enzima mediante inyección directa de la enzima próxima a dicha célula.
5. Sustrato escindible para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se proporciona dicha enzima mediante administración a un sujeto de una célula del sujeto modificada para expresar dicha purina nucleósido fosforilasa de *Trichomonas vaginalis* o dicha purina nucleósido fosforilasa mutante con cola.
6. Sustrato escindible para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se proporciona mediante suministro intracelular de una secuencia de nucleótidos expresable que codifica para dicha enzima.
7. Composición seleccionada del grupo que consiste en:
  - 30 una primera composición que comprende una enzima purina nucleósido fosforilasa de *Trichomonas vaginalis* de SEQ ID NO: 5 y un sustrato escindible por dicha enzima para producir un análogo de purina citotóxico, en la que dicho sustrato es 9-(β-D-arabinofuranosil)-2-fluoroadenina (fludarabina), o una enzima purina nucleósido fosforilasa enzima mutante con cola de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12; y
  - 35 una segunda composición que comprende una enzima purina nucleósido fosforilasa mutante con cola de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12 y un sustrato escindible por dicha enzima para producir un análogo de purina citotóxico, en la que dicho sustrato se selecciona del grupo que consiste en 9-(β-D-arabinofuranosil)-2-fluoroadenina (fludarabina), cladribina, 5'-metil(talo)-6-metil-purina-ribósido, 5'-metil(talo)-2'-desoxi-6-metilpurina-ribósido, 5'-metil(alo)-6-metilpurina-ribósido, 2-F-5'-desoxiadenosina y 2-F-α-L-lixo-adenina.
8. Composición según la reivindicación 7, en la que dicha enzima purina nucleósido fosforilasa mutante con cola tiene una cola de entre 10 y 50 residuos de aminoácido.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que dicha cola se trunca entre 0 y 10 residuos de aminoácido de una enzima purina nucleósido fosforilasa silvestre correspondiente.
- 45 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además una proteína viral.
11. Vector que contiene una secuencia de nucleótidos expresable que codifica para una enzima purina nucleósido fosforilasa mutante con cola de SEQ ID NO: 8, 10 ó 12.
12. Vector según la reivindicación 11, en el que dicho vector es un retrovirus, adenovirus, virus de herpes, virus del sarampión, virus adenoasociado o un baculovirus.

