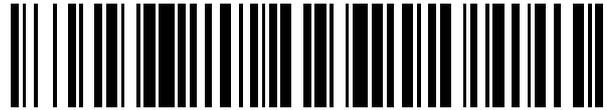


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 516**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/21</b>	(2006.01)
<b>C07K 19/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/62</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/16</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 12184319 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2570425**

54 Título: **Supresiones en el dominio II de la exotoxina A de Pseudomonas que reducen la toxicidad no específica**

30 Prioridad:

**04.09.2007 US 969929 P**  
**03.01.2008 US 18853 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 642 516 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

Supresiones en el dominio II de la exotoxina A de *Pseudomonas* que reducen la toxicidad no específica

Antecedentes de la invención

- 5 En los últimos años se han desarrollado inmunoconjugados como un enfoque terapéutico alternativo para tratar las neoplasias malignas. Los inmunoconjugados se componían originalmente de un anticuerpo químicamente conjugado a una planta o una toxina bacteriana, una forma que se conoce como inmunotoxina. El anticuerpo se une al antígeno expresado en la célula objetivo y la toxina se internaliza causando la muerte celular deteniendo la síntesis proteica e induciendo la apoptosis (Brinkmann, U., Mol. Med. Today, 2: 439-446 (1996)). Más recientemente, se han fusionado los genes que codifican el anticuerpo y la toxina y la inmunotoxina se expresa como una proteína de fusión.
- 10 Se han adaptado una variedad de toxinas vegetales, fúngicas y bacterianas para su uso con inmunotoxinas, incluyendo ricina, toxina diftérica y exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) (Pastan, I. et al., Nat Rev Cancer, 6: 559-565 (2006), Pastan, I. et al., Annu Rev Med, 58: 221-237 (2007)). Las inmunotoxinas basadas en PE están actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de linfomas y leucemias que expresan CD22, así como tumores sólidos que expresan mesotelina (Kreitman, R., et al., J Clin Oncol, 23: 6719-6729 (2005), Hassan, R., Clin Cancer Res, 13: 5144-5149 (2007)).
- 15 Típicamente, se ha truncado o mutado la PE para reducir su toxicidad no específica, mientras que conserva su toxicidad para las células a las que está dirigida por la porción de direccionamiento de la inmunotoxina. A lo largo de los años, se han desarrollado numerosas formas mutadas y truncadas de PE. La que se utiliza en la mayoría de los ensayos clínicos hasta la fecha es una forma truncada de 38 kD denominada "PE38".
- 20 A pesar de estas décadas de esfuerzos, las inmunotoxinas actuales basadas en PE aún no son totalmente satisfactorias. Aunque las inmunotoxinas PE38 que han alcanzado los ensayos clínicos son comparativamente bien toleradas a dosis bajas, las toxicidades limitantes de la dosis han restringido su efecto terapéutico. En un ensayo clínico de fase I de una inmunotoxina basada en PE conocida como LMB-2, las toxicidades limitantes de la dosis por encima de 40 µg/kg administradas cada dos días (QOD) X 3 consistían en elevación de transaminasas, diarrea, cardiomiopatía y una reacción alérgica (Kreitman, RJ et al., J Clin Oncol, 18: 1622-1636 (2000)). En un ensayo clínico de fase I de una inmunotoxina antimmesotelina, denominada SS1P, se encontró que los eventos adversos de pleuritis, urticaria y síndrome de fuga vascular eran limitantes de la dosis (Hassan, R. et al., Clin Cancer Res., 13: 5144-5149 (2007)). En un ensayo de fase I de una tercera inmunotoxina basada en PE, BL22, las toxicidades limitantes de la dosis incluyeron varios casos de síndrome urémico hemolítico y un síndrome de liberación de citoquinas con síndrome de fuga vascular sistémica (Kreitman, RJ et al., J Clin Oncol, 23: 6719-6729 (2005)).
- 25 Además, las inmunotoxinas basadas en PE actualmente en ensayos clínicos son altamente inmunogénicas. Esto ha demostrado no ser un problema en el tratamiento de las neoplasias malignas hematológicas, en las que la capacidad del sistema inmune para montar una respuesta se ve a menudo comprometida. Las inmunotoxinas se pueden administrar típicamente varias veces a pacientes con neoplasias malignas hematológicas. Sin embargo, los pacientes con tumores sólidos usualmente desarrollan anticuerpos neutralizantes frente a inmunotoxinas basadas en PE pocas semanas después de la primera administración. Dado que muchos protocolos requieren un período de tres semanas entre la administración de inmunotoxinas, el desarrollo de los anticuerpos durante este período efectivamente significa que, para los tumores sólidos, usualmente sólo se puede hacer una administración de una inmunotoxina basada en PE antes de que los anticuerpos del paciente la hagan ineficaz. Incluso una administración única de una inmunotoxina basada en PE puede ser muy útil para reducir la carga tumoral del paciente, eliminar las metástasis más pequeñas y aliviar los síntomas, pero la capacidad para administrar múltiples dosis sería claramente útil.
- 30 Además, las inmunotoxinas basadas en PE actualmente en ensayos clínicos son altamente inmunogénicas. Esto ha demostrado no ser un problema en el tratamiento de las neoplasias malignas hematológicas, en las que la capacidad del sistema inmune para montar una respuesta se ve a menudo comprometida. Las inmunotoxinas se pueden administrar típicamente varias veces a pacientes con neoplasias malignas hematológicas. Sin embargo, los pacientes con tumores sólidos usualmente desarrollan anticuerpos neutralizantes frente a inmunotoxinas basadas en PE pocas semanas después de la primera administración. Dado que muchos protocolos requieren un período de tres semanas entre la administración de inmunotoxinas, el desarrollo de los anticuerpos durante este período efectivamente significa que, para los tumores sólidos, usualmente sólo se puede hacer una administración de una inmunotoxina basada en PE antes de que los anticuerpos del paciente la hagan ineficaz. Incluso una administración única de una inmunotoxina basada en PE puede ser muy útil para reducir la carga tumoral del paciente, eliminar las metástasis más pequeñas y aliviar los síntomas, pero la capacidad para administrar múltiples dosis sería claramente útil.
- 35 Se ha desarrollado un número limitado de enfoques para tratar estos problemas. Se reportó un enfoque para reducir la toxicidad no específica, reduciendo el punto isoeléctrico de las regiones marco de Fv usadas como la fracción de direccionamiento de inmunotoxinas, en la solicitud PCT en copropiedad No. PCT/US01/43602, publicada como publicación internacional No. WO 02/40545. Un enfoque para reducir la inmunogenicidad se divulga en la solicitud de patente PCT/US06/028986 en copropiedad, publicada como WO 2007/016150, que informa el mapeo de los diversos epítopos de PE y mutaciones de residuos de aminoácidos individuales que podrían combinarse para reducir la inmunogenicidad total de la molécula de PE resultante en comparación con la de PE38. El documento WO 2008/052322 divulga una forma truncada de exotoxina A de *Pseudomonas* que consiste en los aminoácidos 252 a 608 o una variante de los mismos.
- 40 El documento WO 98/20135 divulga proproteínas de tipo PE activables por proteasa y métodos de utilización de las proproteínas para matar células objetivo. Mansfield et al., Bioconjugate Chemistry, 5: 7: 557-563 (1996) informa que tanto RFB4-PE35KDEL como RFB4-PE35 podrían inhibir el desarrollo de tumores CA46 subcutáneos en ratones desnudos. Onda Masanori et al., Journal of Immunology, 177: 12: 8822-8834 (2006) informa que un número relativamente pequeño de sitios inmunogénicos discretos están asociados con PE38, la mayoría de los cuales pueden eliminarse mediante mutaciones puntuales. No obstante, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la toxicidad limitante de la dosis de la inmunotoxina. Además, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la
- 45 El documento WO 98/20135 divulga proproteínas de tipo PE activables por proteasa y métodos de utilización de las proproteínas para matar células objetivo. Mansfield et al., Bioconjugate Chemistry, 5: 7: 557-563 (1996) informa que tanto RFB4-PE35KDEL como RFB4-PE35 podrían inhibir el desarrollo de tumores CA46 subcutáneos en ratones desnudos. Onda Masanori et al., Journal of Immunology, 177: 12: 8822-8834 (2006) informa que un número relativamente pequeño de sitios inmunogénicos discretos están asociados con PE38, la mayoría de los cuales pueden eliminarse mediante mutaciones puntuales. No obstante, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la toxicidad limitante de la dosis de la inmunotoxina. Además, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la
- 50 El documento WO 98/20135 divulga proproteínas de tipo PE activables por proteasa y métodos de utilización de las proproteínas para matar células objetivo. Mansfield et al., Bioconjugate Chemistry, 5: 7: 557-563 (1996) informa que tanto RFB4-PE35KDEL como RFB4-PE35 podrían inhibir el desarrollo de tumores CA46 subcutáneos en ratones desnudos. Onda Masanori et al., Journal of Immunology, 177: 12: 8822-8834 (2006) informa que un número relativamente pequeño de sitios inmunogénicos discretos están asociados con PE38, la mayoría de los cuales pueden eliminarse mediante mutaciones puntuales. No obstante, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la toxicidad limitante de la dosis de la inmunotoxina. Además, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la
- 55 El documento WO 98/20135 divulga proproteínas de tipo PE activables por proteasa y métodos de utilización de las proproteínas para matar células objetivo. Mansfield et al., Bioconjugate Chemistry, 5: 7: 557-563 (1996) informa que tanto RFB4-PE35KDEL como RFB4-PE35 podrían inhibir el desarrollo de tumores CA46 subcutáneos en ratones desnudos. Onda Masanori et al., Journal of Immunology, 177: 12: 8822-8834 (2006) informa que un número relativamente pequeño de sitios inmunogénicos discretos están asociados con PE38, la mayoría de los cuales pueden eliminarse mediante mutaciones puntuales. No obstante, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la toxicidad limitante de la dosis de la inmunotoxina. Además, sería deseable tener enfoques adicionales para reducir la

inmunogenicidad de PE y de las inmunotoxinas en las que PE actúa como la fracción tóxica. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

Breve resumen de la invención

5 En un primer grupo de realizaciones, la invención proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE"), mutada y aislada, que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula I:



en donde

$n = 0$  o  $1$ , independientemente, para cada  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$ ,

$R^1 = 1$  a  $10$  residuos de amino ácidos

10 FCS = una secuencia de escisión por furina de  $4$  a  $11$  residuos de aminoácidos, cuya secuencia puede ser escindida por furina y tiene un extremo amino y un extremo carboxilo,

$R^2 = 1$  a  $10$  residuos de aminoácidos;

$R^3 = 1$  o más residuos de aminoácidos contiguos de los residuos  $365$  a  $394$  de la SEQ ID NO:  $1$ ; y,

15 Dominio funcional III de PE = residuos  $395$ - $613$  de la SEQ ID NO:  $1$ , que comprende opcionalmente: (i) una sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los residuos  $609$ - $613$  de la SEQ ID NO:  $1$ ; (ii) una sustitución del residuo de aminoácido  $R490$  de la SEQ ID NO:  $1$  por glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina; (iii) una sustitución de uno o más residuos de aminoácidos  $D403$ ,  $R412$ ,  $R27$ ,  $E431$ ,  $R432$ ,  $R458$ ,  $D461$ ,  $R467$ ,  $R505$ ,  $R513$ ,  $R522$ ,  $R538$ ,  $E548$ ,  $R551$ ,  $R576$ ,  $K590$  y  $L597$  de la SEQ ID NO:  $1$ , cuyos residuos de la SEQ ID NO:  $1$  mantienen la inmunogenicidad de un epítipo o un subepítipo del dominio III de PE; o (iv) una combinación de cualquiera de (i)-(iii), y en donde la PE carece de residuos de aminoácidos contiguos  $1$ - $273$  y  $285$ - $364$  como se define mediante referencia a la SEQ ID NO:  $1$ .

20

En algunas realizaciones, la FCS está representada por la Fórmula II:



25 en la que  $P4$  es un residuo de aminoácido en el extremo amino,  $P1$  es un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo,  $P1$  es un residuo de arginina o lisina, y la secuencia de aminoácidos de Fórmula II puede ser escindida en el extremo carboxilo de  $P1$  por furina.

25

30 En algunas realizaciones, la FCS (i) comprende además residuos de aminoácidos representados por  $P6$ - $P5$  en el extremo amino, (ii) comprende además residuos de aminoácidos representados por  $P1$ - $P2'$  en el extremo carboxilo, (iii) en donde  $P1$  es un residuo de arginina o un residuo de lisina,  $P2'$  es triptófano y  $P4$  puede ser arginina, valina o lisina, siempre que si  $P4$  no es arginina, entonces  $P6$  y  $P2$  son residuos básicos, y (iv) dicha secuencia puede ser escindida en el extremo carboxilo de  $P1$  por furina. En algunas realizaciones, la FCS es la SEQ ID NO:  $10$ . En algunas realizaciones, el dominio III funcional de PE consiste en residuos de aminoácidos de los residuos  $395$  a  $613$  de la SEQ ID NO:  $1$ . En algunas realizaciones, la PE mutada comprende uno o más residuos de aminoácidos contiguos de los residuos  $365$ - $394$  de la SEQ ID NO:  $1$  entre la FCS y el dominio III de PE. En algunas realizaciones, " $n$ " es  $0$  para  $R^1$ ,  $R^2$ , y  $R^3$ .

30

35 En un grupo adicional de realizaciones, la invención proporciona moléculas quiméricas que comprenden (a) un ligando, que se une específicamente a un antígeno o receptor sobre una superficie celular, conjugado o fusionado a (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* mutada que comprende una secuencia de la siguiente fórmula:

35



en la que:

$n = 0$  o  $1$  independientemente para cada uno de  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$

40

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

FCS = una secuencia de escisión por furina de  $4$  a  $11$  residuos de aminoácidos, cuya secuencia puede ser escindida por furina y tiene un extremo amino y un extremo carboxilo,

$R^2 = 1$  a 10 residuos de aminoácidos;

$R^3 = 1$  o más residuos de aminoácidos contiguos de los residuos 365 a 394 de la SEQ ID NO: 1; y,

5 dominio funcional III de PE = residuos de aminoácidos 395-613 de la SEQ ID NO: 1, que comprende opcionalmente (i) sustituciones en uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a 609-613 de la SEQ ID NO: 1, (ii) una sustitución del residuo de aminoácido R490 de la SEQ ID NO: 1 con glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina, (iii) una sustitución de uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos seleccionados de D403, R412, R27, E431, R432, R568, R513, R58, R538, R513, R522, R538, E548, R551, R576, K590 y L597 de la SEQ ID NO: 1, cuyos residuos de la SEQ ID NO: 1 mantienen la inmunogenicidad de un epítipo o subepítipo del dominio III de PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i)-(iii), y en donde la molécula quimérica carece de residuos de aminoácidos contiguos 1-273 y 285-364 como se define con referencia a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la FCS puede representarse por la fórmula P4-P3-P2-P1 (SEQ ID NO: 36), en la que P4 designa el extremo amino, P1 designa el extremo carboxilo, P1 es un residuo de arginina y la secuencia puede ser escindida en el extremo carboxilo de P1 por furina. En algunas realizaciones, la FCS (i) comprende además residuos de aminoácidos representados por P6-P5 en dicho extremo amino, (ii) comprende además residuos de aminoácidos representados por P1'-P2' en dicho extremo carboxilo, (iii) adicionalmente en donde P1 es un residuo de arginina, P2' es triptófano y P4 puede ser arginina, valina o lisina, siempre que si P4 no es arginina, entonces P6 y P2 son residuos básicos, y (iv) dicha secuencia puede ser escindida en el extremo carboxilo de P1 por furina. En algunas realizaciones, la FCS es la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el dominio funcional III de PE consiste en la secuencia de residuos 395 a 613 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la PE mutada comprende uno o más residuos contiguos de residuos 365-394 de la SEQ ID NO: 1 entre dicha FCS y dicho dominio III de PE. En algunas realizaciones, "n" es 0 para  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$ . En algunas realizaciones, el ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene capacidad de reconocimiento de antígeno.

25 En aún un grupo adicional de realizaciones, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de células objetivo que tienen un exterior. Los métodos comprenden poner en contacto las células con moléculas quiméricas, que comprenden (a) un ligando que se une específicamente a un antígeno o receptor en el exterior de la célula, cuyo ligando se conjuga o fusiona a (b) una exotoxina A de *Pseudomonas* mutada que comprende una secuencia de la siguiente fórmula:



en la que:

$n = 0$  o 1 independientemente para cada uno de  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$

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

FCS = una secuencia de escisión por furina de 4-11 residuos de aminoácidos, cuya secuencia puede ser escindida por furina y tiene un extremo amino y un extremo carboxilo,

$R^2 = 1$  a 10 residuos de aminoácidos;

$R^3 = 1$  o más residuos de aminoácidos contiguos de los residuos 365 a 394 de la SEQ ID NO: 1; y,

35 el dominio funcional III de PE = residuos 395-613 de la SEQ ID NO: 1, que comprende opcionalmente (i) sustituciones en uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a 609-613 de la SEQ ID NO: 1, (ii) una sustitución del residuo de aminoácido R490 de la SEQ ID NO: 1 con glicina, alanina, valina, leucina, o isoleucina (iii) una sustitución de uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a residuos seleccionados entre D403, R412, R27, E431, R432, R458, R576, R513, R522, R538, E548, R551, R576, K590 y L597 de la SEQ ID NO: 1, cuyos residuos de la SEQ ID NO: 1 mantienen la inmunogenicidad de un epítipo o subepítipo del dominio funcional III de PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i)-(iii), en la que la molécula quimérica carece de residuos de aminoácidos contiguos 1-273 y 285-364 como se define mediante referencia a la SEQ ID NO: 1 y en donde el contacto de la molécula quimérica con la célula inhibe el crecimiento de la célula. En algunas realizaciones, la FCS se puede representar mediante la fórmula P4-P3-P2-P1 (SEQ ID NO: 36), en la que P4 designa el extremo amino, P1 designa el extremo carboxilo, P1 es un residuo de arginina y dicha secuencia puede ser escindida en el extremo carboxilo del P1 por furina. En algunas realizaciones, la FCS (i) comprende además residuos de aminoácidos representados por P6-P5 en dicho extremo amino, (ii) comprende además residuos de aminoácidos representados por P1'-P2' en dicho extremo carboxilo, (iii) adicionalmente en donde P1 es un residuo de arginina, P2' es triptófano y P4 puede ser arginina, valina o lisina, con la condición de que si P4 no es arginina, entonces P6 y P2 son residuos básicos, y (iv) dicha secuencia puede ser escindida en el extremo carboxilo de P1 por furina. En algunas realizaciones, la FCS es la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el dominio funcional III de PE consiste en la secuencia de residuos 395 a 613 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la PE mutada comprende uno o más residuos contiguos de residuos 365-394 de la SEQ ID NO: 1 entre dicha FCS y dicho dominio III

de PE. En algunas realizaciones, el ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene capacidad de reconocimiento de antígeno.

