Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** 05-3465

54. **TITULO** Uso de Urocso para inhibir el crecimiento de células cancerosas

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** A 61 K 38 50

71. **SOLICITANTE** HELIX BIOPHARMA CORP

DOMICILIO CANADA

74. **APODERADO** DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. **BOGOTA, D.C.,** OCTUBRE 19, 2005

(FORMA P-10)

55

PETIT

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05003465 00000000 Folios: 263
Fecha (MM): 2005-01-18 16:23:18
Tramite : 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capitulo I. ☒ Capitulo II.

2) SOLICITANTE (71)	**Nombre: HELIX BIOPHARMA CORP** **Dirección: 3-305 Industrial Parkway South, Aurora Ontario L4G 6X7** **Nacionalidad o domicilio: CANADA** **Lugar de constitución:CANADA**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☐ **NIT:** ☒ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **Cual** _____ **NÚMERO**_____
	Teléfono: **Fax:** **E. Mail:**	
3) REPRESENTANTE APODERADO	**Nombre:** DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN **Dirección:** Carrera 11 N°. 93-43 Of. 404 Santafé de Bogotá D.C. **Teléfono:** 6350835 **Fax:** 6350824 **E. Mail:** clarkemodet@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☒ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **NÚMERO:** 41.654.882 **TP:** 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	**Nombre: 1. CHAO, Herman; 2. WONG, Wah; 3.SEGAL, Donald; 4.McELROY, Jerry ; 5. DOCHERTY, John; 6.DICKSTEIN, Jodl** **Dirección: 1. 20 Gilbank Drive, Aurora, Ontario L4G 5G4 CANADA** **2.17915 77th Avenue, Edmonton, Alberta T5T 2S1 CANADA** **3.Rural Route 3, Stouffville, Ontario L4A 7X4 CANADA** **4. 26 High Oak Trail, Richmond Hill, Ontario L4E 3L0 CANADA** **5. 65 Ostick St., Aurora, Ontario L4G 7K4 CANADA** **6. 18 Cornell Park Av., Markham, Ontario L6B 1B5 CANADA** **Nacionalidad o Domicilio: 1. CANADIENSE; 2. CANADIENSE; 3. CANADIENSE; 4. CANADIENSE; 5. CANADIENSE**	

5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/CA2003/001061 Fecha: Julio 16, 2003
Publicación Internacional No. WO 2004/009112 A1 Fecha: Enero 29, 2004

6)Título (54) USO DE UREASA PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS CANCEROSAS

7) Clasificación Internacional: A61K 38/50

8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐

33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
ESTADOS UNIDOS	Juli 18, 2002	60/397244

9) Comprobantes de pago N°. 04.96.048 Fecha: Diciembre 13 de 2004
N°. 05.252 Fecha: Enero 3 de 2005

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05003465 00000000 Folios: 283
Fecha (AMD): 2005-01-18 16:23:10
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FREE MACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 4 - 96,048
FECHA : DICIEMBRE 13 DE 2004

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	37353687	13/12/2004	3,250,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL : $	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

P610

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05003465 00000000 Folios: 283
Fecha (AMD): 2005-01-18 16:23:10
Tramite : 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 05 - 252
FECHA : ENERO 3 DE 2005

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBCONSIGNACION		BANCO POPULAR	050-00110-6	37333690	03/01/2005	392,500.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99	OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	21,000.
			TOTAL : $	21,000.00

SON: VEINTIUNO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- [ ] Poderes, si fuera el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- [x] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

- [x] Otros
  1. Petitorio PCT
  2. Informe de Búsqueda Internacional
  3. Petitorio de solicitud de Examen Preliminar Internacional
  4. Opinión escrita y respuesta a la opinión escrita
  5. Traducción anexos de IPER.

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogota .TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

GKJ 5

USO DE UREASA PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE CELULAS CANCEROSAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con métodos terapéuticos anticáncer que emplean proteínas ureasas y polipéptidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer contribuye a un quinto de la mortalidad total en los Estados Unidos, y es la segunda causa principal de muerte. El cáncer se caracteriza típicamente por la división descontrolada de una población de células. Esta división descontrolada puede implicar a células sanguíneas, como varios tipos de linfomas, y células que se agregan en o son nativas para un tejido u órgano particular, por ejemplo tumores sólidos, como tumores secundarios o primarios de mama, hígado, esófago, estómago, intestinos, cerebro, huesos o próstata.

Ha sido propuesta una modalidad de variedades de tratamiento para la terapia del cáncer. Esas incluyen la resección quirúrgica de tumores sólidos, tratamiento con radiación, como rayos X, quimioterapia, terapia inmune y terapia genética. El tipo de terapia que sea seleccionado

para un cáncer dado dependerá de factores como la edad del paciente, grado de localización del cáncer, y el tipo y etapa del cáncer. Con frecuencia la terapia implicará una combinación de dos o más modalidades, como terapia con rayos X en combinación con quimioterapia, o con inmunoterapia en combinación con quimioterapia.