Parámetros cinéticos de F-araA con PNP de *E. coli* y *T. vaginalis*

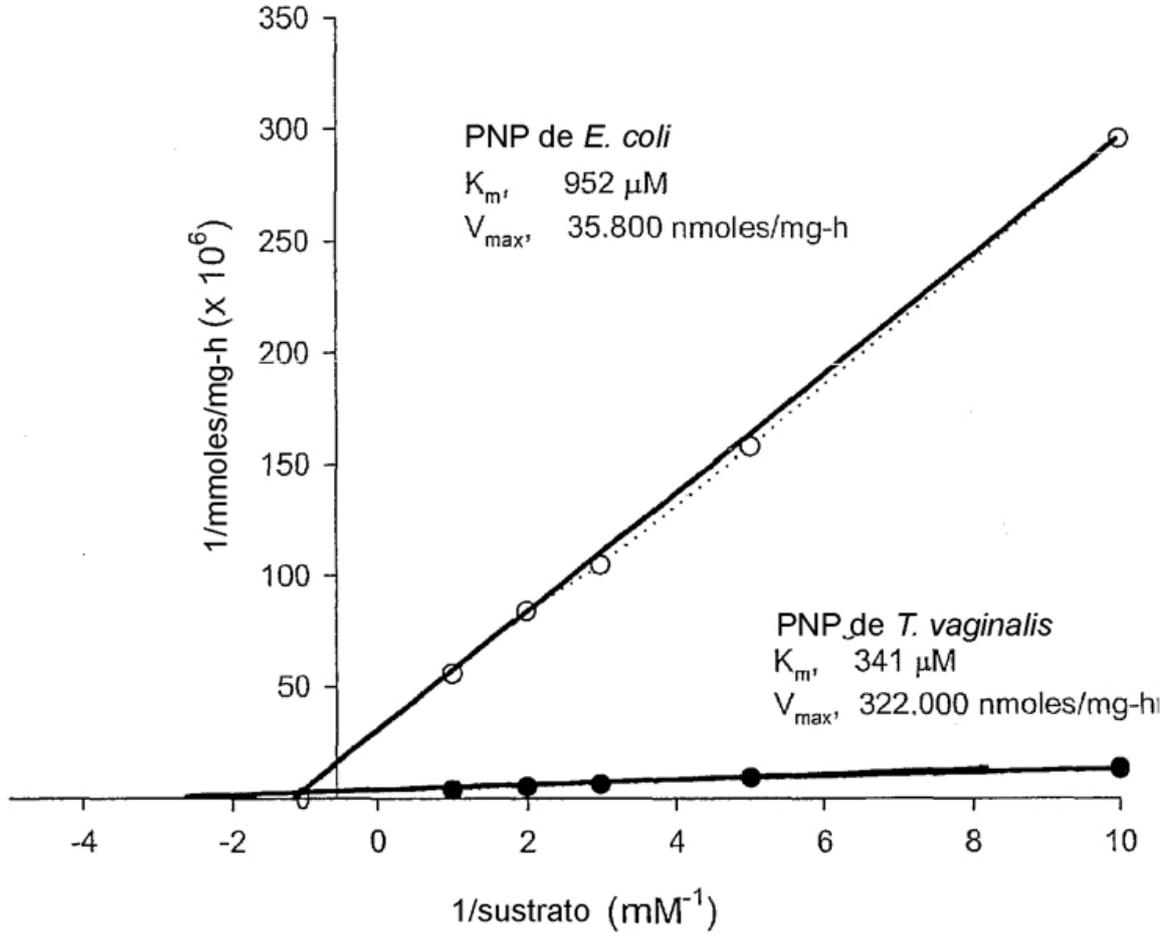


Figura 1

Efecto de F-araAMP sobre el crecimiento de tumor  
D54 en el que el 10% de las células expresan  
Tv PNP PNP376