En aún otro grupo de realizaciones, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican las PE mutadas y las moléculas quiméricas descritas anteriormente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica adicionalmente un ligando que se une específicamente a un antígeno o receptor en una superficie celular, cuyo ligando se fusiona directamente o a través de un enlazador peptídico a dicha PE. En algunas realizaciones, el ligando es un anticuerpo o porción del mismo que retiene la capacidad de unión al antígeno.

#### Breve descripción de los dibujos

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

Figura 2. La Figura 2 es un esquema de la estructura del mutante de HA22 "JW008". JW008 es una forma de HA22 que tiene los mismos truncamientos de PE38 que HA22 LR, pero en la que la secuencia nativa de la secuencia escindible por furina de los residuos 274-284 ha sido alterada por sustituciones de dos residuos.

Figura 3. La Figura 3 muestra dibujos esquemáticos de HA22 y de una serie de variantes en las que se introdujeron supresiones en los dominios II y Ib del componente PE38 de HA22 para eliminar sitios de escisión de proteasa lisosomal. Estas cinco proteínas mutantes (M1, M2, M3, M4 y M5) se ilustran usando una vista ampliada de los dominios II y Ib de PE38 para mostrar la extensión de las supresiones (líneas punteadas) y la presencia en M3 y M4 de una mutación puntual de C287S. La numeración de residuos se basa en la localización de aminoácidos en la PE nativa. Las proteínas se purificaron posteriormente y se compararon con HA22 usando un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células Raji. La proteína M5 se denomina también aquí "HA22-LR". La IC<sub>50</sub> (ng/ml) de cada mutante con respecto a la IC<sub>50</sub> de HA22 se presenta como una media de al menos tres experimentos separados.

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

Figura 5. Farmacocinética de HA22-LR. Se inyectaron ratones Balb/C por vía intravenosa con 10 µg de HA22 (•) o HA22-LR (○) y se tomaron muestras de sangre a varios intervalos entre 2 y 60 minutos desde el momento de la inyección. La concentración de inmunotoxina en el suero en los diversos intervalos se determinó mediante ELISA y se ajustó a una única función de decaimiento exponencial. Se indica la semivida (t<sub>1/2</sub>) correspondiente. Cada punto es la concentración de inmunotoxina en el suero de un ratón y la concentración en cada intervalo de tiempo se determinó a partir de al menos dos ratones diferentes.

Figura 6. HA22-LR tiene potente actividad antitumoral. Los ratones SCID con tumores de xenoinjerto CA46 se trataron con QOD X 3 (en los días 6, 8 y 10) por vía intravenosa con PBS (X, línea continua), 0,3 mg/kg de HA22 (○; línea continua), o HA22-LR a 1,0, (•; línea discontinua), 1,75 (•; línea continua), o 2,5 (\*; línea discontinua) mg/kg. Las flechas indican los días en que se administró el tratamiento. El tamaño del tumor se midió en el transcurso de 40 días. Los puntos representan el tamaño medio del tumor de todos los ratones en el grupo de tratamiento. Las barras de error muestran el intervalo de confianza del 95% de cada valor medio.

#### Descripción detallada de la invención

##### Introducción

Durante los últimos veinte años, la endotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") se ha estudiado intensivamente para su uso como la porción tóxica de toxinas dirigidas, tales como inmunotoxinas. La forma más común de PE usada en toxinas dirigidas ha sido una forma de 38 kD conocida como PE38, en la que se ha suprimido la totalidad del dominio I de la

5 toxina, junto con los residuos 365-379 del dominio Ib. PE38 contiene la totalidad de los dominios II y III de la toxina. El dominio II de PE tiene una secuencia reconocida y escindida por una enzima conocida como furina, que está presente en células animales. Las PE que contienen la secuencia de escisión por furina experimentan un procesamiento proteolítico dentro de células objetivo, activando la actividad citotóxica de la toxina. Algunas formas de PE desarrolladas en el pasado intentaron aumentar la actividad eliminando la porción del dominio II secuencia arriba del sitio de escisión por furina, con la esperanza de que esto eliminaría la necesidad de procesamiento proteolítico dentro de células objetivo.

10 Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que las formas de PE pueden elaborarse invirtiendo algunas de las estrategias utilizadas anteriormente para desarrollar las PE para su uso en toxinas dirigidas, y que estas nuevas formas de PE tienen ventajas no proporcionadas por PE previas. Además, sorprendentemente, estas nuevas formas de PE conservan una excelente actividad citotóxica y tienen toxicidad mucho menos no específica en uso *in vivo*. Esta disminución de la toxicidad permite administrar dosis mucho mayores, con un aumento concomitante de la actividad antitumoral.

15 En las nuevas formas de PE, se han suprimido los residuos restantes del dominio Ib (distintos de los necesarios para una buena actividad de ribosilación de ADP), que se pensaba que eran útiles para facilitar la translocación efectiva de la toxina en la célula objetivo después de la activación proteolítica. En segundo lugar, se ha eliminado todo el dominio II excepto para la secuencia de escisión por furina.

20 La eliminación de la mayor parte del dominio II y de todo el dominio Ib proporciona moléculas de PE con una serie de ventajas sobre las formas de PE disponibles anteriormente. En primer lugar, tanto el dominio Ib como el dominio II contienen epítomos que se suman a la inmunogenicidad global de PE. Eliminando todo el dominio II excepto el sitio de escisión por furina y la porción del dominio Ib previamente incluida incluso en PE truncadas, se eliminan tanto los epítomos lineales como conformacionales presentes en los dominios, reduciendo la inmunogenicidad de la PE resultante en comparación con las formas de la toxina que anteriormente estaban disponibles.

25 En segundo lugar, se reduce el tamaño total de la toxina. Las formas estudiadas a modo de ejemplo en el presente trabajo tenían un peso molecular de 25 kD y, por tanto, representan una disminución de aproximadamente 13 kD del tamaño de la forma más común de PE actualmente en uso, PE38. Las moléculas más pequeñas pueden penetrar más profundamente en los tumores sólidos, por lo que generalmente se ha considerado deseable desarrollar formas más pequeñas de la toxina para su uso contra tumores sólidos. El tamaño más pequeño de las PE de la invención en comparación con aquellas previamente disponibles sugiere que resultarán útiles tanto en el tratamiento de tumores sólidos, en los que el tamaño más pequeño de la toxina puede facilitar la penetración del tumor, como en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, en donde el tamaño de la toxina es de menor importancia. Además, se usan PE como las fracciones tóxicas de toxinas dirigidas a células objetivo distintas de las células tumorales. Las toxinas más pequeñas de la invención también deberían ser útiles en el contexto de estas células objetivo.

35 Tercero y, sorprendentemente, en ensayos *in vivo* se demostró que las inmunotoxinas producidas con las toxinas resultantes conservaban buena citotoxicidad para la mayoría de las células objetivo, mientras que tenían una toxicidad notablemente menos no específica en un modelo animal que la inmunotoxina comparable elaborada con PE38. De hecho, mientras que los ratones que portaban tumores de xenoinjerto de una neoplasia maligna hematológica humana, mostraron una respuesta completa cuando se inyectaron con la inmunotoxina múltiples veces a razón de 2,5 mg/kg, no murieron ratones cuando se inyectaron con la inmunotoxina múltiples veces a razón de 5,0 mg/kg (el equivalente a 100 mg por dosis). En comparación, la LD<sub>50</sub> de HA22 en ratones es de aproximadamente 1,3 mg/kg. Estos resultados muestran no sólo que los ratones pueden tolerar dosis de las nuevas inmunotoxinas más de 3 veces que la de una inmunotoxina similar hecha con PE38, pero pueden tolerar dosis al menos dos veces necesarias para inducir una respuesta completa.

40 En cuarto lugar, algunas formas previas de PE en las que se suprimió una porción del dominio II eliminaron el sitio de escisión por furina. Esto eliminó la necesidad de escisión intracelular por furina, pero también hizo más difícil diseñar una molécula funcional. Típicamente, el anticuerpo se unió al dominio III de PE, y tendió a permanecer asociado con la fracción de PE dentro de la célula. En moléculas quiméricas que usan las PE de la presente invención, el anticuerpo u otra fracción de direccionamiento puede unirse secuencia arriba del sitio de escisión por furina y escindir del dominio III de PE una vez dentro de la célula.

45 Tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* se llevaron a cabo en un ejemplo de PE de la invención para comparar sus efectos cuando se hicieron en una inmunotoxina con los de una inmunotoxina similar hecha con PE38. La inmunotoxina de ejemplo elegida para comparación es una inmunotoxina conocida como HA22, que emplea un anticuerpo anti-CD22 fusionado a PE38. Se realizaron comparaciones entre una inmunotoxina en la que el anticuerpo usado en HA22 se fusionó a una de las nuevas PE como toxina (por conveniencia, este constructo se denominará "HA22-LR", donde "LR" se refiere a la resistencia del componente de PE modificado para degradación lisosomal) para HA22 (en el que el mismo anticuerpo se fusiona con PE38). En estudios *in vitro*, la inmunotoxina producida con la nueva PE tenía aproximadamente la misma citotoxicidad que HA22 contra células de varias líneas celulares que expresan CD22. En estudios *in vivo* en un modelo animal, se estimó que la inmunotoxina HA22-LR era menos citotóxica que HA22, la

inmunotoxina producida con PE38. La nueva inmunotoxina, sin embargo, también había reducido significativamente la toxicidad no específica, y podía ser tolerada por los ratones con dosis mucho más altas que HA22, mejorando así el efecto antitumoral del tratamiento y permitiendo una ventana terapéutica más grande entre la dosis máxima tolerada y la necesaria para inducir una respuesta completa.

5 Se han elaborado varias inmunotoxinas utilizando diferentes anticuerpos u otros ligandos como la fracción de direccionamiento, pero utilizando una PE como la fracción de toxina. Se ha sabido que, en algunos casos, la fracción de direccionamiento puede hacer alguna contribución a la toxicidad no específica de una inmunotoxina. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT/US01/43602 en copropiedad, publicada como la publicación internacional No. WO 02/40545, que informa que la toxicidad no específica de algunas inmunotoxinas podría reducirse reduciendo el punto isoelectrónico de las regiones marco de Fv utilizadas como la fracción de direccionamiento. Sin embargo, también ha quedado claro que, en inmunotoxinas y otras moléculas quiméricas que usan PE como fracción de la toxina, el principal contribuyente a la toxicidad no específica es el componente de PE. Por lo tanto, se espera que la toxicidad no específica reducida similar a la observada con respecto a la inmunotoxina HA22-LR en los estudios descritos en la presente memoria resultará también cuando las PE de la invención se usan como la fracción de la toxina de moléculas quiméricas usando como fracción de direccionamiento anticuerpos distintos del anticuerpo usado en HA22 como la fracción de direccionamiento u otros ligandos como la fracción de direccionamiento.

Se realizaron estudios de la citotoxicidad de una inmunotoxina obtenida utilizando un anticuerpo diferente, SS1, que reconoce y se une a la mesotelina, un antígeno presente en las células de muchos cánceres. El anticuerpo SS1 se divulga, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 7.081.518, y se ha probado una inmunotoxina que comprende SS1 fusionada a PE38 (la inmunotoxina se denomina "SS1P") en un ensayo clínico de Fase I. Se elaboró una inmunotoxina usando el anticuerpo SS1 como la fracción de direccionamiento y la forma de PE usada en HA22-LR ("PE-LR") como la fracción de toxina y se ensayaron las dos inmunotoxinas, SS1P y SS1-PE-LR por su citotoxicidad contra una serie de líneas celulares que expresan mesotelina. Las dos inmunotoxinas tenían una actividad comparable frente a varias líneas celulares. La inmunotoxina SS1-PE-LR tenía una actividad notablemente más baja contra algunas líneas celulares en comparación con SS1P. Esto indica que, al igual que la mayoría de los agentes terapéuticos, no todos los cánceres de pacientes u otras células de interés serán susceptibles de tratamiento con una inmunotoxina usando un PE-LR como fracción de la toxina. Si se puede inhibir el crecimiento de células de cualquier cáncer particular u otras células objetivo de interés puede determinarse fácilmente mediante medios estándar, tales como mediante la toma de una biopsia de las células, poniendo en contacto las células con la inmunotoxina que contiene PE-LR y determinando si la inmunotoxina inhibe el crecimiento del cáncer u otras células objetivo en la extensión deseada.

Además, se conocen varios medios para aumentar la citotoxicidad de PE alterando los residuos en el dominio III de la secuencia nativa. Estudios del laboratorio de los presentes inventores hace más de una década determinaron que ciertas secuencias de aminoácidos y repeticiones de estas secuencias podrían ser usadas en lugar de la secuencia nativa de residuos 609-613 de PE para aumentar la citotoxicidad de la PE resultante en comparación con la PE preparada con la secuencia nativa (la secuencia nativa de los residuos 609-613 y mutaciones específicas que aumentan la citotoxicidad se discuten con más detalle más adelante en la sección titulada "exotoxina A de *Pseudomonas*"). Más recientemente, los trabajos de laboratorio de los presentes inventores indicaron que una sustitución de glicina, alanina, valina u otros residuos por la arginina presente en la posición 490 de la secuencia de PE nativa aumentaría la citotoxicidad, siendo la sustitución de la arginina por la alanina particularmente ventajosa. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense publicada No. 2007/0189962; Bang et al., Clin Cancer Res, 11: 1545-1550 (2005). Aunque se espera que las PE de la invención usando la secuencia de dominio nativo III sean útiles por sí mismas, si se desea que la citotoxicidad de la PE pueda aumentarse usando una o más de estas sustituciones o mutaciones. Se puede probar cualquier sustitución o mutación en particular para determinar si conserva la citotoxicidad adecuada para uso *in vitro* y si tiene toxicidad no específica suficientemente baja para uso *in vivo* con ensayos conocidos en la técnica, incluyendo los expuestos en los Ejemplos.

Además, el trabajo previo del laboratorio de los presentes inventores ha mapeado la presencia de epítomos o subepítomos en el dominio III. La unión de anticuerpos que reconocen esos epítomos se puede reducir o eliminar mediante sustituciones de los residuos normalmente presentes en ciertas posiciones. Como se expone en la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos, la unión de estos anticuerpos puede reducirse sustituyendo una alanina, glicina, serina o glutamina por un residuo de aminoácido correspondiente a un residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 1 seleccionado del grupo que consiste en D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590 y L597. Dado que la presencia de estos residuos antes de su sustitución mantiene un epítomo o subepítomo en el dominio III, para facilitar la referencia, los residuos en estas posiciones se pueden denominar como "mantenimiento" de la inmunogenicidad de sus respectivos epítomos o subepítomos, sustituyéndolos con alanina o similares reduce la inmunogenicidad del dominio III de PE resultante del epítomo o subepítomo nativo. Aunque se espera que las PE de la invención usando la secuencia del dominio nativo III sean útiles por sí mismas, por lo tanto, si se desean sustituciones de uno o más de los residuos identificados anteriormente, se puede reducir la inmunogenicidad de las PE de la invención. Se puede probar cualquier sustitución o mutación en particular para determinar si conserva la citotoxicidad adecuada para uso *in vitro* o *in vivo* usando ensayos conocidos en la técnica, incluyendo los expuestos en los Ejemplos.

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

#### Secuencias de furina y escindibles de furina

5 Como se ha informado por Duckert et al., Protein Engineering, Design & Selection 17 (1): 107-112 (2004) (en lo sucesivo, "Duckert et al."), la furina es una enzima en una "familia de serina proteasas dependientes de CA2+ dibásicas y monobásicas evolutivamente conservadas, llamadas proproteína convertasas similares a la subtilisina/kexina. "Id., en la pág. 107. La furina, también conocida como "enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados" o "PACE", es uno de los siete miembros mamíferos de la familia y está implicado en el procesamiento de varias proteínas endógenas humanas. Véase generalmente, por ejemplo, Thomas G, Nat. Rev Mol Cell Biol, (10): 753-66 (2002). Es una proteína asociada a la membrana que se encuentra principalmente en la red trans-Golgi. La secuencia de furina humana se conoce desde principios de los noventa. Véase, por ejemplo, Hatsuzawa, K. et al., J. Biol Chem., 267: 16094-16099 (1992); Molloy, S. et al., J. Biol. Chem., 267: 16396-16402 (1992).

15 El sitio de escisión mínima para la furina es, en el código de una sola letra para los residuos de aminoácidos, R-X-X-R (SEQ ID NO: 6), con escisión que se produce después de la segunda "R". Duckert et al. resume la información disponible sobre las secuencias de 38 proteínas reportadas en la literatura por tener sitios de escisión por furina, incluyendo proteínas de mamíferos, proteínas de bacterias patógenas y proteínas virales. Se informa que 31, o 81%, de los motivos de escisión revisados tenían la secuencia consenso RX-[R/K]-R (SEQ ID NO: 7), de los cuales 11, o 29%, tenían R-X-R-R (SEQ ID NO: 8), y 20, o 52%, eran R-X-K-R (SEQ ID NO: 9). Tres de los motivos de escisión sólo contenían la secuencia de escisión mínima. Duckert et al. alinearon además los motivos e identificaron los residuos encontrados en cada posición en cada furina tanto para el propio motivo de escisión como en los residuos circundantes. La Fig. 1A de Duckert et al. muestra por tamaño relativo los residuos más comúnmente encontrados en cada posición. Por convención, los residuos que rodean el sitio de escisión por furina se enumeran desde el enlace escindible (que se indica típicamente con el símbolo "\*"). Contando hacia el extremo terminal N, los residuos del sustrato se denominan P1, P2, y así sucesivamente, mientras que contando hacia el extremo terminal C, los residuos se designan P1', P2', y así sucesivamente. Véase, por ejemplo, Rockwell, N. C., y J. W. Thorner, Trends Biochem. Sci., 29: 80-87 (2004); Thomas G., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3: 753-766 (2002). Por lo tanto, siguiendo la convención, se puede usar la siguiente secuencia para alinear y numerar los residuos de la secuencia de escisión mínima y los residuos circundantes:

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

30 en la que la secuencia mínima de escisión por furina está numerada como P4-P1. La alineación de Duckert et al. de 38 secuencias escindidas por furina identifica las variaciones permitidas dependiendo de los residuos presentes en diversas posiciones. Por ejemplo, si el residuo en P4 no es un R, que puede ser compensado por tener residuos de arginina o lisina en P2 y P6. Id., en la pág. 109.