Ha sido empleado un gran número de compuestos y composiciones y estrategias quimioterapéuticas para tratar los cánceres. Muchos compuestos antineoplásicos están diseñados para perturbar la replicación en células que se dividen rápidamente, o para inhibir un enlace metabólico clave en células que proliferan activamente. Esos métodos han cumplido con los niveles de éxito en ciertos tipos de cánceres, o cánceres en ciertas etapas, la quimioterapia generalmente está asociada con efectos laterales desagradables o debilitantes, como malestar, nauseas, pérdida de apetito, alopecia y anemia. Además, los compuestos que actúan al nivel de la replicación celular, ya sea introduciendo análogos nucleotídicos o en células en división, o perturbando la replicación normal, tienen el potencial de introducir mutaciones genéticas que se propagan en las celular normales del sujeto. Además, las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a muchos tipos de agentes antitumorales, limitando la absorción del agente en las células, o al

alterar el metabolismo del agente dentro de las células.

En respuesta a esas limitaciones, se han desarrollado intentos por modificar los agentes quimioterapéuticos para reducir sus efectos laterales, superar los problemas de resistencia, o mejorar su capacidad de hacer blanco en sitios tumorales seleccionados. Aunque esos esfuerzos han producido resultados terapéuticos mejorados en algunos casos, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un agente y método quimioterapéuticos mejorados. En particular, ese agente deberá ser efectivo para matar o inhibir el crecimiento en células cancerosas, deberá ser relativamente no tóxico tanto en términos de los efectos laterales y en los efectos a largo plazo sobre la integridad genética del sujeto tratado, y preferiblemente liberable en una forma que permita la introducción directa en un tumor o hacer blanco selectivamente en tumores.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona una composición farmacéutica para usarse para inhibir el crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. La composición incluye una enzima ureasa, como una ureasa de bacteria o planta, y una entidad química asociada con la ureasa para

mejorar la liberación de la enzima a células cancerosas, cuando la composición sea administrada al sujeto.

En una modalidad, la entidad química incluye un polímero hidrofílico conjugado con la ureasa en una cantidad efectiva para extender el tiempo de circulación en la sangre o reducir la antigenicidad de la composición en relación a la ureasa nativa. El polímero puede ser, por ejemplo, polietilen glicol, polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polihidroxipropil metacrilamida, metacrilato de polihidroxipropilo, acrilato de polihidorxietilo, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polohidroxietiloxazolina, polihidroxipropioxazolina, poliaspartamida o derivados hidrofílicos de celulosa. El polímero es preferiblemente un polímero de cadena lineal, como polietilen glicol de cadena lineal, que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1,000 y 10,000 daltons.

La entidad química puede ser una entidad que elige el blanco unida a la urea, como un anticuerpo anti-antígeno tumoral, anticuerpo anti-hCG, o un ligando capaz de unirse específicamente a receptores de la superficie de células cancerosas. Cuando la entidad que elige el blanco es un polipéptido, la composición puede ser una proteína de fusión de la entidad que elige el blanco y

enzima ureasa. De manera alternativa, donde la ureasa puede incluir, en su C- o N- terminal, un primer péptido formador de espiral caracterizado por una carga seleccionada y una capacidad de interactuar con un segundo péptido formador de espiral cargado opuestamente para formar un heterodímero espiral enrollado α-helicoidal estable; y la entidad química puede incluir una entidad que elige el blanco que incluya el segundo péptido formador de espiral.

La entidad química puede incluir vesículas que tengan enzima ureasa en forma atrapada. Las vesículas ejemplares incluyen liposomas, los cuales circulan mucho tiempo en virtud de un recubrimiento exterior de cadenas de polietilen glicol y tienen tamaño para extravasarse hacia las regiones tumorales, cuando la composición es administrada intravenosamente, y liposomas que tienen entidades directoras unidas a la superficie. Las vesículas pueden incluir agentes adicionales, como urea, un agente antitumoral terapéuticamente activo o un agente formador de imágenes.

La entidad química puede incluir un inhibidor de ureasa asociado con ella, en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de la enzima.

En otro aspecto, la invención incluye un método para inhibir el crecimiento de células cancerosas en un

sujeto mamífero. El método incluye exponer las células a ureasa en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de las células cancerosas.

Donde las células cancerosas comprenden un tumor sólido, la ureasa puede ser inyectada directamente en el tumor del sujeto, o por administración parenteral, por ejemplo, inyección, además por administración directa. Además de la ureasa en un vehículo farmacéuticamente aceptable, las diferentes composiciones que contienen ureasa mostradas anteriormente son adecuadas para usarse en la invención.

El método puede incluir modular la ureasa sobre células cancerosas mediante la administración a un sujeto, de una cantidad un inhibidor de ureasa efectivo para reducir la actividad de la ureasa sobre las células cancerosas. La actividad de la ureasa puede ser modulada en la dirección opuesta administrando urea al sujeto, antes, durante o después de la administración de ureasa.