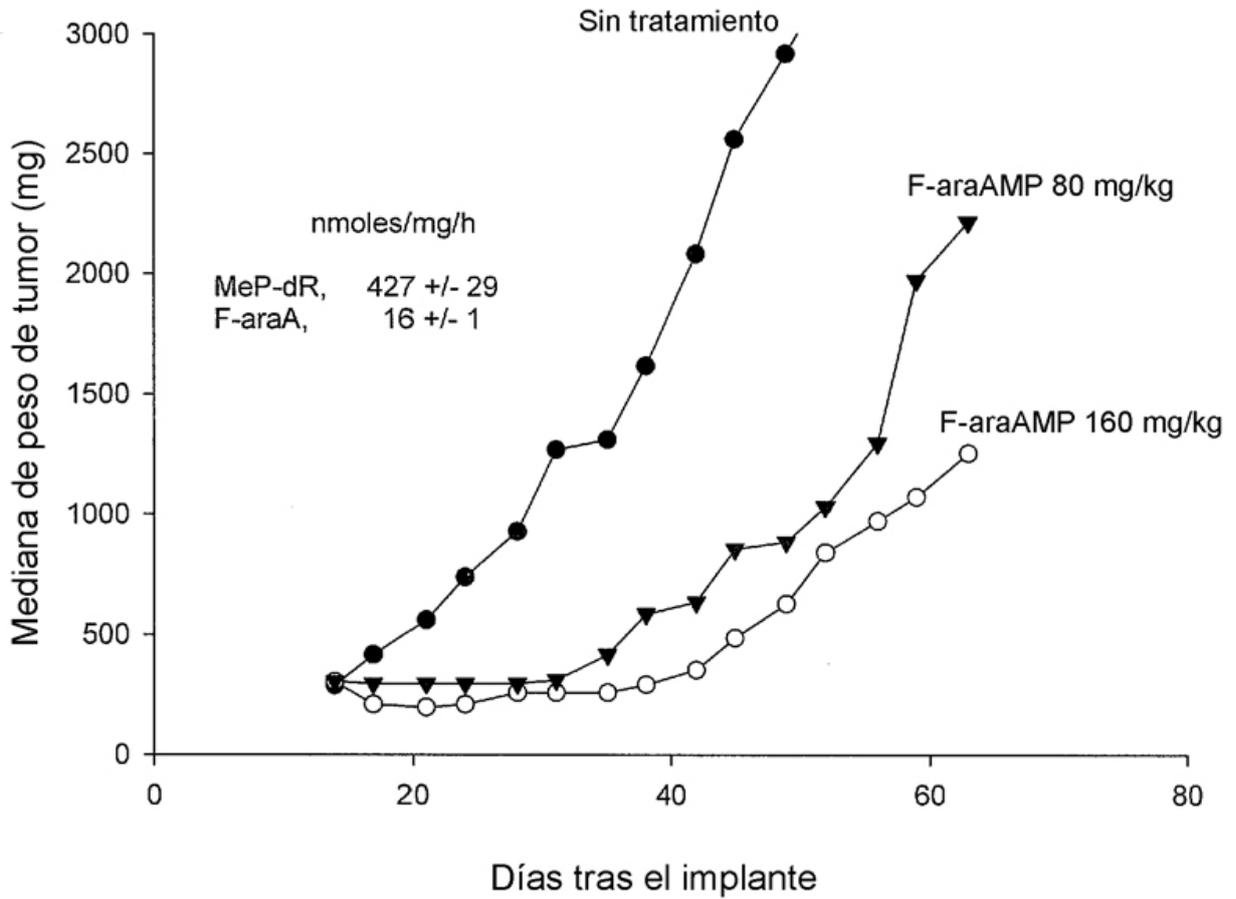


FIG. 2

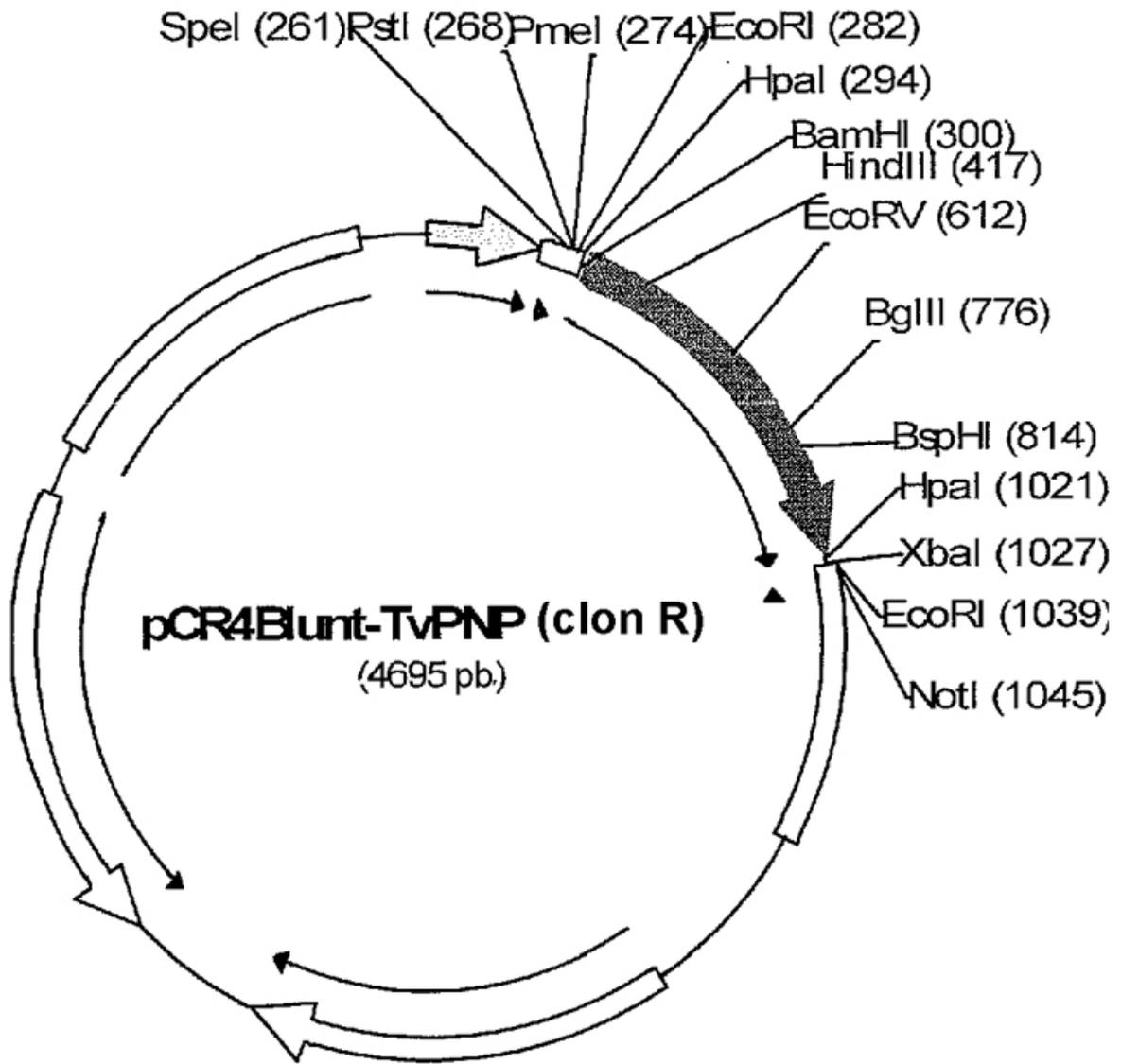


Figura 3

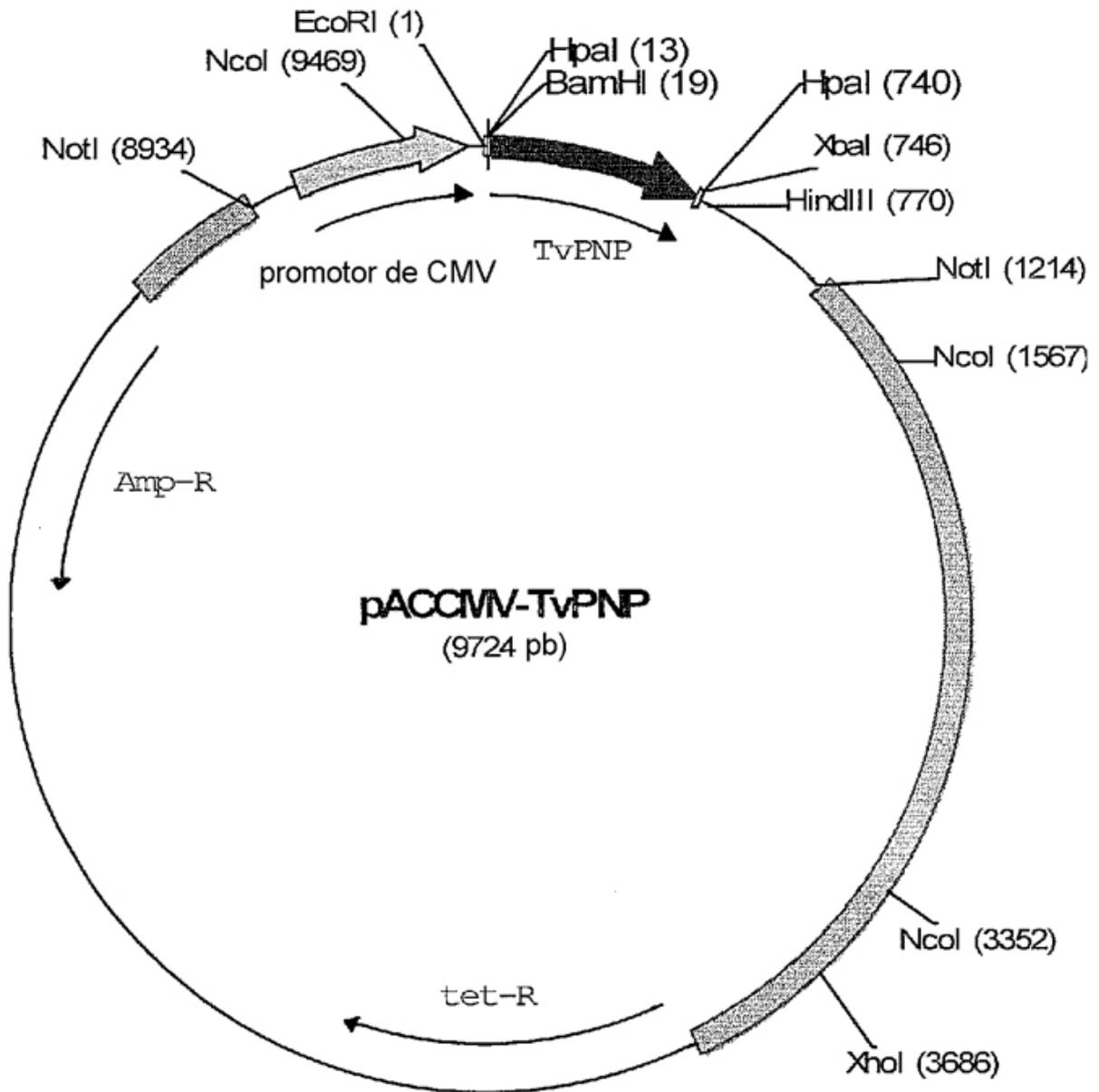


Figura 4