35 En PE nativa, la escisión por furina ocurre entre la arginina 279 y la glicina 280 en un bucle rico en arginina situado en el dominio II de la toxina. La secuencia de escisión nativa de furina en el dominio II de PE se expone a continuación (con números que indican las posiciones de los residuos en la secuencia de PE nativa de 613 aminoácidos) y se alinean para mostrar su numeración bajo la convención indicada anteriormente:

274- R H R Q P R G W E Q L -284 (SEQ ID NO:10)

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

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

274- R H R S K R G W E Q L -284 (SEQ ID NO: 11).

Esta secuencia mostró una velocidad de escisión más rápida que la de la secuencia nativa y, cuando se usó en una inmunotoxina de ejemplo (denominada "JW008" por conveniencia de referencia) dio como resultado citotoxicidad para las células objetivo, aproximadamente la misma que aquella de la secuencia nativa.

45 Basándose en esto y en nuestros estudios anteriores, la secuencia de escisión por furina usada para unir la molécula de direccionamiento al dominio III de PE puede ser la secuencia mínima de escisión por furina, R-X-X-R (SEQ ID NO: 6), o cualquiera de las otras secuencias de escisión por furina conocidas en la técnica o permitidas por la Fig. 1A de Duckert et al., con la condición de que, si hay un residuo presente en la posición identificada como P2', debe ser triptófano o, si no es triptófano, no debe ser valina o alanina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia puede ser RKKR (SEQ ID NO: 12), RRRR (SEQ ID NO: 13), RKAR (SEQ ID NO: 14), SRVARS (SEQ ID NO: 15), TSSRKRFRW (SEQ ID NO: 16), o ASRRKARSW (SEQ ID NO: 17).

Como se observa en Duckert et al., un residuo menos favorable que R (principalmente valina) se puede usar en la posición P4 si se compensan por residuos de arginina o lisina en las posiciones P2 y P6, de manera que al menos dos de los tres residuos en P2, P4 y P6 son básicos. Por tanto, en algunas realizaciones, la secuencia escindible de furina es RRVKKRFW (SEQ ID NO: 18), RNVVRRDW (SEQ ID NO: 19), o TRAVRRRSW (SEQ ID NO: 20). El residuo en la posición P1 puede ser la arginina presente en la secuencia nativa, o lisina. Así, una lisina puede sustituirse por la arginina en la posición P1, por ejemplo, en cualquiera de las secuencias expuestas anteriormente.

En algunas realizaciones, la secuencia de la secuencia escindible de furina sigue la secuencia de la secuencia de escisión por furina de PE: R-H-R-Q-P-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO: 10) o una versión truncada de la secuencia nativa, siempre que contenga la secuencia mínima de escisión por furina y escindible por furina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia escindible de furina puede ser R-Q-P-R (SEQ ID NO: 21), R-H-R-Q-P-R-G-W (SEQ ID NO: 22), R-H-R-Q-P-R-G-W-E (SEQ ID NO: 23), H-R-Q-P-R-G-W-E-Q (SEQ ID NO: 24) o R-Q-P-R-G-WE (SEQ ID NO: 25). En algunas realizaciones, la secuencia es R-H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO: 11), o una versión truncada de esta secuencia, siempre que contenga la secuencia mínima de escisión por furina y sea escindible por furina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia escindible de furina puede ser R-SK-R (SEQ ID NO:26), R-H-R-S-K-R-G-W (SEQ ID NO:27), H-R-S-K-R-G-W-E (SEQ ID NO:28), R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO:29), H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEQ ID NO:30), o R-H-R-S-K-R (SEQ ID NO:31). Cualquier secuencia particular escindible por furina puede ser fácilmente probada convirtiéndola en una inmunotoxina con el anticuerpo usado en HA22 y probando la inmunotoxina resultante *in vitro* en una línea celular CD22+. En realizaciones preferidas, las secuencias escindibles por furina no reducen la citotoxicidad de la inmunotoxina resultante por debajo del 10% de la citotoxicidad de aquella de HA22 cuando se ensaya HA22 en la misma línea celular y más preferiblemente no reducen la citotoxicidad de la inmunotoxina resultante por debajo 15%, 20%, 25%, 30% 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o más de la citotoxicidad de HA22 cuando se ensaya HA22 en la misma línea celular, con cada aumento del porcentaje de citotoxicidad siendo más preferido que el precedente.

Si se puede o no escindir cualquier secuencia particular por furina puede determinarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, si se puede escindir o no una secuencia mediante furina se puede ensayar incubando la secuencia con furina en regulador de furina (NaOAc 0,2 M (pH 5,5), CaCl<sub>2</sub> 5 mM) a una relación molar de enzima: sustrato de 1:10 a 25° C durante 16 horas. Estas condiciones han sido previamente establecidas como óptimas para la escisión por furina de PE. Preferiblemente, la furina utilizada es furina humana. La furina humana truncada recombinante está comercialmente disponible, por ejemplo, a través de New England Biolabs (Beverly, MA). Véase también Bravo et al., J Biol Chem, 269 (14): 25830-25837 (1994).

Para mayor claridad, se observa que las PE actualmente en uso, tales como PE38 y PE40, comprenden la secuencia de escisión nativa de furina, y que la secuencia de escisión por furina está conectada al dominio III de PE. Sin embargo, a diferencia de las PE de la invención, la secuencia de escisión por furina de PE38 y PE40 no está conectada directamente al dominio III de estas PE; más bien, están conectados al dominio III a través de (a) 79 residuos del dominio II en el lado del carboxilo del sitio de escisión por furina (residuos 285 a 364 del dominio II; por conveniencia, estos residuos se denominarán los "residuos carboxilo del dominio II"), más (b) los residuos 365-394 de la SEQ ID NO: 1, en el caso de PE40, o los residuos 381-394 de la SEQ ID NO: 1, en el caso de PE38. Como se discute adicionalmente en el presente documento, aunque se considera que el límite estructural del dominio III de PE se inicia en el residuo 405, los análisis funcionales han demostrado que el dominio III requiere un segmento del dominio Ib para retener la actividad de ribosilación de ADP. Por consiguiente, el dominio funcional III se define como los residuos 395-613 de PE, y se prefiere por lo tanto que las toxinas de la invención comprendan los residuos 395-613 de PE, con ciertas variaciones permitidas descritas más adelante. Para facilitar la referencia, las referencias en la presente memoria descriptiva a supresiones del dominio Ib o a la inclusión opcional de algunos residuos contiguos del dominio Ib se refieren a la porción del dominio Ib que consiste en los residuos 365-394, aunque estructuralmente, se entiende que el dominio Ib comprende los residuos 365-399.

Es deseable la supresión de los residuos 365-394 y de los residuos que constituyen el dominio II, distintos de los de la secuencia de escisión por furina, ya que las supresiones eliminan cualquiera de los epítopos inmunogénicos presentes en estas porciones de la molécula de PE. En algunas realizaciones, sin embargo, el profesional puede desear retener algunos o todos los residuos 381-394, normalmente encontrados en PE38, o retener 1-10 residuos en los extremos amino o carboxilo, o ambos, de la secuencia de escisión por furina, con 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 y 1 residuos entre sucesivamente los más preferidos. Típicamente, los residuos a cada lado de la secuencia de escisión por furina son los residuos normalmente presentes en la posición correspondiente de PE (SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, la secuencia de escisión por furina de PE se considera que termina en el residuo 284. Si el profesional desea extender la secuencia al lado del carboxilo en tres residuos, normalmente los residuos elegidos serían los presentes en las posiciones 285-287 de la SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, aunque en realizaciones preferidas, el término "secuencia de escisión por furina" se refiere a una secuencia de 4 a 11 residuos de aminoácidos escindibles por furina (como en la secuencia nativa de escisión por furina de PE, expuesta anteriormente como SEQ ID NO: 10) algunas realizaciones, hace referencia a dicha secuencia, que comprende además 1-10 residuos de aminoácidos posicionados en los extremos amino o carboxilo, o ambos.

5 Como se ha indicado anteriormente, en los PE actualmente en uso como residuos tóxicos, tales como PE38 y PE40, la secuencia de escisión por furina se une al dominio III a través de la secuencia carboxilo (residuos 285-364) del dominio II ya través de los residuos 365- 394 (en PE40) o a través de los residuos 381-394 (en PE38). Por el contrario, en las PE de la invención, una secuencia de escisión por furina (tal como SEQ ID NO: 10, o variantes truncadas o modificadas de la misma) está unida en su extremo terminal carboxilo al dominio III, sin interponerse entre los dos algunos o todos los residuos carboxilo del dominio II, y preferiblemente sin tener entre los dos algunos o todos los residuos 365-394.

Las PE de la descripción se pueden representar por la fórmula:



en la que:

10  $n = 0$  o  $1$  independientemente para cada uno de  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$

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

FCS = una secuencia de escisión por furina de residuos de aminoácidos, secuencia que puede ser escindida por furina y tiene un extremo amino y un extremo carboxilo;

$R^2 = 1$  a 10 residuos de aminoácidos;

15  $R^3 =$  uno o más residuos contiguos 365-394 de la SEQ ID NO: 1; y,

20 Dominio funcional III de PE = residuos 395-613 de la SEQ ID NO: 1, que comprende opcionalmente (i) sustituciones en uno o más residuos que corresponden a 609-613 de la SEQ ID NO: 1, (ii) una sustitución de glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina por arginina en una posición correspondiente a la posición 490 de la SEQ ID NO: 1, (iii) una sustitución de uno o más residuos correspondientes a los residuos de la SEQ ID NO: 1, cuyos residuos de la SEQ ID NO: 1 mantienen inmunogenicidad de un epítipo o subepítipo del dominio III de PE, o (iv) una combinación de cualquiera de (i)-(iii). En algunas realizaciones, al menos uno de  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$ ,  $n$  no es igual a 0. Como se ha indicado, en algunas realizaciones preferidas, se eliminan todos los residuos 365-394; por lo tanto, en estas realizaciones, en el término  $R^3_n$ ,  $n = 0$ . De manera similar, en algunas realizaciones, no hay residuos en el lado amino de la FCS; en estas realizaciones, en el término  $R^1_n$ ,  $n = 0$ . De forma similar, en algunas realizaciones, no hay residuos en el lado carboxilo de la FCS entre los dominios Ib o III de FCS y PE; en estas realizaciones, en el término  $R^2_n$ ,  $n = 0$ . En realizaciones particularmente preferidas, el  $n$  en  $R^1_n$ ,  $R^2_n$ , y  $R^3_n$ , es igual a cero.

#### Definiciones

30 Las unidades, prefijos y símbolos están denotados en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxilo. Los títulos proporcionados en la presente memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención, que se pueden tener en referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente con referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

35 La endotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucarióticas. La secuencia de PE nativa (SEQ ID NO: 1) es bien conocida en la técnica y se expone, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 1 de la patente de Estados Unidos No. 5.602.095. El método de acción y la estructura de PE, así como las modificaciones que resultan en una serie de variantes de PE, se discuten con algún detalle en una sección dedicada a este propósito.

40 Las mutaciones de PE se describen típicamente en la técnica por referencia al residuo de aminoácido presente en una posición particular en la secuencia de 613 aminoácidos de la PE nativa (SEQ ID NO: 1). Esta convención se sigue en esta descripción. Si el residuo de aminoácido presente en una posición particular ha sido sustituido por otro residuo, en oposición, por ejemplo, a ser simplemente suprimido como parte de un truncamiento de la secuencia nativa, se indica exponiendo el presente residuo en la secuencia nativa de PE, y el número de posición, seguido por el residuo de aminoácido con el cual ha sido reemplazado el residuo nativo en la mutación particular en discusión. Así, por ejemplo, el término "R490A" indicaría que la "R" (arginina, en el código estándar de una sola letra) en la posición 490 de la secuencia nativa de PE (SEQ ID NO: 1) ha sido reemplazada por una "A" (alanina, en el código estándar de una sola letra) en la PE mutada en discusión. En forma similar, "K590Q" indicaría que la lisina normalmente presente en la posición 590 de PE ha sido reemplazada por una glutamina. El código estándar de una sola letra para aminoácidos comunes se expone a continuación.

El término "dominio funcional III de PE" se refiere a los residuos 395-613 de PE nativa (la secuencia nativa es la SEQ ID NO: 1). Aunque los límites estructurales del dominio III se han establecido en los residuos 405-613, los análisis funcionales han demostrado que el dominio III requiere un segmento del dominio Ib para retener la actividad ribosilación de ADP (Hwang, J. et al., Cell, 48: 136 (1987), Siegall, CB et al., J. Biol Chem, 264: 14256-14261 (1989)). El dominio funcional III de PE se define por lo tanto por los residuos 395-613 de PE (Kihara, A. y Pastan, I., Bioconjug Chem, 5: 532-538 (1994)).

Se sabe que una variedad de agentes, tales como citoquinas, se unen a receptores específicos sobre superficies de células y pueden usarse para direccionar toxinas a células que portan tales receptores. Por ejemplo, IL-13 se ha utilizado como agente para dirigir toxinas incluyendo formas de PE a células que sobreexpresan el receptor de IL-13. Los anticuerpos se unen a antígenos específicos y son otro tipo de agente utilizado para dirigir las toxinas a las células objetivo deseadas.

El término "ligando" se utiliza aquí para referirse genéricamente a moléculas que se unen específicamente a un receptor o antígeno en una superficie celular. En formas preferidas, el término abarca tanto citoquinas como anticuerpos o fragmentos de los mismos que retienen la capacidad de reconocimiento y unión para el antígeno. En la forma más preferida, el término se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que retienen la capacidad de reconocimiento y unión del antígeno.

El término "toxina dirigida" se refiere a una toxina que está dirigida a las células deseadas mediante un ligando que se une a receptores o antígenos específicos presentes en la superficie de dichas células. El término inmunotoxinas se refiere a un subconjunto de toxinas dirigidas en las que la toxina se dirige a las células deseadas mediante un anticuerpo o fragmento del mismo.

El factor de crecimiento transformante  $\alpha$ , o "TGF $\alpha$ ", es un factor de crecimiento bien conocido que en su forma madura es una proteína de 50 aminoácidos de 5,5 kD. Véase, por ejemplo, Brown, "The epidermal growth factor/transforming growth factor- $\alpha$  family and their receptors". Eur J Gastroenterol Hepatol 7: 914-922 (1995); Soler C., y Carpenter G., Thomson A.W., ed. "The epidermal growth factor (EGF) family". The Cytokine Handbook, 3ra ed., San Diego, CA, (páginas 194-197 (1998)). El TGF $\alpha$  humano recombinante está comercialmente disponible, por ejemplo, a través de Sigma-Aldrich (número de catálogo T7924, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO).

Por conveniencia de referencia, tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos enteros (que también pueden denominarse "intactos"), fragmentos de anticuerpo que retienen la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno, ya sea producidos por la modificación de anticuerpos enteros o sintetizados de nuevo usando métodos de ADN recombinante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, e imitaciones de anticuerpos, a menos que sea requerido por el contexto. El anticuerpo puede ser una IgM, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgD, IgA o IgE.

El término "fragmentos de anticuerpo" significa moléculas que comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; anticuerpos estabilizados con hélice (véase, por ejemplo, Arndt et al., J Mol Biol, 312: 221-228 (2001)), diacuerpos (véase más adelante), moléculas de anticuerpo de cadena sencilla ("scFv", véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.888.773), anticuerpos estabilizados con disulfuro ("dsFv", véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.747.654 y 6.558.672), y anticuerpos del dominio ("dAb", véase, por ejemplo, Holt et al., Trends Biotech, 484-490 (2003), Ghahroudi et al., FEBS Lett., 414: 521-526 (1997), Lauwereys et al., EMBO J, 17: 3512-3520 (1998), Reiter et al., J. Mol Biol., 290: 685-698 (1999), y Davies y Riechmann, Biotechnology, 13: 475-479 (2001)).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio pesado variable ("V<sub>H</sub>" o "VH") conectado a un dominio ligero variable ("V<sub>L</sub>" o "VL") en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos y su producción se divulgan más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6444 (1993).

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

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

- El término "péptido enlazador" incluye referencia a un péptido dentro de un fragmento de unión a anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente el dominio variable de la cadena pesada al dominio variable de la cadena ligera.
- 5 El término "anticuerpo parental" significa cualquier anticuerpo de interés que debe ser mutado o variado para obtener anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unan al mismo epítipo que el anticuerpo parental, pero con mayor afinidad.
- 10 El término "sitio activo" significa una porción de una secuencia de nucleótidos de una CDR o de una región marco de un dominio variable que es un sitio de variación natural particularmente alta. Aunque las CDR son consideradas ellas mismas como regiones de hipervariabilidad, se ha aprendido que las mutaciones no están uniformemente distribuidas a través de las CDR. Sitios particulares, o sitios activos, han sido identificados como esos lugares que experimentan mutaciones concentradas. Los sitios activos se caracterizan por una serie de características estructurales y secuencias. Estos "motivos de sitio activo" se pueden utilizar para identificar sitios activos. Dos motivos de secuencias de consenso que están especialmente bien caracterizados son la secuencia tetranucleotídica RGYW y la secuencia de serina AGY, donde R es A o G, Y es C o T y W es A o T.
- 15 Una "fracción de direccionamiento" es la porción de un inmunocombinado destinado a dirigir el inmunocombinado a una célula de interés. Típicamente, la fracción de direccionamiento es un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo que retiene la capacidad de reconocimiento de antígeno, tal como una scFv, una dsFv, una Fab, o una F(ab')<sub>2</sub>.
- 20 Típicamente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como "dominios"). Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Se han definido la extensión de la región marco y las CDR. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constitutivas, sirve para posicionar y alinear las CDR en un espacio tridimensional.
- 25 Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente partiendo del extremo terminal N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que está localizada la CDR particular. Por lo tanto, una CDR3 de V<sub>H</sub> está localizada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V<sub>L</sub> es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.
- 30 La frase "enlace disulfuro" o "enlace disulfuro de cisteína-cisteína" se refiere a una interacción covalente entre dos cisteínas en las que los átomos de azufre de las cisteínas se oxidan para formar un enlace disulfuro. La energía de enlace media de un enlace disulfuro es aproximadamente de 60 kcal/mol en comparación con 1-2 kcal/mol para un enlace de hidrógeno.
- 35 La frase "Fv estabilizado por disulfuro" o "dsFv" se refiere a la región variable de una inmunoglobulina en la que hay un enlace disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada. En el contexto de esta invención, las cisteínas que forman el enlace disulfuro están dentro de las regiones marco de las cadenas de anticuerpo y sirven para estabilizar la conformación del anticuerpo. Típicamente, el anticuerpo es modificado genéticamente para introducir cisteínas en la región marco en las posiciones donde la sustitución no interferirá con la unión del antígeno.
- 40 Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede ser generado por métodos recombinantes tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, véase, por ejemplo, Huse et al., Science, 246: 1275-1281 (1989); Ward, et al., Nature, 341: 544-546 (1989); y Vaughan et al., Nature Biotech., 14: 309-314 (1996), o mediante la inmunización de un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno.
- 45 Una "fracción tóxica" es la porción de una inmunotoxina que hace que la inmunotoxina sea citotóxica para las células de interés.
- Una "fracción terapéutica" es la porción de un inmunocombinado destinado a actuar como un agente terapéutico.
- 50 El término "agente terapéutico" incluye cualquier número de compuestos actualmente conocidos o desarrollados posteriormente para actuar como antineoplásicos, antiinflamatorios, citoquinas, antiinfecciosos, activadores o inhibidores enzimáticos, modificadores alostéricos, antibióticos u otros agentes administrados para inducir un efecto terapéutico deseado en un paciente. El agente terapéutico puede ser también una toxina o un radioisótopo, donde el efecto terapéutico deseado es, por ejemplo, la muerte de una célula cancerosa.

Un "marcador detectable" significa, con respecto a un inmunocombinado, una porción del inmunocombinado que tiene una propiedad que hace que su presencia sea detectable. Por ejemplo, el inmunocombinado puede marcarse con un isótopo radiactivo que permite que las células en las que el inmunocombinado esté presente sean detectadas en ensayos inmunohistoquímicos.

5 El término "fracción efectora" significa la porción de un inmunocombinado destinado a tener un efecto sobre una célula dirigida por la fracción de direccionamiento o para identificar la presencia del inmunocombinado. De este modo, la fracción efectora puede ser, por ejemplo, una fracción terapéutica, una toxina, un marcador radiactivo o un marcador fluorescente.

10 El término "inmunocombinado" incluye referencia a un enlace covalente de una molécula efectora con un anticuerpo. La molécula efectora puede ser una toxina.

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad eficaz para" o "cantidad terapéuticamente eficaz" incluyen referencia a una dosificación de un agente terapéutico suficiente para producir un resultado deseado, tal como inhibir la síntesis de proteínas celulares en al menos 50%, o la muerte de la célula.

15 El término "toxina" incluye referencia a abrina, ricina, endotoxina A de *Pseudomonas* (PE), toxina diftérica (DT), toxina botulínica, o toxinas modificadas de las mismas. Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que típicamente causan la muerte a través de la toxicidad hepática. Sin embargo, típicamente se modifican PE y DT para su uso como una inmunotoxina eliminando el componente de direccionamiento nativo de la toxina (por ejemplo, el dominio la de PE o la cadena B de DT) y reemplazándolo por una fracción de direccionamiento diferente, tal como un anticuerpo.

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

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

25 Tal como se usa en la presente memoria, "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente e incluyen referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales. Los términos también se aplican a polímeros que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos de tal manera que la proteína permanece funcional.

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

Los aminoácidos y análogos a los que se hace referencia en la presente invención se divulgan mediante designaciones abreviadas como se indica en la Tabla A:

Tabla A: Nomenclatura de Aminoácidos

Nombre	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido Glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q

Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Homoserina	Hse	Ho
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Sulfóxido de metionina	Met (O)	-
Metionina metilsulfonio	Met (S-Me)	-
Norleucina	Nle	-
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

5 Una "sustitución conservadora", cuando se describe una proteína se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera sustancialmente la actividad de la proteína. Por lo tanto, las "variaciones modificadas conservadoramente" de una secuencia de aminoácidos particular se refiere a sustituciones de aminoácidos de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad de la proteína o sustitución de aminoácidos con otros aminoácidos que tienen propiedades similares (por ejemplo, acidez, basicidad, cargados en forma negativa o positiva, polares o no polares, etc.) de manera que las sustituciones de aminoácidos incluso críticos no alteren sustancialmente la actividad. Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los siguientes seis grupos de la Tabla B contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

Tabla B

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

Véase también Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W.H. Freeman and Company, Nueva York (2ª edición, 1992).

5 Los términos "sustancialmente similar" en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos 90%, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de 10-20 aminoácidos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que está presente la misma base de ácido nucleico o residuo de aminoácido en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

15 Los términos "unión", "conjugación", "conexión", "unión con" o "enlace" se refieren a la elaboración de dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua. En el contexto de la presente invención, los términos incluyen referencia a la unión de una fracción de anticuerpo a una PE de la invención. El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. Medio químico se refiere a una reacción entre la fracción de anticuerpo y la molécula de PE de tal manera que existe una unión covalente formada entre las dos moléculas para formar una molécula.

20 Tal como se usa en la presente memoria, "recombinante" incluye referencia a una proteína producida usando células que no tienen, en su estado nativo, una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante porque han sido alteradas genéticamente por la introducción de la secuencia de ácido nucleico aislada apropiada. El término también incluye referencia a una célula, o ácido nucleico, o vector, que ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la alteración de un ácido nucleico nativo a una forma no nativa de esa célula, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, expresan mutantes de genes que se encuentran dentro de la forma nativa o expresan genes nativos que de otro modo se expresan anormalmente, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

25 Tal como se usa en la presente memoria, "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" incluye referencia a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma de cadena sencilla o doble, y a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con nucleótidos ácidos de una manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular incluye su secuencia complementaria, así como variantes conservadoras, es decir, ácidos nucleicos presentes en posiciones oscilantes de codones y variantes que, cuando se traducen en una proteína, dan como resultado una sustitución conservadora de un aminoácido.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la "codificación" con respecto a un ácido nucleico especificado, incluye referencia a ácidos nucleicos que comprenden la información para traducción en la proteína especificada. La información se especifica mediante el uso de codones. Típicamente, la secuencia de aminoácidos está codificada por el ácido nucleico usando el código genético "universal". Sin embargo, pueden usarse las variantes del código universal, tal como está presente en algunas mitocondrias vegetales, animales y fúngicas, la bacteria *Mycoplasma capricolum* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 2306-2309 (1985)), o el macronúcleo ciliado, cuando el ácido nucleico se expresa en el uso de la maquinaria de traducción de estos organismos.

35 La frase "fusionar en marco" se refiere a unir dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de manera que la secuencia de ácido nucleico unida se traduce en una proteína de cadena sencilla que comprende las cadenas polipeptídicas originales.

40 Tal como se usa en la presente memoria, "expresado" incluye referencia a la traducción de un ácido nucleico en una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o ser secretadas en la matriz o medio extracelular.

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

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

55 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y se alinean para la

máxima correspondencia, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual.

La frase "sustancialmente idéntico", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 60%, más preferiblemente 65%, aún más preferiblemente 70%, aún más preferiblemente 75%, incluso más preferiblemente 80%, y lo más preferiblemente 90-95% de identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Preferiblemente, existe identidad sustancial sobre una región de las secuencias que es al menos aproximadamente de 50 residuos de longitud, más preferiblemente sobre una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y lo más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 residuos. En una realización más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las regiones de codificación.

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

La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual (véase en general, *Current Protocols in Molecular Biology*, FM Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (1995 Suplemento) (Ausubel)).

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990) y Altschul et al. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1977), respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible en forma pública a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología (disponible en Internet ingresando a "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>"). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen algún puntaje de umbral T de valor positivo cuando están alineadas con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul et al, citado más arriba). Estos aciertos iniciales de la palabra vecina actúan como semillas para comenzar las búsquedas para encontrar HSP más largas que las contienen. Los aciertos de palabra se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, en la medida en que la puntuación de alineación acumulativa puede ser aumentada. Los puntajes acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes, siempre > 0) y N (puntuación de penalización para los residuos que no coinciden, siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada va hasta cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 10915 (1989)).

Además del cálculo del porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST realiza también un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y lo más preferible menor que aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico reacciona de forma inmunológicamente cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente

sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se divulga a continuación.

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

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

10 Tal como se usa en la presente memoria, las "células de mamífero" incluyen referencia a células derivadas de mamíferos incluyendo humanos, ratas, ratones, cobayas, chimpancés o macacos. Las células pueden ser cultivadas *in vivo* o *in vitro*.

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

30 El término "condiciones inmunológicamente reactivas" incluye la referencia a condiciones que permiten que un anticuerpo generado para un epítipo particular se una a ese epítipo hasta un grado mayor en forma detectable que, y/o a la exclusión sustancial de, la unión a sustancialmente todos los otros epítipos. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión al anticuerpo y típicamente son aquellas utilizadas en protocolos de inmunoensayo o aquellas condiciones encontradas *in vivo*. Véase Harlow & Lane, citado más arriba, para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo. Preferentemente, las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los métodos de la presente invención son "condiciones fisiológicas" que incluyen referencia a  
35 condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas dentro de un mamífero vivo o una célula de mamífero. Aunque se reconoce que algunos órganos están sometidos a condiciones extremas, el entorno dentro del organismo e intracelular se sitúa normalmente alrededor de pH 7 (es decir, de pH 6,0 a pH 8,0, más típicamente de pH 6,5 a 7,5), contiene agua como disolvente predominante, y existe a una temperatura por encima de 0°C y por debajo de 50°C. La osmolaridad está dentro del intervalo que es favorable a la viabilidad celular y proliferación.

40 Exotoxina A de *Pseudomonas*

La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas. La secuencia de PE nativa (SEQ ID NO: 1) es bien conocida y se expone, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 1 de la patente de Estados Unidos No. 5.602.095. El método de acción es la inactivación de la ribosilación de ADP del factor de elongación 2 (EF-2).

45 La PE se ha estudiado durante más de 20 años para su uso como agente terapéutico. La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan en conjunto para causar citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) media la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación en el citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media la ribosilación de ADP del factor de elongación 2. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) permanece indefinida, aunque se ha sabido que una gran parte de él, los aminoácidos 365-380, se pueden  
50 eliminar sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall et al., J Biol Chem, 264: 14256-14261 (1989).

55 Los términos "exotoxina de *Pseudomonas*" y "PE", tal como se usan aquí, se refieren típicamente a una PE que ha sido modificada a partir de la proteína nativa para reducir la unión y absorción a través de LRP1/CD91 (el receptor de superficie celular unido a la toxina de longitud completa), para eliminar problemas de plegado, o para reducir la toxicidad no específica. Numerosas de tales modificaciones son conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, eliminación del dominio Ia, varias supresiones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de aminoácidos

individuales y la adición de una o más secuencias en el extremo terminal carboxilo tal como KDEL (SEQ ID NO: 2) y REDL (SEQ ID NO: 3). Véase Siegall et al., citado más arriba. Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen aquellos que son citotóxicos con o sin posterior procesamiento proteolítico o de otro tipo en la célula objetivo (por ejemplo, como una proteína o preproteína).

5 Ciertos fragmentos citotóxicos de PE son conocidos en la técnica y a menudo se referencian por el peso molecular del fragmento, que designa para la persona experta en la técnica la composición particular del fragmento de PE. Por ejemplo, la PE40 fue uno de los primeros fragmentos que se estudió y utilizó como la porción tóxica de las inmunotoxinas. El término designa una forma truncada de PE en la que el dominio I, el dominio responsable de la unión no específica. Véase, por ejemplo, Pai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3358-3362 (1991); y Kondo et al., J. Biol. Chem., 263: 9470-9475 (1988). Sin embargo, la eliminación de la unión no específica también puede lograrse mediante la mutación de ciertos residuos del dominio Ia. La patente de Estados Unidos No. 5.512.658, por ejemplo, divulga que una PE mutada en la que está presente el dominio Ia, pero en el que los residuos básicos del dominio Ia en las posiciones 57, 246, 247 y 249 se sustituyen por residuos ácidos (ácido glutámico, o "E") presenta una citotoxicidad no específica muy reducida. Esta forma mutante de PE se conoce a veces como "PE4E".

15 El término "PE38" se refiere a un fragmento citotóxico de PE compuesto de los aminoácidos 253-364 y 381-613 de PE y que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kD. Contiene los dominios de translocación y ribosilación de ADP de PE, pero no la porción de unión a la célula (Hwang J. et al., Cell, 48: 129-136 (1987)). PE38 es una proproteína que se activa a su forma citotóxica tras el procesamiento dentro de una célula (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.608.039, y Pastan et al., Biochim, Biophys Acta, 1333: C1-C6 (1997)). La secuencia de PE38 es bien conocida en la técnica, pero también puede ser determinada fácilmente por el profesional restando los residuos indicados de la secuencia conocida de PE. Las personas expertas en la materia serán conscientes de que, debido a la degeneración del código genético, la secuencia de aminoácidos de PE38, de sus variantes, tales como PE38KDEL o PE38QQR, y de los otros derivados de PE discutidos en la presente memoria pueden codificarse mediante una gran variedad de secuencias de ácido nucleico, cualquiera de las cuales puede expresarse para dar como resultado el polipéptido deseado.

"PE35" es un fragmento del terminal carboxilo de 35 kD de PE en el que se han suprimido los residuos de aminoácidos 1-279 y la molécula comienza con una metionina en la posición 280, seguido de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de PE nativa. PE35 y PE40 se divulgan en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.602.095 y 4.892.827.

30 Los estudios también determinaron que las mutaciones de los residuos terminales de PE, REDLK (SEQ ID NO: 5, residuos 609-613) podrían variarse de formas que aumentarían la citotoxicidad del mutante resultante. Por ejemplo, las inmunotoxinas producidas con PE mutadas que terminan en las secuencias KDEL (SEQ ID NO: 2), REEL (SEQ ID NO: 32) o RDEL (SEQ ID NO: 3) eran mucho más citotóxicas para las células objetivo que las inmunotoxinas con PE38 que portan la secuencia terminal nativa. Véase, Kreitman y Pastan, Biochem J, 307 (Pt 1): 29-37 (1995). También se pueden usar repeticiones de estas secuencias. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.854.044; 5.821.238; y 5.602.095 y la publicación internacional WO 99/51643. Mientras que las PE que terminan en KDEL (SEQ ID NO: 2) son útiles para los propósitos *in vitro*, demostraron tener toxicidad no específica en animales y son menos preferidas para uso *in vivo*.

40 En una realización preferida, el fragmento citotóxico de PE retiene al menos aproximadamente 10%, preferiblemente al menos aproximadamente 40%, más preferiblemente aproximadamente 50%, aún más preferiblemente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y aún más preferiblemente 95% de la citotoxicidad de PE38. En realizaciones particularmente preferidas, el fragmento citotóxico tiene al menos la citotoxicidad de PE38, y preferiblemente tiene más.

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

45 Se entiende que la secuencia de PE nativa y las variantes discutidas anteriormente pueden tener sustituciones conservadoras y retener capacidad citotóxica y, deseablemente, una antigenicidad reducida en comparación con la secuencia nativa de PE. En realizaciones preferidas, las variantes modificadas de PE o fragmentos citotóxicos de las mismas tienen al menos 80% de similitud de secuencia, preferiblemente al menos 85% de similitud de secuencia, más preferiblemente al menos 90% de similitud de secuencia y más preferiblemente al menos 95% de similitud de secuencia al nivel de aminoácidos, con la PE de interés, tal como PE38.

50 El término "variantes modificadas conservativamente" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes conservativamente modificadas se refieren a aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o si el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias de ácido nucleico esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos al aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un

5 codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservadoramente modificadas. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente memoria que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG y TGG, que habitualmente son los únicos codones para metionina y triptófano, respectivamente) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

10 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, añade o suprime un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservadoramente" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar.

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

15 Las exotoxinas de *Pseudomonas* empleadas en la invención pueden ensayarse para el nivel deseado de citotoxicidad mediante ensayos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, los fragmentos citotóxicos de PE y las variantes conservativamente modificadas de tales fragmentos pueden ser fácilmente analizados para determinar la citotoxicidad. Un gran número de moléculas candidatas PE pueden ensayarse simultáneamente para determinar la citotoxicidad por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los subgrupos de las moléculas candidatas se pueden ensayar en cuanto a citotoxicidad. Los subgrupos que reaccionan positivamente de las moléculas candidatas 20 pueden subdividirse continuamente y volver a ensayarse hasta que se identifique el fragmento o fragmentos citotóxicos deseados. Tales métodos permiten la detección rápida de gran número de fragmentos citotóxicos o variantes conservadoras de PE. La antigenicidad se puede ensayar, por ejemplo, mediante los métodos descritos en los Ejemplos.

#### C. Conjugación con una molécula de direccionamiento

25 En las realizaciones no recombinantes de la invención, una molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo, está unida a una molécula de PE de la presente invención usando cualquier cantidad de medios conocidos por los expertos en la técnica. Pueden usarse tanto medios de unión covalentes como no covalentes con moléculas de PE de la presente invención. El procedimiento para unir una molécula de PE a un anticuerpo u otra molécula de direccionamiento ("TM") variará de acuerdo con la estructura química de la TM. Los polipéptidos contienen típicamente una diversidad de grupos funcionales; por ejemplo, ácido carboxílico (COOH), grupos amina libre (-NH<sub>2</sub>) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado sobre un anticuerpo, por ejemplo, para dar lugar a la unión de la molécula de PE. 30

Alternativamente, se forma un derivado del anticuerpo u otra TM para exponer o para fijar grupos funcionales reactivos adicionales. La formación de derivados puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazadoras, tales como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois. 35

#### Producción de inmunoconjugados

40 Los inmunoconjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas en las que existe un enlace covalente de una molécula de PE con un anticuerpo u otro agente de direccionamiento. La elección de un agente de direccionamiento en particular depende de la célula particular a la cual es dirigida. Con las moléculas de PE proporcionadas en este documento, un experto puede construir fácilmente una variedad de clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en secuencia pero que codifican la misma secuencia de PE y anticuerpo. Por lo tanto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y conjugados de PE y proteínas de fusión de los mismos.