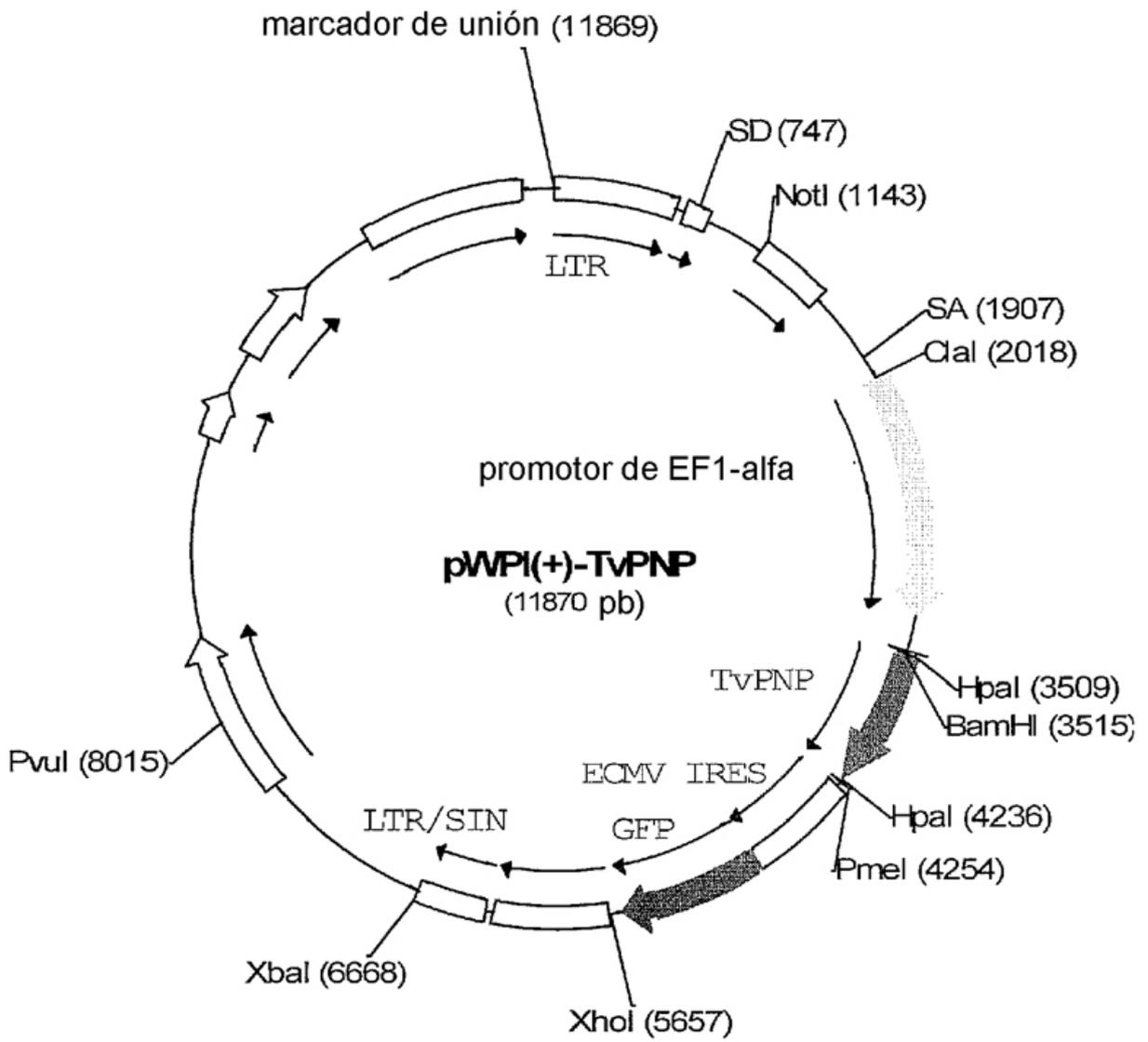


Figura 5

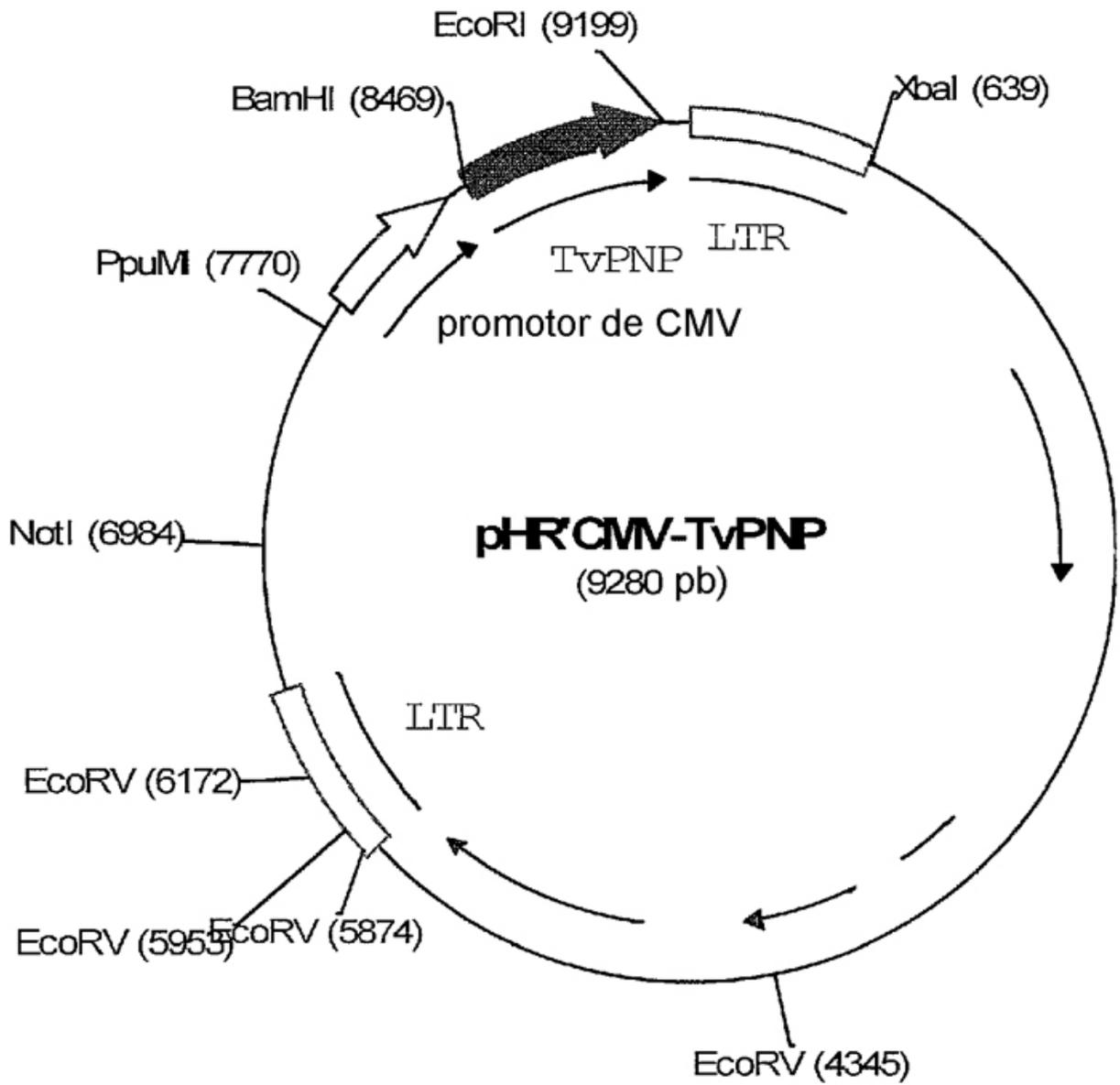


Figura 6

**Fig. 7: PNP codificado en virus de Ad-PNP**

1. Codón de iniciación (ATG) y terminación (TAA): en recuadros
2. Secuencia de PNP de *E. coli* silvestre: subrayado
3. GG TAA en negrita: GAG TAA en secuencia de PNP de *E. coli* silvestre que codifica para Glu+codón de terminación (TAA); una delección de A (desde el 239º codón, ácido glutámico) en Ad-PNP dio como resultado un desplazamiento del marco.
4. Cola de 30 aminoácidos (subrayado doble): cola de 30 aminoácidos añadida en lugar de ácido glutámico