#### A. Métodos recombinantes

45 Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método adecuado que incluya, por ejemplo, la clonación de secuencias apropiadas o mediante síntesis química directa por métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang et al., Meth. Enzymol., 68: 90-99 (1979); el método de fosfodiéster de Brown et al., Meth. Enzymol., 68: 109-151 (1979); el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859-1862. (1981); el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts., 22 (20): 1859-1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado como se describe, por ejemplo, en Needham-VanDevanter et al., Nucl. Acids Res., 12: 6159-6186 (1984); y, el método de soporte sólido de la patente de Estados Unidos No. 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este puede convertirse en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena única como plantilla. Un experto reconocerá que mientras que la síntesis química de ADN está limitada a 50

secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

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

15 Los ácidos nucleicos que codifican PE nativa también pueden modificarse para formar los inmunoconjugados de la presente invención. La modificación por mutagénesis dirigida a un sitio es bien conocida en la técnica. Los ácidos nucleicos que codifican PE pueden amplificarse por medio de métodos *in vitro*. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia autosostenido (3SR). Una amplia variedad de métodos de clonación, células huésped y metodologías de amplificación *in vitro* son bien conocidas por las personas expertas.

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

25 Una vez que los ácidos nucleicos que codifican una PE, un anticuerpo o un inmunoconjugado de la presente invención se aíslan y se clonan, se puede expresar la proteína deseada en una célula modificada en forma recombinante tal como células de bacterias, plantas, levaduras, insectos y de mamífero. Se espera que los expertos en la técnica estén bien informados en los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levadura y varias células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y de mieloma. No se intentará describir en detalle los diversos métodos conocidos para la expresión de proteínas en procariontes o eucariotas. En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican las proteínas aisladas de la invención se logrará típicamente uniendo operativamente el ADN o ADNc a un promotor (que sea constitutivo o inducible), seguido de la incorporación en un casete de expresión. Los casetes pueden ser adecuados para replicación e integración en procariontes o eucariotas. Los casetes de expresión típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Para obtener una expresión de alto nivel de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli* esto incluye un promotor tal como los promotores T7, trp, lac, o lambda, un sitio de unión al ribosoma y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y preferiblemente un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias donadoras y aceptoras de empalme. Los casetes de la invención se pueden transferir a la célula huésped elegida por métodos bien conocidos tales como transformación de cloruro de calcio o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para células de mamífero. Las células transformadas por los casetes pueden seleccionarse por resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los casetes, tales como los genes amp, gpt, neo e hyg.

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

Además de los métodos recombinantes, los inmunoconjugados y las PE de la presente invención también pueden construirse total o parcialmente usando síntesis estándar de péptidos. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de la presente invención de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud se puede lograr uniendo el aminoácido del extremo terminal C de la secuencia a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Las técnicas para la síntesis en fase sólida son descritas por Barany & Merrifield, THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY. VOL. 2: SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS, PART A, páginas 3-284; Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963), y Stewart et al., SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2ND ED., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Las proteínas de mayor longitud pueden sintetizarse por condensación de los extremos terminales amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Los métodos para formar enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo terminal carboxilo (por ejemplo, mediante el uso del reactivo de acoplamiento N,N'-diclohexilcarbodiimida) son conocidos por los expertos.

#### B. Purificación

Una vez expresados, los inmunoconjugados recombinantes y las PE de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna y similares (véase, en general, R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, NY (1982)). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad y los más preferidos están entre 98 y 99% o más de homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, si se usan terapéuticamente, los polipéptidos deben estar sustancialmente libres de endotoxina.

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

A menudo, las proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias se aíslan de cuerpos de inclusión y requieren solubilización usando desnaturizantes fuertes, y posterior replegamiento. Durante la etapa de solubilización, como es bien conocido en la técnica, debe estar presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un regulador de ejemplo con un agente reductor es: Tris 0,1 M pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE 0,3 M (ditioeritrol). La nueva oxidación de los enlaces disulfuro puede producirse en presencia de reactivos tiol de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena et al., Biochemistry, 9: 5015-5021 (1970), y especialmente como se describe por Buchner et al., citado más arriba.

La renaturalización se logra típicamente por dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturizada y reducida en regulador de replegamiento. Un regulador de ejemplo es Tris 0,1 M, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8 mM y EDTA 2 mM.

Como una modificación al protocolo de purificación de anticuerpos de dos cadenas, las regiones de cadena pesada y ligera se solubilizan separadamente y se reducen y luego se combinan en la solución de replegamiento. Se obtiene un rendimiento preferido cuando estas dos proteínas se mezclan en una relación molar tal que no se excede un exceso molar de 5 veces de una proteína sobre la otra. Es deseable añadir el exceso de glutatión oxidado u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular a la solución de replegamiento una vez completada la mezcla redox.

#### Composiciones farmacéuticas y administración

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

Las composiciones para administración comprenderán comúnmente una solución del anticuerpo y/o inmunoconjugado disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina regulada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y agentes reguladores, agentes de ajuste de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato sódico y similares. La concentración de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente con base en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

Por lo tanto, una composición de inmunotoxina típica de la presente invención para administración intravenosa sería de aproximadamente 0,1 a 10 mg por paciente por día. Se pueden usar dosis de 0,1 a aproximadamente 100 mg por

paciente y por día. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se divulgan con más detalle en publicaciones tales como REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 19ª ED., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1995).

5 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que sufre de una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es la que proporciona alivio subjetivo de un síntoma o una mejora objetivamente identificable según lo observado por el médico u otro observador calificado.

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

15 Las formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones inmunoconjugadas de la presente invención se pueden fabricar como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas de partículas. Para una visión general de sistemas de administración de proteínas, véase, Banga, A.J., THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas el agente terapéutico se dispersa a través de la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas menores que aproximadamente 1 µm se denominan generalmente nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm de modo que solo las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Las micropartículas tienen típicamente alrededor de 100 µm de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter J., COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, páginas 219-342 (1994); y Tice & Tabibi, TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, páginas 315-339 (1992).

20 Pueden usarse polímeros para la liberación controlada por iones de composiciones de inmunoconjugados de la presente invención. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para uso en la administración controlada de fármacos (Langer R., Accounts Chem. Res., 26: 537-542 (1993)). Por ejemplo, el copolímero de bloques, el poloxámero 407 existe como líquido viscoso pero móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a temperatura corporal. Ha demostrado ser un vehículo eficaz para la formulación y suministro sostenido de interleuquina 2 recombinante y ureasa (Johnston et al., Pharm. Res., 9: 425-434 (1992) y Pec et al., J. Parent. Sci. Tech., 44 (2): 58-65 (1990)). Alternativamente, la hidroxipatita se ha utilizado como un microportador para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., Int. J. Pharm., 112: 215-224 (1994)). En otro aspecto más, los liposomas se usan para la liberación controlada, así como el direccionamiento del fármaco del fármaco encapsulado con lípidos (Betageri et al., LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1993). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.055.303, 5.188.837, 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, 4.957.735 y 5.019.369, 5.055.303; 5.514.670; 5.413.797; 5.268.164; 5.004.697; 4.902.505; 5.506.206, 5.271.961; 5.254.342 y 5.534.496.

25 Entre diversos usos de las inmunotoxinas de la presente invención se incluyen una variedad de estados de enfermedad causados por células humanas específicas que pueden ser eliminadas por la acción tóxica de la proteína de fusión.

45 Usos *in vitro*

En otra realización, esta invención proporciona kits para eliminar células objetivo *in vitro* o *ex vivo* usando PE de la invención. Por ejemplo, se pueden usar inmunotoxinas que comprenden una PE de la invención para purgar células objetivo de una población de células en un cultivo. Así, por ejemplo, las células cultivadas de un paciente que tiene un cáncer que expresa CD22 pueden purgarse de células cancerosas poniendo en contacto el cultivo con inmunotoxinas que usan anticuerpos anti-CD22 como una fracción de direccionamiento.

50 En algunos casos, las células objetivo pueden estar contenidas dentro de una muestra biológica. Una "muestra biológica" tal como se utiliza en la presente memoria es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene células objetivo y células no objetivo. Dichas muestras incluyen, pero no se limitan a, tejido de biopsia, sangre y células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos). Se obtiene típicamente una muestra biológica a partir de un eucariota multicelular, preferiblemente un mamífero tal como rata, ratón, vaca, perro, conejillo de indias o conejo, y más

preferiblemente un primate, tal como un macaco, un chimpancé o un ser humano. Más preferiblemente, la muestra es de un ser humano.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

5 Este Ejemplo expone los materiales y métodos usados en algunos de los estudios subyacentes a la presente invención.

##### Preparación lisosomal de células Raji

10 Se cosecharon células de linfoma de Raji Burkitt ( $1-3 \times 10^8$ ), se lavaron dos veces en PBS frío, una vez en regulador de homogeneización (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM) y se resuspendieron en 2 ml de regulador de homogeneización. Las células en suspensión se lisaron por cavitación con nitrógeno con una bomba de rompimiento de células de 45 mL (Parr Instrument Company, Moline, IL) enfriada a 4°C y presurizada con gas nitrógeno a 150-200 psi durante 10 min. Las células rotas se centrifugaron a 800 x g durante 10 min. El sobrenadante postnuclear (capa media) se retiró y se colocó en capas en 8,5 ml de solución de PERCOLL® al 27% amortiguado sobre una capa de 1,2 ml de regulador de homogeneización 10X en un tubo de centrifuga de 16 x 76 Ultraclear Beckman (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA) y se centrifugaron a 4°C en un rotor de Ti tipo 50 de Beckman durante 1 h a 36.000 x g. Las fracciones del gradiente de PERCOLL® se recogieron y después se ensayaron individualmente para • - la actividad de hexosaminidasa como se describe (Schaub, B.E. et al., Curr Protoc Cell Biol, 15: 8-8-12 (2005)). Las fracciones con actividad máxima se reunieron, se transfirieron a tubos de policarbonato de 13 x 51 mm de paredes gruesas y se centrifugaron a 4°C usando un rotor S100 AT4-542 durante 30 min a 200.000 x g para eliminar el PERCOLL®. El sobrenadante se recogió y se usó para digerir inmunotoxinas.

20 La digestión de proteasa lisosomal de B3 (dsFv)-PE38 y la secuenciación del extremo terminal N de los fragmentos

25 Se usaron proteasas lisosomales purificadas catepsina B, catepsina D y catepsina S (EMD Biosciences, San Diego, CA), o la fracción lisosomal de células Raji para digerir la inmunotoxina B3 (dsFv)-PE38. Se incubó B3 (dsFv)-PE38 (0,2 mg/ml) con 5 µg/ml de proteasas lisosomales de catepsina purificada (catepsinas B, D y S) o con 30% (v/v) de la fracción lisosomal de células Raji a 37°C en regulador que contenía MES 0,1 M (pH 5,5), NaCl 150 mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM y Triton X-100 al 0,5%. A intervalos de tiempo entre 0 y 60 h después del inicio de la incubación, se retiraron las alícuotas en regulador de muestra de SDS-PAGE de tris-glicina y se incubaron a 85°C durante 5 min. Se aplicó la mitad de cada muestra en un gel de proteína de tris-glicina de acrilamida Novex al 4-20% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y se visualizó usando la tinción de proteína con azul de Microwave Blue Coomassie (Protiga Inc., Frederick, MD). La muestra restante se fraccionó por electroforesis en gel de la misma manera y luego se electrotransfirió sobre una membrana de PVDF (ProBlott, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) en un regulador CAPC 10 mM (pH 11) usando una unidad de transferencia semiseca. Después de la transferencia, la membrana se enjuagó brevemente con agua, se tiñó con 0,1% de azul de Coomassie R-250 en ácido acético al 0,5%/metanol al 40% durante 2 min y luego se decoloró en metanol al 50% en agua. Las bandas de proteína se cortaron de la membrana y se analizaron usando un secuenciador de proteína automatizado Procise 494 cLC (Applied Biosystems, Inc.).

35 Mutaciones en HA22

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

Purificación de inmunotoxinas: Las inmunotoxinas se purificaron como se describe (Pastan, I. et al., Methods Mol Biol, 248: 503-518 (2004)), excepto que se añadió glutatión oxidado, no reducido, al regulador de repliegamiento.

40 Líneas celulares

45 Se obtuvieron líneas celulares de linfoma de Burkitt humanas CD22-positivas (CA46, Daudi, Raji y Ramos) de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). La línea celular KOPN-8 ALL se obtuvo del Dr. Alan Wayne en el Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, MD). La línea celular WSU-CLL [que puede ser realmente un derivado de la línea celular REH ALL (Drexler, HG et al., Leukemia, 16: 1868-1870 (2002))] se obtuvo del Dr. A. Al-Katib Wayne State University, Detroit, MI). Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI-1640 complementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100 U de penicilina y 100 g de estreptomina (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Ensayos de citotoxicidad

La supervivencia celular de líneas celulares tratadas con inmunotoxinas se midió mediante el ensayo WST-8 usando el Kit-8 de recuento de células (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaitersburg, MD) esencialmente como se describe en el manual técnico. Brevemente, se incubaron 10.000 células/pozo con toxina en una placa de 96 pozos (Pastan, I. et al., *Methods Mol Biol*, 248: 503-518 (2004)) durante 48-72 h, después de lo cual se añadió el reactivo CCK-8 a los pozos. Las placas se incubaron hasta que los pozos con la absorbancia máxima a 450 nm alcanzaron valores de ~ 1 DO. Se usó ciclohexamida (10 • g/ml de concentración final) como control para 100% de muerte celular. Los valores se normalizaron entre los controles de ciclohexamida y PBS/HSA (0,2%) y se ajustaron a una ecuación sigmoidea de 4 parámetros estándar con una pendiente variable usando el programa GraphPad PRISM® (v 2.00) (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) para obtener la concentración de inmunotoxina a la que había un 50% de muerte celular (IC<sub>50</sub>). Las células de pacientes con CLL y HCL se ensayaron como se describió anteriormente (Kreitman, R.J. et al., *Clin. Cancer Res.*, 6: 1476-1487 (2000)). En pocas palabras, las células de leucemia se incubaron con inmunotoxinas recombinantes durante 3 días, luego se trataron con <sup>3</sup>H-leucina para evaluar la inhibición de la síntesis de proteínas o con WST-1 para evaluar la muerte celular.

#### Análisis estadístico

Los valores de IC<sub>50</sub> de pares emparejados de ensayos de citotoxicidad que analizan el efecto de HA22 y HA22-LR sobre la supervivencia de líneas celulares Raji (n = 10), Ramos (n = 3), Daudi (n = 3), CA46 (n = 5), KOPN8 (n = 3), y WSU-CLL (n = 4) se compararon usando una prueba t de dos colas emparejada.

#### Toxicidad no específica del ratón

Se inyectaron en forma intravenosa ratones desnudos hembra (5-6 semanas, 18-22 g) con una dosis única de 2,0 mg/kg de HA22 o HA22-LR que varió de 2,5-20 mg/kg en 0,2 ml de PBS que contenía 0,2% de HSA. Los ratones se observaron durante 10 días. Todos los procedimientos que involucran a ratones se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de los Institutos Nacionales de Salud aprobadas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Nacional del Cáncer.

Farmacocinética: Se inyectaron en la vena de la cola 9 ratones hembra Balb/c con 10 µg de HA22 o HA22-LR en 0,2 ml de PBS con HSA al 0,2%. Se tomaron muestras de sangre de tres ratones separados a intervalos de tiempo de 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos desde el momento de la inyección, y cada ratón fue sangrado dos veces. Grupos de tres ratones se sangraron a intervalos de tiempo de 2 y 60 min, 5 y 30 min, o 10 y 20 min. Se recogió el suero de las muestras de sangre y se analizó mediante ELISA (Bang S. et al., *Clin Cancer Res*, 11: 1545-1550 (2005)) en comparación con una curva estándar de la inmunotoxina pura correspondiente para determinar la concentración de inmunotoxina en el suero del ratón.

Actividad antitumoral de xenoinjerto de ratón: Se inyectaron en forma subcutánea cuarenta ratones hembra con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) con 10<sup>7</sup> células CA46 el día 0 como se describió anteriormente (Kreitman, RJ et al., *Int. J. Cancer*, 81: 148-155 (1999)). El volumen del tumor fue medido regularmente mediante un calibrador durante las siguientes 6 semanas. Cuando el tamaño promedio alcanzó ~120 mm<sup>3</sup>, 6 días después de la implantación, los ratones se dividieron en cinco grupos de ocho y se inyectó QOD X 3 con 0,2 ml de PBS que contenía HSA al 0,2% y HA22 (0,3 mg/kg) o HA22-LR (1,0, 1,75 o 2,5 mg/kg), o se dejaron sin tratar (PBS/HSA al 0,2% solamente). Los ratones fueron sacrificados si sus tumores excedían 1.000 mm<sup>3</sup> o al final del experimento de 10 semanas.

#### Ejemplo 2

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

45 Digestión de las inmunotoxinas por proteasa lisosomal

Para determinar la ubicación de los sitios de escisión con proteasa lisosomal dentro de las inmunotoxinas, se requirió una gran cantidad de una inmunotoxina altamente purificada. Se dispuso de una gran cantidad de inmunotoxina B3 (dsFv)-PE38, que contiene el mismo fragmento PE38 que HA22, pero con un Fv diferente como la fracción de direccionamiento, (Reiter, Y. et al., *Cancer Res*, 54: 2714-2718 (1994)). Se incubó B3(dsFv)-PE38 ya sea con extractos lisosomales preparados a partir de células Raji o con proteasas lisosomales purificadas cathepsina B, cathepsina D o cathepsina S. Se eliminaron partes alícuotas de la reacción a veces entre 0 y 60 h y se separaron y visualizaron los fragmentos mediante la reducción de SDS-PAGE.

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

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

15 Eliminación de regiones susceptibles a la proteasa

Dado que hay numerosas proteasas lisosomales con una especificidad amplia y a menudo superpuesta, y los sitios observados se agrupan en un segmento limitado de PE38, los sitios de escisión se eliminaron haciendo supresiones para eliminar los sitios.

20 Aunque B3(dsFv)-PE38 se usó para estudiar los sitios de escisión, ya no se persigue para uso terapéutico. Se usó otra inmunotoxina basada en PE38, HA22, para estudiar los efectos de las supresiones en el sitio. HA22 es una variante más activa, optimizada por afinidad, de la inmunotoxina anti-CD22 BL22 (Salvatore, G. et al., Clin Cancer Res, 8: 995-1002 (2002)) y se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de neoplasias de células B (leucemia linfocítica crónica [CLL], leucemia de células pilosas [HCL] y leucemia linfoblástica aguda [ALL]). Se introdujeron una serie de supresiones que eliminan grandes segmentos de los dominios II y Ib de PE38 en HA22. Las proteínas mutantes se expresaron, se purificaron y se compararon con HA22 *in vitro* usando ensayos de citotoxicidad en células Raji.

25 La Figura 3 indica la porción de la secuencia de PE nativa que permanece en HA22 y en otras formas mutadas de PE (denominadas como M1-M5) creadas en el transcurso de los presentes estudios, y las actividades de M1-M5 en relación con HA22 en células Raji. La eliminación de los residuos 251 a 273 (M1) o 365 a 394 (M2) no afecta sustancialmente a la actividad de la inmunotoxina. Del mismo modo, la supresión de los residuos 251 a 273 y 350 a 394, junto con el cambio de una cisteína libre en la posición 287 por serina (M3), produce una inmunotoxina completamente activa. La mutación C287S combinada con la supresión de los residuos 350 a 394 y 251 a 280 (M4), que elimina la escisión por furina en Arg279, produce una inmunotoxina que es aproximadamente 5 veces menos activa que HA22. Inesperadamente, un mutante con grandes supresiones que eliminó la mayoría de los residuos y todos los sitios de escisión del dominio II y Ib (M5) sigue siendo muy activo. El mutante M5 retiene sólo una secuencia de 11 residuos (274-284) en el dominio II que contiene el reconocimiento de furina y el sitio de escisión de Arg279.

30 El mutante M5 de HA22 fue denominado ahora como "HA22-LR" para indicar que es "resistente a los lisosomas". Para verificar que HA22-LR es resistente a la degradación lisosomal, se trató con extractos lisosomales y se examinó mediante SDS-PAGE durante 24 h. Aunque HA22 se hidroliza en gran medida en fragmentos más pequeños en 30 minutos y se fragmenta completamente después de 4 h, la proteólisis de HA22-LR fue mucho más lenta, con hidrólisis apenas detectable a las 2 h y una fracción intacta considerable aún detectable después de 24 h.

### Ejemplo 3

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

45 La actividad de HA22-LR se investigó en líneas de células tumorales CD22 positivas adicionales y se comparó con HA22 usando una prueba t de dos colas pareado entre los valores de IC<sub>50</sub> resultantes (Tabla 1). HA22-LR tenía una actividad indistinguible de HA22 en las líneas celulares de linfoma Ramos (n = 3), CA46 (n = 5) y Daudi (n = 3), pero tenía diferencias significativas frente a la línea celular WSU-CLL (actividad del 212%, p = 0,01, n = 4), la línea celular KOPN-8 ALL (actividad del 22%, p = 0,01, n = 3) y la línea celular Raji (49%, p = 0,0002, n = 10). Aunque existe cierta variabilidad en la actividad de HA22-LR, HA22-LR y HA22 tenían actividades generalmente similares en líneas celulares CD22-positivas.

50 TABLA 1. Actividad de HA22 y HA22-LR en seis líneas celulares CD22 positivas

---

IC<sub>50</sub> ± EE (ng/ml)

Línea Celular	HA22	HA22-LR	Actividad Relativa
CA46 (n = 5)	0,30 ± 0,08	0,26 ± 0,06	1,15
Daudi (n = 3)	0,27 ± 0,04	0,24 ± 0,04	1,12
Ramos (n = 3)	1,62 ± 0,28	1,78 ± 0,15	0,91
Raji* (n = 10)	0,36 ± 0,04	0,73 ± 0,09	0,49
KOPN-8* (n = 3)	0,10 ± 0,02	0,45 ± 0,05	0,22
WSU-CLL* (n = 4)	2,50 ± 0,53	1,18 ± 0,34	2,12

\* Indica una diferencia significativa (p <0,05 en una prueba t pareada de dos colas) entre los valores de IC<sub>50</sub> de HA22 y HA22-LR.

Ejemplo 4

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

5 Para determinar si la nueva inmunotoxina también mataría células obtenidas directamente de pacientes, se probó en células de 5 pacientes con CLL y 3 con HCL. Como se muestra en la Tabla 2, se observó actividad para todas las poblaciones de células de pacientes ensayadas con HA22-LR. En CLL, las células malignas de los 5 pacientes fueron más sensibles a HA22-LR que a HA22, por una media de más de 17 veces (p = 0,009, Wilcoxon). Las IC<sub>50</sub> para la inhibición de la síntesis de proteínas oscilaban entre <1 y 5,6 ng/ml. HA22-LR inhibió la síntesis de proteínas en un 55% a 1 ng/ml en células de pacientes con CLL # 2 (IC<sub>50</sub> <1 ng/ml). Los ensayos para la muerte celular en células de 10 pacientes con CLL también mostraron más sensibilidad a HA22-LR que a HA22. Mientras que las IC<sub>50</sub> de HA22 en células de pacientes con CLL variaron ampliamente de 8 a > 1.000 ng/ml, las IC<sub>50</sub> de HA22-LR variaron por menos de 10 veces. En HCL, HA22-LR fue generalmente menos activo que HA22 con respecto a la inhibición de la síntesis de 15 proteínas. Los ensayos para la muerte celular en dos de las tres poblaciones de células de pacientes con HCL mostraron hallazgos similares. En resumen, HA22-LR fue altamente citotóxica hacia células de CLL y HCL CD22 positivas, pero entre las células de CLL, que muestran una sensibilidad variable hacia HA22, la citotoxicidad de HA22-LR fue significativamente más potente y más uniforme.

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

Tipo y Paciente No.	IC <sub>50</sub> ± SD (ng/mL)			Tipo de ensayo
	HA22	HA22-LR	Actividad Relativa	
CLL # 1	>1000	4,7 ± 0,54	>210	Síntesis de proteínas
CLL # 1	55 ± 12,8	3,4 ± 0,53	16,2	Muerte celular
CLL # 2	16,8 ± 1,05	<1	>16,8	Síntesis de proteínas
CLL # 2	10,1 ± 0,48	1,32 ± 0,164	7,65	Muerte celular
CLL # 3	8,1 ± 2,1	3,9 ± 0,50	2,07	Síntesis de proteínas
CLL # 4	290 ± 167	5,6 ± 1,10	51,8	Síntesis de proteínas
CLL # 5	8,0 ± 1,51	3,7 ± 0,27	2,16	Síntesis de proteínas

HCL # 1	5,2 ± 0,37	5,9 ± 1,03	0,88	Síntesis de proteínas
HCL # 2	0,177 ± 0,0062	1,25 ± 0,24	0,14	Síntesis de proteínas
HCL # 2	0,165 ± 0,0098	2,0 ± 0,39	0,08	Muerte celular
HCL # 3	1,76 ± 0,51	<1	>1,76	Síntesis de proteínas
HCL # 3	2,1 ± 0,51	1,51 ± 0,29	1,39	Muerte celular

Ejemplo 5

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

Estudios de toxicidad

- 5 Se inyectaron ratones desnudos por vía intravenosa con una dosis única de HA22-LR que oscilaba entre 2,5 y 20 mg/kg y se observaron durante 10 días. No se observaron muertes con el nivel de dosis de 20 mg/kg (Tabla 3). No se evaluaron dosis mayores. En contraste marcado y consistente con datos previos (Bang, S. et al., Clin Cancer Res, 11: 1545-1550 (2005)), una dosis de 2,0 mg/kg de HA22 produjo muerte en 100% (5/5) de los ratones. La dosis única i.v. LD<sub>50</sub> de HA22-LR es superior a 20 mg/kg, lo que indica una disminución de la toxicidad no específica de más de 10 veces con respecto a HA22.

Farmacocinética

- 15 Se inyectaron ratones Balb/c con 10 µg de HA22 o HA22-LR y se sangraron a intervalos entre 2 y 60 minutos. La concentración de inmunotoxina en suero de ratón se midió mediante ELISA. Los datos se ajustaron a una única función exponencial de decaimiento (Fig. 5). La vida media (t<sub>1/2</sub>) de HA22 fue de 14,6 min (k = 0,047), mientras que la vida media de HA22-LR fue de 7,8 min (k = 0,089).

Tabla 3. Toxicidad no específica de HA22-LR

Inmunotoxina	Dosis (mg/kg)	Muerte/ratones totales
HA22	2,0	5/5
HA22-LR	2,5	0/12
	5,0	0/4
	10	0/10
	20	0/10

Ejemplo 6

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

- 20 Basándose en la comparabilidad de la actividad *in vitro* de HA22 y HA22-LR y la baja toxicidad animal de HA22-LR, se ensayó la eficacia de HA22-LR en un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón. Los ratones SCID con tumores de xenoinjerto CA46 con un promedio de ~120 mm<sup>3</sup> se trataron intravenosamente QOD X 3 con PBS, 0,3 mg/kg de HA22 o HA22-LR con dosis de 1,0, 1,75 o 2,5 mg/kg. El tamaño del tumor se midió regularmente hasta durante 40 días (Fig. 6) y se observó visualmente durante 10 semanas.
- 25 Los tumores de los ratones tratados con PBS crecieron rápidamente hasta un tamaño promedio superior a 1.000 mm<sup>3</sup> el día 26. Los ratones tratados en los días 6, 8 y 10 con 0,3 mg/kg de HA22, la dosis máxima que se puede administrar a los ratones QOD X 3 sin toxicidad, provocó regresiones que llevaron el tamaño medio del tumor a un mínimo de ~52 mm<sup>3</sup> al día 12. Para el día 21 todos los tumores habían reanudado un rápido crecimiento.

5 La respuesta tumoral a la dosis de 1,0 mg/kg de HA22-LR fue similar a la respuesta a 0,3 mg/kg de HA22, pero 1,75 mg/kg de HA22-LR fue mucho más eficaz. En el día 14, 5/8 de los ratones tratados con 1,75 mg/kg de HA22-LR presentaron tumores indetectables que permanecieron imperceptibles durante la duración del estudio. Los otros tumores se contrajeron inicialmente, pero crecieron hasta un tamaño medio de 54 mm<sup>3</sup> el día 40. La dosis de 2,5 mg/kg de HA22-LR demostró una actividad antitumoral notable. En 7/8 de los ratones los tumores desaparecieron por completo el día 14 y no habían regresado por 10 semanas. Un tumor disminuyó a 10 mm<sup>3</sup> el día 14, pero creció hasta 30 mm<sup>3</sup> el día 40. Se concluye que la baja toxicidad animal de HA22-LR permite administrar dosis mayores de inmunotoxina de manera segura, lo que mejora dramáticamente la actividad antitumoral de la inmunotoxina.

Ejemplo 7

10 Este Ejemplo discute los resultados de los estudios usando como la fracción de direccionamiento un anticuerpo que se une a un antígeno denominado mesotelina presente en la superficie de muchos cánceres.

15 Se ha ensayado una inmunotoxina que utiliza el anticuerpo, conocido como "SS1" (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 7.081.518) como la fracción de direccionamiento, y PE38 como la fracción de toxina en un ensayo clínico de fase I en pacientes con mesotelioma o cáncer de ovario que habían fracasado con terapias estándar (Hassan, R. et al., Clin Cancer Res, 13: 5144-5149 (2007)). Para comparar el efecto de usar una PE resistente a los lisosomas de la invención, la PE utilizada en la inmunotoxina HA22-LR discutida en los Ejemplos anteriores se fusionó al anticuerpo SS1 para formar la inmunotoxina SS1-PE-LR y se ensayó en líneas celulares que expresaban mesotelina contra una inmunotoxina similar de SS1 fusionada a PE38.

20 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar, para dos de las líneas celulares, la citotoxicidad era comparable, mientras que, para una línea celular, la inmunotoxina con PE-LR era 3,72 veces más citotóxica para las células que la inmunotoxina hecha con PE38. En una línea celular, la inmunotoxina SS1-PE-LR tenía aproximadamente la mitad de la citotoxicidad de la inmunotoxina PE38, indicando que sería muy útil si, como la inmunotoxina HA22-LR, pudiera administrarse en dosis mucho mayores sin toxicidad. La inmunotoxina SS1-PE-LR tenía valores de IC<sub>50</sub> en el intervalo de ng/ml de un solo dígito en 5 de las 6 líneas celulares ensayadas. Para una línea celular, la inmunotoxina SS1-PE-LR era mucho menos citotóxica para las células que la inmunotoxina basada en PE38. Estos resultados muestran que las inmunotoxinas que usan PE-LR como fracción tóxica es probable que sean agentes terapéuticos útiles, pero, al igual que la mayoría de los agentes terapéuticos, no necesariamente serán útiles contra las células de todos los cánceres u otros trastornos. El médico puede determinar fácilmente si cualquier molécula quimérica particular que se utilice como la fracción de toxina, una PE de la invención será eficaz en células objetivo, tales como las del

25 cáncer de un paciente, tomando una biopsia de las células objetivo a las que la molécula quimérica va a ser dirigida y probar la molécula quimérica sobre las células de la biopsia para determinar si son susceptibles de tener su crecimiento inhibido por la molécula quimérica, con una IC<sub>50</sub> en el intervalo de ng/mL de un solo dígito indicando que la inhibición del crecimiento es aceptable.

35 Tabla 4. Citotoxicidad de la inmunotoxina SS1-PE y SS1-PE-LR a las células de las líneas celulares que expresan mesotelina.

Línea Celular	Fracción de direccionamiento	IC <sub>50</sub> (ng/ml)		Actividad relativa
		Inmunotoxina elaborada con PE38	Inmunotoxina elaborada con PE-LR	
L55	SS1	4,77 ± 0,87	3,87 ± 0,41	1,23
A1847	SS1	4,06 ± 0,35	4,24 ± 0,28*	0,96
A431/K5	SS1	0,20 ± 0,02	1,19 ± 0,19	0,17
OVCAR-8	SS1	2,32 ± 0,58	4,29 ± 0,67*	0,54

HAY	SS1	4,54 ± 0,59	1,22 ± 0,15	3,72
KB31	SS1	5,15 ± 0,57	• 1000*	• 200X Disminuye
* - Muerte celular incompleta.				

Ejemplo 8

Este Ejemplo discute los resultados de los estudios expuestos aquí.

5 La supresión de sitios susceptibles a la proteasa en PE produjo una forma más pequeña de PE que, en una  
 inmunotoxina de ejemplo, HA22-LR, mantuvo una actividad citotóxica excelente en líneas celulares CD22 positivas y en  
 células aisladas directamente de pacientes con HCL y CLL. Además, HA22-LR fue considerablemente menos tóxico  
 10 para los ratones, lo que demuestra una reducción de más de 10 veces en la toxicidad no específica. Estudios previos en  
 ratones han demostrado que HA22 tiene una dosis única de LD<sub>50</sub> de 1,33 mg/kg (Bang, S. et al., Clin Cancer Res, 11:  
 1545-1550 (2005)). Los estudios subyacentes a la presente invención demostraron que una sola dosis intravenosa de  
 2,0 mg/kg de HA22 mató 5/5 ratones, pero las dosis de HA22-LR hasta 20 mg/kg no mataron a ninguno de los ratones  
 inyectados. Esta gran disminución en la toxicidad animal permitió la administración de dosis de tratamiento mucho más  
 altas, lo que condujo a una actividad antitumoral mucho mayor.

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

25 Otro factor que puede contribuir a la diferencia en la toxicidad no específica es la diferencia en las semividas de HA22 y  
 HA22-LR (Figura 5), lo cual es probablemente debido a una filtración y eliminación más eficaces de HA22-LR (51,0 kDa)  
 que HA22 (63,3 kDa) por glomérulos en el riñón (Brenner, BM et al., Am J Physiol, 234: F455-F460 (1978)). Sin  
 embargo, la diferencia de 2 veces en la semivida sola es insuficiente para explicar la diferencia de > 10 veces en la  
 30 toxicidad no específica. Los esfuerzos anteriores para reducir la toxicidad no específica de las inmunotoxinas han  
 demostrado que la disminución del punto isoeléctrico (pI) del Fv en las inmunotoxinas LMB-2, B3(dsFv)-PE38 o SS1P  
 disminuye su toxicidad no específica aproximadamente 2 a 3 veces en ratones (Onda, M. et al., J Immunol, 163: 6072-  
 6077 (1999), Onda, M. et al., Cancer Res, 61: 5070-5077 (2001)). Esta observación no tiene en cuenta la diferencia  
 entre HA22 y HA22-LR, ya que los dos constructos tienen un Fv idéntico y el pI de HA22-LR está ligeramente  
 35 incrementado con respecto al pI de HA22 (pI<sub>HA22</sub> = 5,26 y pI<sub>HA22-LR</sub> = 5,63). Además, la diferencia de 2 a 3 veces en  
 la toxicidad observada para esta estrategia es también mucho menor que la diferencia > 10 veces entre HA22 y HA22-  
 LR.

Para producir la inmunotoxina HA22-LR, se determinaron y eliminaron los sitios de escisión de proteasas lisosomales  
 dentro de PE38. La inmunotoxina B3(dsFv)-PE38 se digirió con ambos extractos lisosomales y las catepsinas B, D y S,  
 40 que han sido implicadas en el procesamiento del antígeno (Plüger, EB et al., Eur J Immunol, 32: 467-476 (2002); Zhang,  
 T. et al., Immunology, 100: 13-20 (2000), Deussing, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 4516-4521 (1998),  
 Nakagawa, TY et al., 10: 207-217 (1999), Shi, GP et al., Immunity, 10: 197-206 (1999)). Se encontró que la escisión de  
 proteasa lisosomal de las inmunotoxinas basadas en PE se concentraba dentro de los dominios II y Ib del fragmento de  
 toxina PE38. El trabajo previo con PE nativa ha mostrado que el dominio Ib es altamente susceptible a una proteólisis  
 45 limitada con quimotripsina, serina proteinasa estafilocócica, pepsina A y subtilisina (Bourdenet, S. et al., Eur J Biochem,  
 192: 379-385 (1990)), lo que confirma que el dominio Ib es fácilmente accesible a las proteasas. Los resultados de la

presente invención muestran que el dominio II en PE38 es también accesible a la proteasa mientras que el dominio III es menos fácilmente escindido, probablemente debido a una estructura más compacta y estable.