TCTAGGCGGC	CGCGATCTAT	ACATTGAATC	AATATTGGCA	ATTAGCCATA	51
TTAGTCATTG	GTTATATAGC	ATAAATCAAT	ATTGGCTATT	GGCCATTGCA	101
TACGTTGTAT	CTATATCATA	ATATGTACAT	TTATATTGGC	TCATGTCCAA	151
TATGACCGCC	ATGTTGACAT	TGATTATPGA	CTAGTTATTA	ATAGTAATCA	201
ATTACGGGGT	CATTAGITCA	TAGCCCATAT	ATGGAGTTCC	CGGTTACATA	251
ACTTACGGTA	AATGGCCCCG	CTGGCTGAUC	GCCCAACGAC	CCCCGCCAT	301
TGACGTCAAT	AATGACGTAT	GTTCCCATAG	TAACGCCAAT	AGGACTTTC	351
CATTGACGTC	AATGGGIGGA	GTATTTACGG	TAACTGCCC	ACTTGGCAGT	401
ACATCAAGTG	TATCATATGC	CAAGTCCGCC	CCCTATTGAC	GTCAATGACG	451
GTAATGGCC	CGCTGGCAT	TATGCCAGT	ACATGACCTT	ACGGGACTTT	501
CCTACTTGGC	AGTACATCTA	CGTATTAGTC	ATCGCTATTA	CCATGGTGAT	551
GCGGTTTTGG	CAGTACACCA	ATGGGCGTGG	ATAGCGGTTT	GACTCACGGG	601
GATTTCCAAG	TCTCCACCCC	ATTGACGTCA	ATGGGAGTTT	GTTTTGGCAC	651
CAAATCAAC	GGGACITTTCC	AAAATGTCTG	AATAACCCCG	CCCCGTTGAC	701
GCAAATGGGC	GGTAGGCGTG	TACGGTGGGA	GGTCTATATA	AGCAGAGCTC	751
GTTTAGTGAA	CCGTGAGATC	CGGTCCGCC	AATTCGAGCT	CGGTACCCGG	801
GGATCCGGTG	GTGGTGCAA	TCAAAGAACT	GCTCCTCAGT	GGATGTTGCC	851
TTACTTCTA	GGCCTGTACG	GAAGTGTAC	TTCTGCTCTA	AAAGCTGCGG	901
AATTGTACCC	<u>GGGCGCGCAT</u>	<u>G</u> GCTACCCCA	CACATTAATG	CAGAAATGGG	951
CGATTTGCT	<u>GACGTAGTTT</u>	TGATGCCAGG	CGACCCGCTG	CGTGGCAAGT	1001
ATATTTGCTGA	<u>AACTTTCCTT</u>	GAAGATGCC	GTGAAGTGAA	CAACGTTCCG	1051
GGTATGCTGG	<u>GCTTACCCGG</u>	TACTACAAA	GGCCGCAAAA	TTCCGTAAT	1101
CGCTCACGGT	<u>ATGGGTATCC</u>	CGTCTGCTC	CATCTACACC	AAAGAACTGA	1151
TCACCGATTT	<u>CGGCGTGAAG</u>	AAAATTATCC	GCGTGGGTTT	CTGTGGCCCA	1201
GTCTGCGCG	<u>ACGTAAAAC</u>	GCGCGACGTC	GTTATCGGTA	TGGGTGCCTG	1251
CACCGATTCC	<u>AAAGTTAACC</u>	GCATCCGTTT	TAAAGACCAT	GACTTTGCCG	1301
CTATCGCTGA	<u>CTTCGACATG</u>	GTGCGTAACG	CAGTAGATGC	AGCTAAACCA	1351
CTGGGTATTG	<u>ATGCTCGCGT</u>	GGGTAACCTG	TTCTCCGCTG	ACCTCTTCTA	1401
CTCTCCGGAC	<u>GGCGAAATGT</u>	TCGACGTGAT	GGAAAAATAC	GGCATTCTCG	1451
GGTGGAAAT	<u>GGAAGCGGCT</u>	GGTATCTACG	GCGTCGCTGC	AGAATTTGGC	1501
GCGAAAGCCC	<u>TGACCATCTG</u>	CACCGTATCT	GACCACATCC	GCACCTCACGA	1551
GCAGACCACT	<u>GCCGCTGAGC</u>	GTCAGACTAC	CTTCAACGAC	ATGATCAAAA	1601
TGGCACTGGA	<u>ATCCGTTCTG</u>	CTGGGCGATA	<b>AAGGTAAGCG</b>	GCCGCGGGCA	1651
TCCTCTAGAG	<u>TGCACCTGCA</u>	GGCATGCAAG	CTTGGGATCT	TTGTCAAGGA	1701
<u>ACCTTACTTC</u>	<u>TGTGGTGTGA</u>	<u>CA</u> TAAATTGGA	CAAACCTACCT	ACAGAGATTT	1751
AAAGCTCTAA	GGTAAATATA	AAATTTTAA	GTGTATAATG	TGTTAAACTA	1801
CTGATTCTAA	TTGTTTGTGT	ATTTTAGAAT	CACAGTCCCA	AGGCTCATT	1851
CAGGCCCTC	AGTCCCTACA	GTCTGTTTCA	GATCATAATC	AGCCATACCA	1901
CATTTGTAGA	GGTTTACTT	GCTTTAAAA	ACCTCCACA	CCTCCCTG	1951
AACCTGAAAC	ATAAAATGAA	TGCAATTGTT	GTTGTTAACT	TCTTTATTGC	2001
AGCTTATAAT	GGTTACAAAT	AAAGCAATAG	CATCACAAT	TTCACAAATA	2051
AAGCATTTTT	TTCACTGCAT	TCTAGTTGTG	GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	2101
GATCTTATC	ATGTCIGGAT	GCGGCGGCC	TAGA		

**Fig. 8 Nueva secuencia de aminoácidos de PNP en Ad-PNP**

MATPHINAEMGDFADVVLMPGDPLRAKYIAETTFLEDAREVNNVRGMLGFTGTYKGRKISVMGHGMGIPSCSIYTKELITDFGVKKIIRV  
GSCGAVLPHVKLRDVVIGMGACTDSKVNRIREFKDHFPAAIADFDMVRNAVDAAKALGIDARVGNLFSADLFYSPDGEMFDVMEKYGILG  
VEMEAAGIYCVAAEFGAKALTICTVSDHIRTHEQTAAERQTTFNMIKIALESVLLGDK**GKRPRGSSRVDLQACKLGIFVKEPYFCGV**  
T

Secuencia de PNP silvestre en negro

Cola de 30 aminoácidos única en PNP codificada en virus de Ad-PNP: en negrita