La información del análisis de escisión se usó para producir una serie de supresiones en la inmunotoxina HA22 que, en la construcción denominada "M5", eliminó la mayoría de los dominios II y Ib, dejando sólo un corto tramo de 11 aminoácidos del dominio II (Fig. 3). Este fragmento de 11 residuos está compuesto por la secuencia de aminoácidos RHRQPRGWEL (SEQ ID NO: 11) y contiene un sitio de escisión de proteasa de furina que es importante para el procesamiento intracelular y la activación de la toxina nativa (Ogata, M. et al., J. Biol Chem, 265: 20678-20685 (1990), Jinno, Y. et al., J. Biol Chem, 264: 15953-15959 (1989)). Este constructo, denominado ahora HA22-LR para enfatizar su mayor resistencia a proteasas lisosomales, está compuesto por un dsFv anti-CD22 unido a un fragmento de 25 kDa de PE (PE25) que contiene el fragmento de 11 residuos del dominio II y todo el dominio III. Cuando se ensayaron en varias líneas celulares que expresan CD22, la actividad de HA22-LR fue similar a la inmunotoxina HA22 de la que se derivó.

Las investigaciones anteriores han demostrado que el dominio Ib no es esencial para la actividad de las inmunotoxinas de PE (Siegall, CB et al., J Biol Chem, 264: 14256-14261 (1989), Kihara, A. y Pastan, I., Bioconjug Chem, 5: 532-538 (1994), Debinski, W. et al., Mol Cell Biol, 11: 1751-1753 (1991), Kuan, CT y Pastan, I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 974-978 (1996), Prior, TI et al., Biochemistry, 31: 3555-3559 (1992)). Sin embargo, se ha propuesto que el dominio II desempeña un papel clave en la translocación de la membrana durante la intoxicación por PE (Hwang, J. et al., Cell, 48: 129-136 (1987), Prior, TI et al., Biochemistry, 31: 3553-3559 (1992), Taupiac, MP et al., Mol Microbiol, 31: 1385-1393 (1999), Wedekind, JE et al., J. Mol Biol, 314: 823-837 (2001), Mere, J. et al., J Biol Chem, 280: 21194-21201 (2005)). Los resultados reportados aquí indican que un componente principal de la actividad de translocación del dominio II puede localizarse en un corto tramo de residuos alrededor del sitio de escisión por furina. Los datos que muestran una disminución de 5 veces en la actividad del mutante M4, que elimina el sitio de escisión por furina, y un trabajo previo (Jinno, Y. et al., J Biol Chem, 264: 15953-15959 (1989)) indican que la escisión por furina juega un papel importante en la citotoxicidad de PE. Una posibilidad adicional es que la resistencia de HA22-LR a la degradación lisosomal pueda compensar cualquier pérdida de actividad de translocación al permitir que HA22-LR sobreviva más tiempo dentro de la célula. Los objetivos de superficie celular de las inmunotoxinas y el tipo de célula objetivo también pueden influir en su tráfico intracelular y el acceso al citosol.

HA22-LR tenía una citotoxicidad similar o ligeramente menor en comparación con HA22 en células con alta expresión de CD22, incluyendo líneas celulares CD22 positivas y células HCL frescas. Sin embargo, su citotoxicidad en células CLL fue más potente y más uniforme que HA22. Esto puede deberse a la resistencia de HA22-LR a la degradación lisosomal que conduce a una supervivencia intracelular más prolongada en relación con HA22. Es improbable que esto fuera simplemente porque HA22-LR sobrevive más tiempo que HA22 en el medio durante la incubación de 3 días utilizada en los estudios, ya que otros experimentos han demostrado que HA22 tiene una excelente estabilidad en suero y en medio de cultivo celular. Es posible que la digestión con proteasa lisosomal sea un mecanismo principal de resistencia a las inmunotoxinas para células con CLL, y que la molécula HA22-LR supera esta resistencia. La digestión con proteasas lisosomales también estaría presente en células con alta expresión de CD22, pero puede limitar el tratamiento sólo en CLL, donde la expresión de CD22 es baja y el número relativamente pequeño de moléculas internalizadas limita la actividad de inmunotoxina. Además, la actividad de HA22-LR en CLL es muy similar a la observada para HA22 en HCL, lo que sugiere que HA22-LR se debe desarrollar más como tratamiento potencial para esta enfermedad.

Además de las toxicidades no específicas, otro factor importante que limita la utilidad de las inmunotoxinas es el desarrollo de anticuerpos que reaccionan con la toxina y neutralizan su actividad. Otro trabajo del laboratorio de los presentes inventores describió recientemente una inmunotoxina mutante, HA22-8X, que es significativamente menos inmunogénica en ratones, porque muchos, pero no todos, de los epítopos de células B han sido eliminados. Afortunadamente, la mayoría de los epítopos de células B restantes en HA22-8X se localizan en las regiones del dominio II suprimidas en HA22-LR. La combinación de las mutaciones en ambas moléculas producirá una inmunotoxina que es aún menos inmunogénica.

HA22-LR tiene varias ventajas sobre HA22 que se espera sean aplicables a otras inmunotoxinas de PE, pero parece especialmente prometedora para el tratamiento de CLL. La toxicidad no específica de HA22-LR en ratones es más de 10 veces menor que HA22. Por lo tanto, el uso de HA22-LR debe ayudar a prevenir los efectos secundarios relacionados con el tratamiento y permitir que los pacientes reciban dosis más altas para un mejor resultado terapéutico en seres humanos. Además, las supresiones utilizadas para generar HA22-LR eliminan los epítopos de anticuerpos conocidos y deberían ayudar a limitar la generación de anticuerpos neutralizantes, permitiendo que se administren más ciclos de tratamiento a los pacientes. En relación con HA22, HA22-LR también tiene una actividad mucho más potenciada, más uniforme contra células de CLL derivadas de pacientes, y actividad generalmente similar en líneas celulares CD22 positivas y células de pacientes con HCL. Por estas razones, HA22-LR representa un avance importante en el desarrollo de inmunotoxinas.

Listado de secuencias

<110> Pastan, Ira H.

Weldon, John

FitzGerald, David

El Gobierno de los Estados Unidos de América, representado por La Secretaría del Departamento de Salud y Servicios Humanos

- 5 <120> Supresiones en el dominio II de endotoxina A de *Pseudomonas* que elimina epítomos inmunogénicos  
<130> 015280-545100PC  
<140> WO PCT/US08/75296  
<141> 2008-09-04  
<150> US 60/969.929
- 10 <151> 2007-09-04  
<150> US 61/018.853  
<151> 2007-01-03  
<160> 34  
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 15 <210> 1  
<211> 613  
<212> PRT  
<213> *Pseudomonas aeruginosa*  
<220>
- 20 <223> Exotoxina A de *Pseudomonas* nativa (PE)  
<400> 1

ES 2 642 516 T3

Ala	Glu	Glu	Ala	Phe	Asp	Leu	Trp	Asn	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Cys	Val
1				5					10					15	
Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Ser	Ser	Arg	Met	Ser	Val	Asp	Pro
			20					25					30		
Ala	Ile	Ala	Asp	Thr	Asn	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	His	Tyr	Ser	Met	Val
		35					40					45			
Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu
	50					55					60				
Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Ile	Arg	Leu	Glu	Gly	Gly	Val	Glu
65					70					75					80
Pro	Asn	Lys	Pro	Val	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Arg	Gln	Ala	Arg	Gly	Ser
				85					90					95	
Trp	Ser	Leu	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	His	Glu	Lys	Pro	Ser	Asn
			100					105					110		
Ile	Lys	Val	Phe	Ile	His	Glu	Leu	Asn	Ala	Gly	Asn	Gln	Leu	Ser	His
		115					120					125			
Met	Ser	Pro	Ile	Tyr	Thr	Ile	Glu	Met	Gly	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Lys
	130					135					140				
Leu	Ala	Arg	Asp	Ala	Thr	Phe	Phe	Val	Arg	Ala	His	Glu	Ser	Asn	Glu
145					150					155					160
Met	Gln	Pro	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Val	Met
				165					170					175	
Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Trp	Ser	Glu	Trp	Ala	Ser
			180					185					190		
Gly	Lys	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Tyr	Asn	Tyr
		195					200					205			

ES 2 642 516 T3

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

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

## ES 2 642 516 T3

<220>

<223> secuencia adicional sintética del terminal carboxilo de PE

<400> 2

**Lys Asp Glu Leu**

**1**

5 <210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia adicional sintética del terminal carboxilo de PE

<400> 3

**Arg Glu Asp Leu**

**1**

<210> 4

<211> 128

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PE sintética truncada de 38 kD de los dominios II (PE38) (residuos 251-364) e Ib (residuos 365-394)

<400> 4

ES 2 642 516 T3

```

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

```

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 5

```

Arg Glu Asp Leu Lys
 1          5

```

10 <210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> sitio de escisión de furina mínima sintética

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)...(3)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

20 <400> 6

Arg Xaa Xaa Arg  
1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<220>

<221> MOD\_RES

10 <222> (2) ... (2)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)...(3)

15 <223> Xaa = Arg o Lys

<400> 7

Arg Xaa Xaa Arg  
1

<210> 8

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de furina sintética

<220>

25 <221> MOD\_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 8

Arg Xaa Arg Arg  
1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de furina sintética

<220>

<221> MOD\_RES

10 <222> (2)...(2)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 9

Arg Xaa Lys Arg  
1

<210> 10

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

20 <400> 10

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu  
1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 11

ES 2 642 516 T3

Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu  
1 5 10

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética (FCS)

<400> 12

Arg Lys Lys Arg  
1

10 <210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> secuencia escindible de furina sintética (FCS)

<400> 13

Arg Arg Arg Arg  
1

<210> 14

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética (FCS)

<400> 14

Arg Lys Ala Arg  
1

25

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> secuencia escindible de furina sintética (FCS)

<400> 15

**Ser Arg Val Ala Arg Ser**  
1 5

<210> 16

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética (FCS)

<400> 16

**Thr Ser Ser Arg Lys Arg Arg Phe Trp**  
1 5

15 <210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> secuencia escindible de furina sintética (FCS)

<400> 17

**Ala Ser Arg Arg Lys Ala Arg Ser Trp**  
1 5

<210> 18

25 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 18

Arg Arg Val Lys Lys Arg Phe Trp  
1 5

5 <210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 19

Arg Asn Val Val Arg Arg Asp Trp  
1 5

<210> 20

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 20

Thr Arg Ala Val Arg Arg Arg Ser Trp  
1 5

20

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 21

Arg Gln Pro Arg  
1

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 22

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp  
1 5

10 <210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 23

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu  
1 5

<210> 24

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 24

His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln  
1 5

25

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 25

Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu  
1 5

<210> 26

<211> 4

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 26

Arg Ser Lys Arg  
1

15

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 27

Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp  
1 5

<210> 28

25 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 642 516 T3

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 28

His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu  
1 5

5 <210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 29

Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu  
1 5

<210> 30

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 30

His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu  
1 5 10

20

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> secuencia escindible de furina sintética

<400> 31

ES 2 642 516 T3

Arg His Arg Ser Lys Arg  
1 5

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> residuos terminales mutados sintéticos de PE (residuos 609-613)

<400> 32

Arg Glu Glu Leu  
1

10 <210> 33

<211> 4

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintética del "motivo del sitio activo" de consenso de tetranucleótido

<400> 33

rgyw 4

<210> 34

<211> 3

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética del "motivo del sitio activo" de consenso de serina

<400> 34

agy

3

25 1

## REIVINDICACIONES

1. Una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) mutada aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula I:



5 en donde

$n = 0$  o  $1$ , independientemente, para cada  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$ ,

$R^1 = 1$  a  $10$  residuos de amino ácidos

FCS = una secuencia de escisión por furina de  $4$  a  $11$  residuos de aminoácidos, cuya secuencia puede ser escindida por furina y tiene un extremo amino y un extremo carboxilo,

10  $R^2 = 1$  a  $10$  residuos de aminoácidos;

$R^3 = 1$  o más residuos de aminoácidos contiguos de los residuos  $365$  a  $394$  de la SEQ ID NO:  $1$ ; y,

Dominio funcional III de PE = residuos  $395$ - $613$  de la SEQ ID NO:  $1$ , que comprende opcionalmente:

(i) una sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los residuos  $609$ - $613$  de la SEQ ID NO:  $1$ ;

15 (ii) una sustitución del residuo de aminoácido  $R490$  de la SEQ ID NO:  $1$  por glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina;  
 (iii) una sustitución de uno o más residuos de aminoácidos  $D403$ ,  $R412$ ,  $R27$ ,  $E431$ ,  $R432$ ,  $R458$ ,  $D461$ ,  $R467$ ,  $R505$ ,  $R513$ ,  $R522$ ,  $R538$ ,  $E548$ ,  $R551$ ,  $R576$ ,  $K590$  y  $L597$  de la SEQ ID NO:  $1$ , cuyos residuos de la SEQ ID NO:  $1$  mantienen la inmunogenicidad de un epítipo o un subepítipo del dominio III de PE; o

(iv) una combinación de cualquiera de (i)-(iii), y

20 en donde la PE carece de residuos de aminoácidos contiguos  $1$ - $273$  y  $285$ - $364$  como se define mediante referencia a la SEQ ID NO:  $1$ .

2. La PE mutada de la reivindicación  $1$ , en la que la FCS comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula II:



25 en la que  $P4$  es un residuo de aminoácido en el extremo amino,  $P1$  es un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo,  $P1$  es un residuo de arginina o un residuo de lisina y la secuencia de aminoácidos de Fórmula II es escindible en el extremo carboxilo de  $P1$  por furina

3. La PE mutada de la reivindicación  $2$ , en la que la FCS

(i) comprende además residuos de aminoácidos representados por  $P6$ - $P5$  en el extremo amino,

(ii) comprende además residuos de aminoácidos representados por  $P1$ - $P2'$  en el extremo carboxilo,

30 (iii) en la que  $P1$  es un residuo de arginina o un residuo de lisina,  $P2'$  es triptófano y  $P4$  es arginina, valina o lisina, con la condición de que cuando  $P4$  no sea arginina,  $P6$  y  $P2$  sean residuos de aminoácidos básicos y

(iv) la secuencia es escindible en el extremo carboxilo de  $P1$  por furina.

4. La PE mutada de la reivindicación  $1$ , en la que la FCS es la SEQ ID NO:  $10$ .

35 5. La PE mutada de la reivindicación  $1$ , en la que el dominio funcional III de PE consiste en los residuos de aminoácidos  $395$  a  $613$  de la SEQ ID NO:  $1$ .

6. La PE mutada de la reivindicación  $1$ , en la que la PE mutada comprende uno o más residuos de aminoácidos contiguos de los residuos  $365$ - $394$  de la SEQ ID NO:  $1$  entre la FCS y el dominio III de PE.

7. La PE mutada de la reivindicación 1, en la que n es 0 para R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>.
8. La PE mutada de la reivindicación 1, en la que n es 1 para R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>.
9. Una molécula quimérica que comprende
- (a) un ligando que se une específicamente a un antígeno o receptor en una superficie celular, conjugado o fusionado a
- 5 (b) la PE mutada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, y
- en donde la molécula quimérica carece de residuos de aminoácidos contiguos 1-273 y 285-364 como se define mediante referencia a la SEQ NO: 1.
10. La molécula quimérica de la reivindicación 9, en la que el ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene capacidad de reconocimiento del antígeno.
- 10 11. Un método para inhibir el crecimiento de una célula objetivo que tiene un exterior, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una molécula quimérica, comprendiendo la molécula quimérica:
- (a) un ligando que se une específicamente a un antígeno o receptor en el exterior de la célula, en el que el ligando está conjugado o fusionado a
- (b) la PE mutada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8,
- 15 en donde la molécula quimérica carece de residuos de aminoácidos contiguos 1-273 y 285-364 como se define mediante referencia a la SEQ. ID NO: 1, y
- en donde el contacto de la molécula quimérica con la célula inhibe el crecimiento de la célula.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene capacidad de reconocimiento del antígeno.
- 20 13. Un ácido nucleico aislado que codifica la PE mutada de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8.
14. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 13, en el que el ácido nucleico codifica además un ligando que se une específicamente a un antígeno o receptor en una superficie celular, en donde el ligando se fusiona directamente o a través de un enlazador peptídico a la PE.
- 25 15. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 14, en el que el ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene capacidad de unión al antígeno.

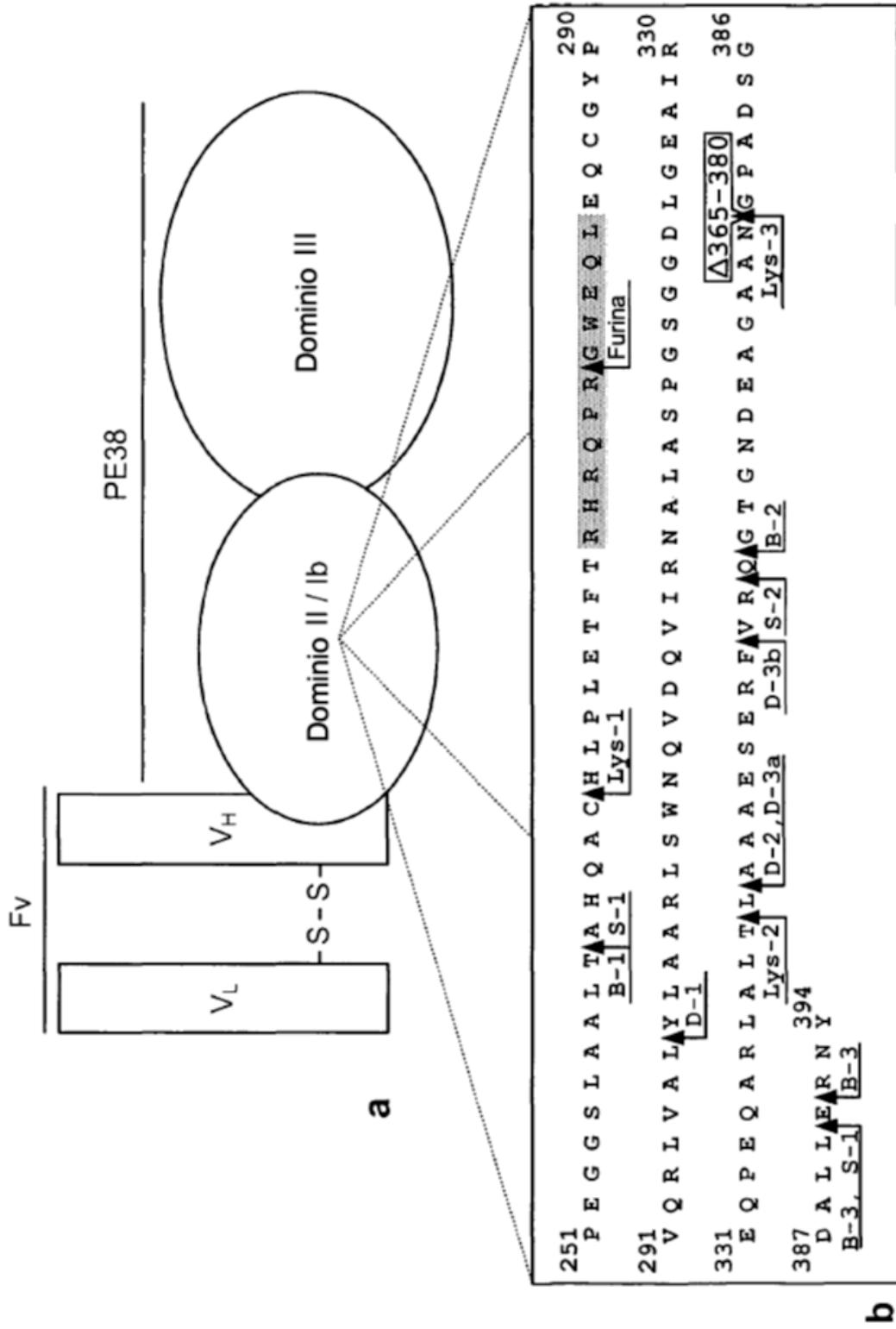
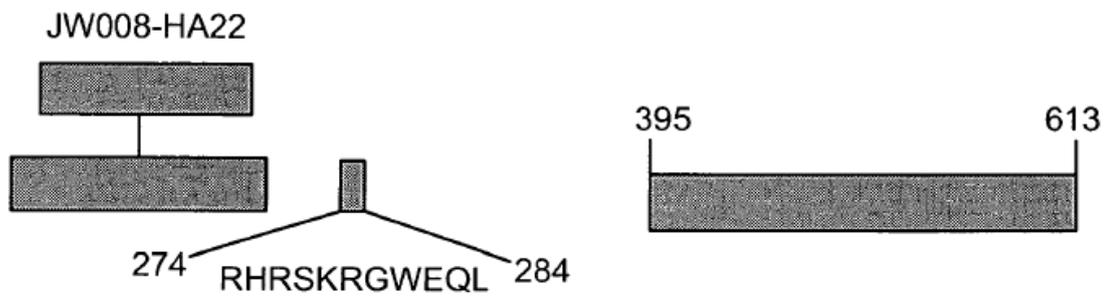
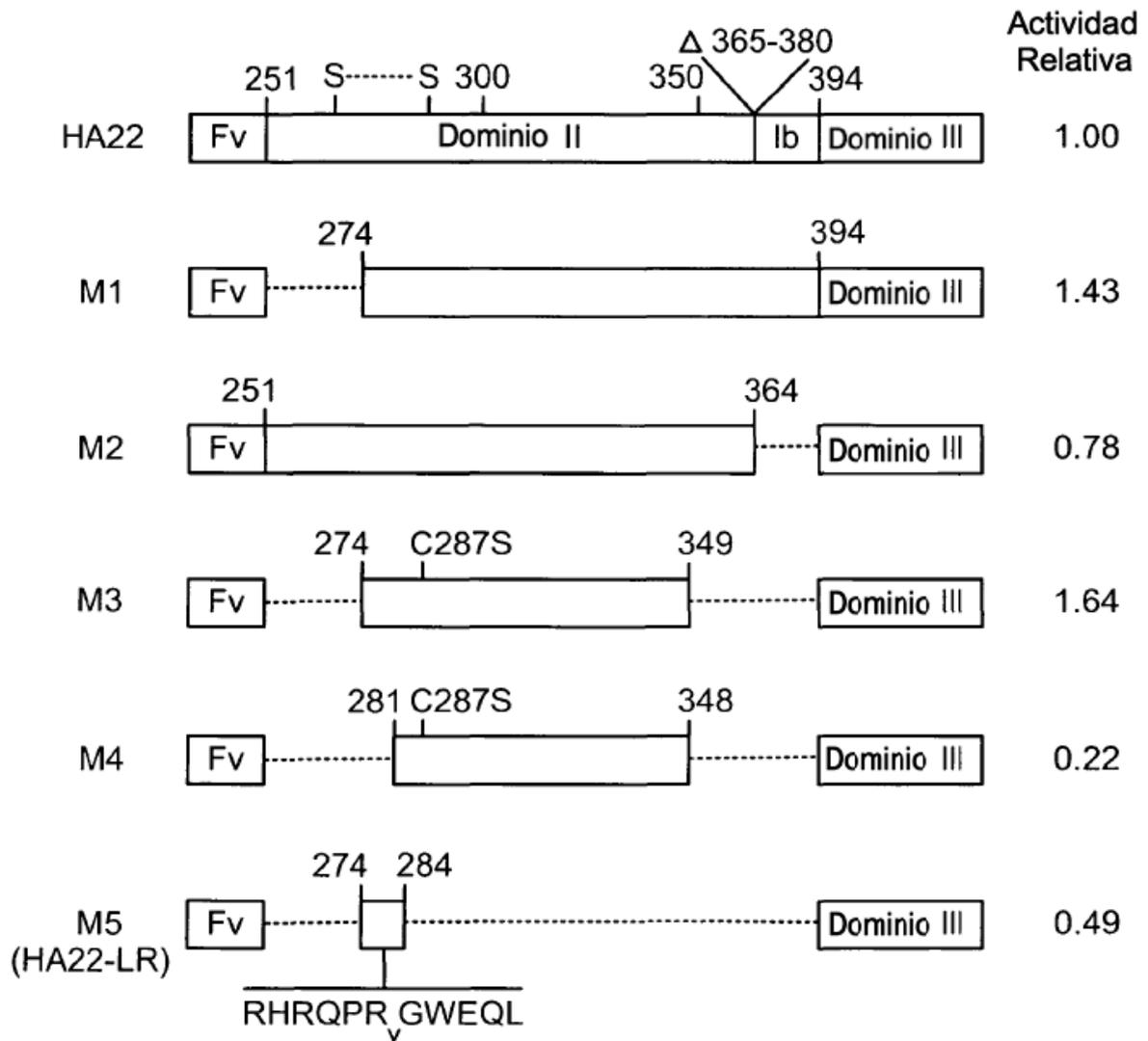


FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3**

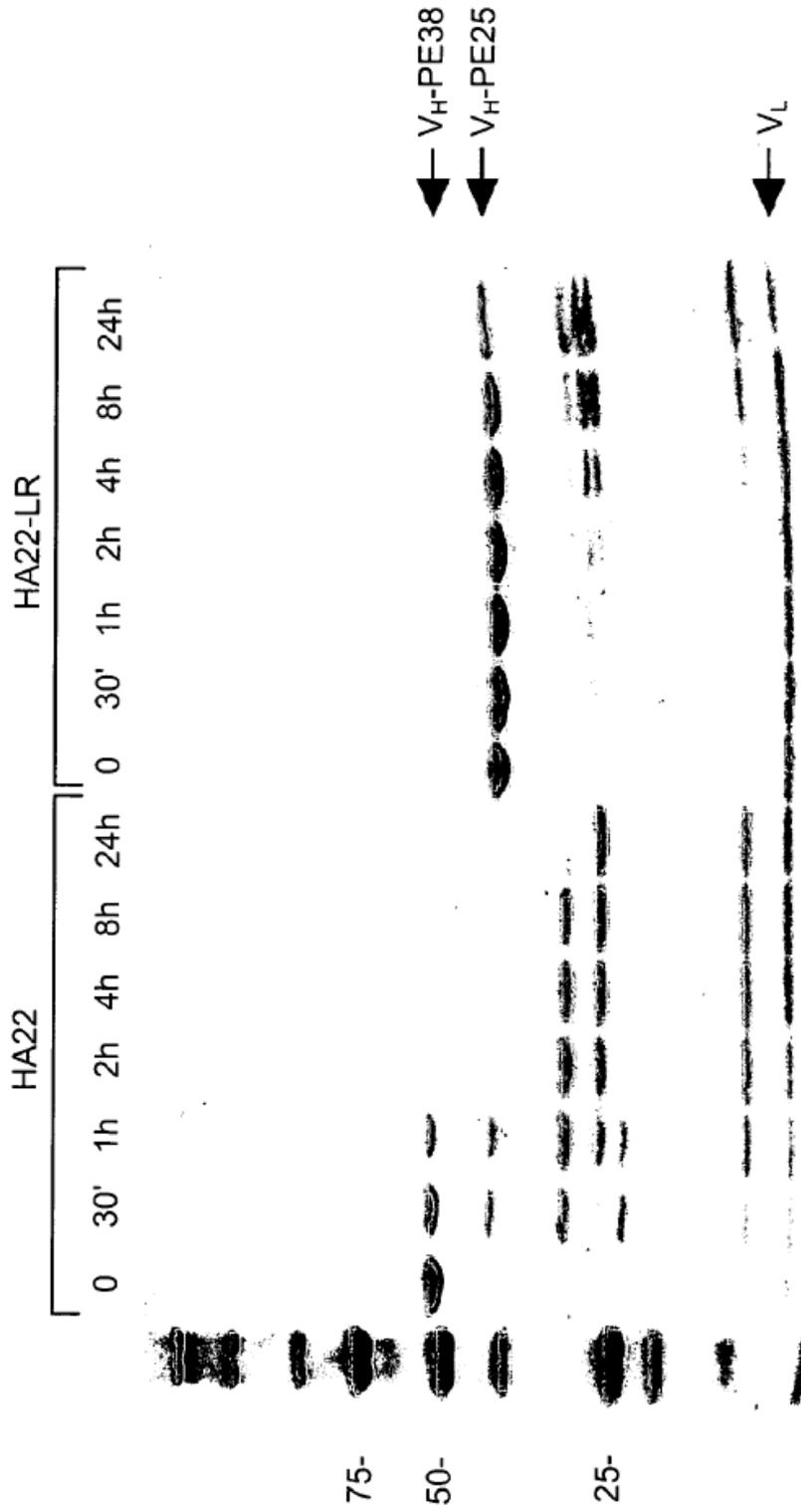
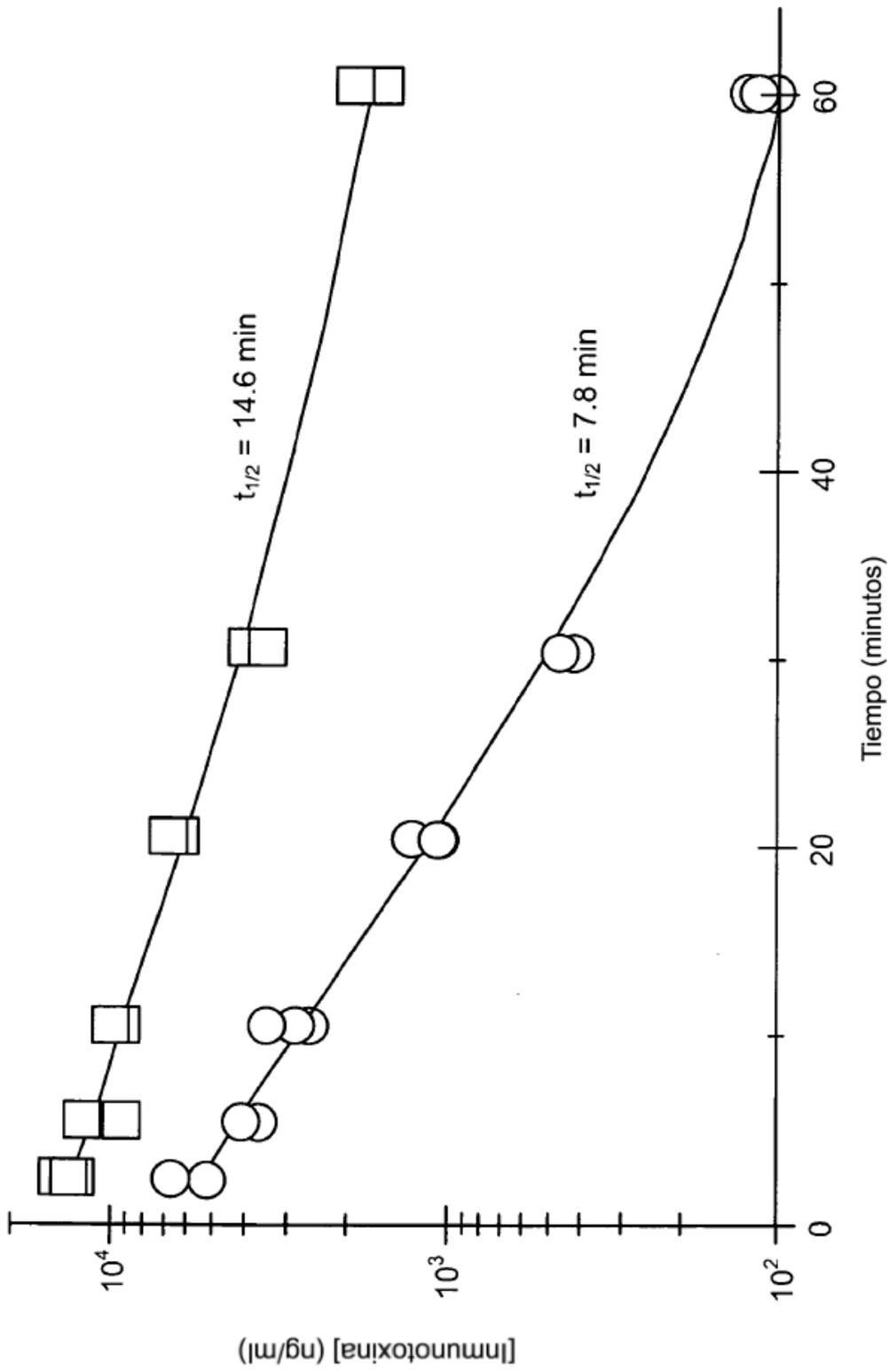


FIG. 4



**FIG. 5**

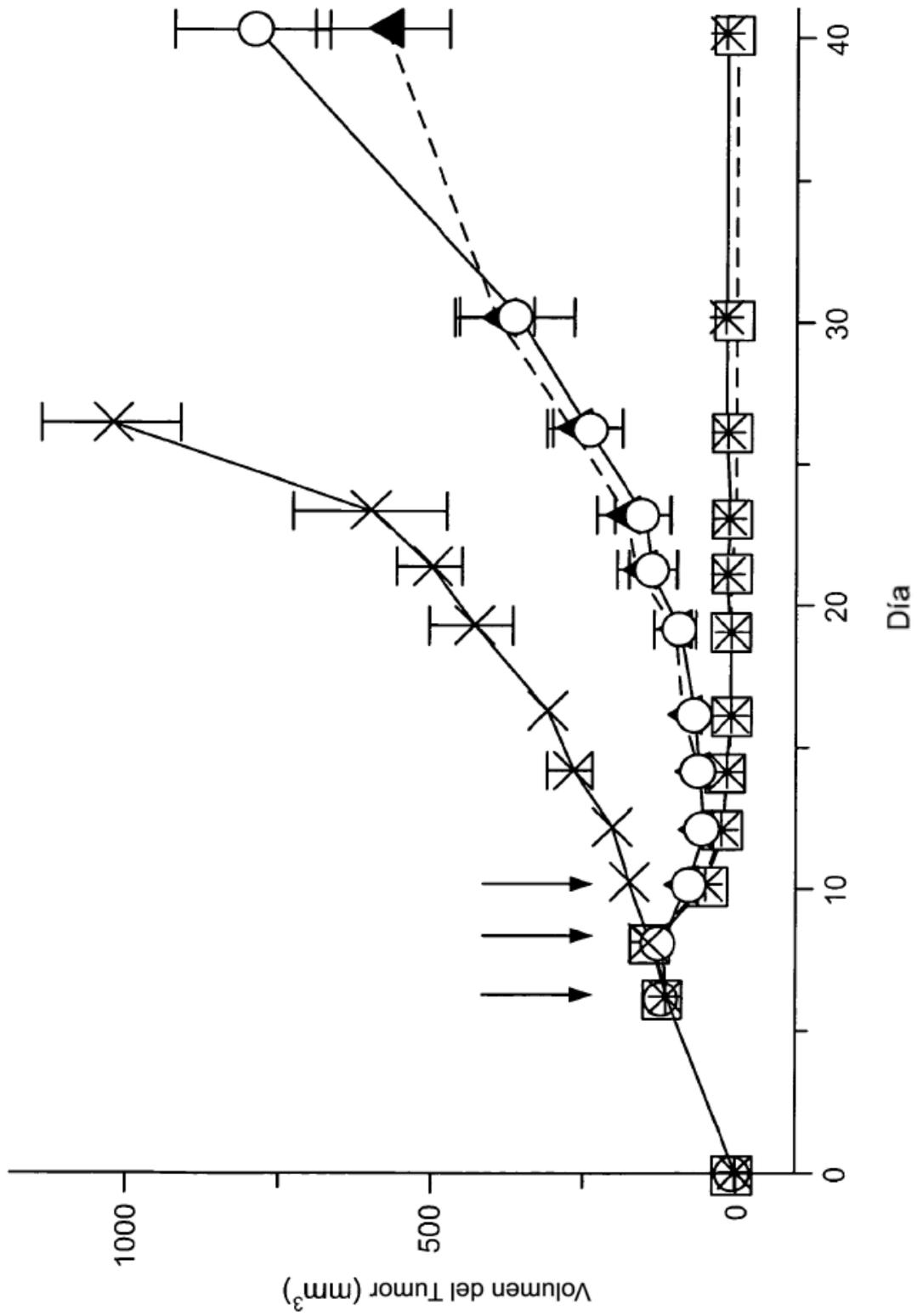


FIG. 6