La ureasa puede ser administrada en dos etapas: una primera etapa que implica un conjugado de una entidad que elige el blanco tumoral y una primer entidad de unión que tienen la capacidad de interactuar con una segunda entidad de unión; y un segundo conjugado de la segunda etapa que comprende la segunda entidad de unión conjugada con ureasa.

En otra modalidad más, el método puede incluir administrar al sujeto, una composición de terapia genética compuesta de un vector que elige el blanco efectivo, cuando se administra al sujeto, de células cancerosas que se transfectan selectivamente, y soportando el vector, una secuencia de ácido nucleico recombinante efectiva para reducir una ARNm ureasa en células cancerosas transfectadas. Un vector ejemplar es un adenovirus. Una secuencia de ácido nucleico ejemplar codifica para ureasa y una secuencia líder secretora que es efectiva para remover la secreción de la ureasa de células cancerosas transfectadas.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para mejorar la eficacia terapéutica de un compuesto antitumoral débilmente básico cuya efectividad es reducida por un gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido, en un sujeto que reciba el agente para el tratamiento del tumor. Este método implica administrar al sujeto una cantidad de ureasa efectiva para reducir o revertir el gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido. Preferiblemente, la cantidad de ureasa administrada es efectiva para elevar el fluido extracelular del tumor a un pH de al menos 7.2. La ureasa puede ser inyectada

directamente al tumor, o por administración parenteral además de la administración directa, como anteriormente.

El compuesto antitumoral puede ser, por ejemplo, doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, epuribucina, mitomicina, bleomicina, alcaloides de vinca como la vinblastina y vincristina, agentes alquilantes, como la ciclofosfamida y clorhidrato de mecloretamina y derivados de purina o pirimidina antineoplásicos.

En otro aspecto más, la invención es útil para evaluar la presencia, tamaño o condición de un tumor sólido en un sujeto. Aquí, se administra ureasa al sujeto que contiene, o se sospecha contiene, un tumor sólido, bajo condiciones efectivas para localizar la ureasa en un tumor sólido en el sujeto. El sujeto es entonces diagnosticado con una herramienta de diagnóstico, como la fluoroscopia, MRI, o tomografía de emisión positrónica, capaz de detectar cambios en el pH extracelular en un tejido del sujeto, en presencia o ausencia de un reportero sensible al pH, para identificar una región tisular dentro del sujeto que muestre una elevación en el pH extracelular.

Este método puede ser usado en conjunto con el método de tratamiento anterior para evaluar el grado y/o efectividad de la dosis o prueba del tratamiento con ureasa. De este modo, por ejemplo, con la administración

de ureasa a un sujeto, la extensión y grado de cambio del pH a una región tumoral pueden ser seguidos para guiar la administración de ureasa, o para evaluar cambios en el tamaño del tumor o extensión durante el tratamiento.

También se describe un equipo para usarse en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. El equipo tiene una composición farmacéutica que contiene enzima ureasa, y materiales instructivos que enseñan la administración de la composición al sujeto, para el tratamiento de un cáncer en el sujeto.

El material instructivo puede enseñar la administración de la composición de ureasa en un sujeto en una cantidad que dependa del tamaño del tumor y de entre 0.1 a 100 unidades internacionales, preferiblemente de 0.5 a 10, de actividad de ureasa por mm^3 de tumor, cuando la composición es administrada por inyección directa al tumor, y en una cantidad de entre 100-100,000 unidades internacionales/kg, preferiblemente 500-10,000 unidades internacionales/kg unidades internacionales de actividad de ureasa/kg de peso corporal del sujeto, cuando la composición sea administrada parenteralmente al sujeto además de por inyección directa en el tumor.

El material instructivo puede enseñar la administración de ureasa a un sujeto que también esté

recibiendo un compuesto antitumoral débilmente básico cuya efectividad sea reducida por un gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido, en una cantidad de ureasa efectiva para reducir o revertir el gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido.

El material instructivo puede enseñar la administración de ureasa a un sujeto que contenga, o se sospeche que contenga, un tumor sólido, bajo condiciones efectivas para localizar la ureasa en un tumor sólido en el sujeto, interrogar al sujeto con una herramienta de diagnóstico capaz de detectar cambios en el pH extracelular en un tejido del sujeto, e identificar una región tisular dentro del sujeto que muestre una elevación en el pH extracelular después de la administración.

También se describe una composición de terapia genética para usarse para inhibir el crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. Esta composición incluye, como se hizo notar anteriormente, un vector que elige el blanco efectivo, cuando se administra al sujeto, o células cancerosas que se transfectan selectivamente, y soportado en el vector, una secuencia de ácido nucleico recombinante efectiva para producir un ARNm de ureasa en células cancerosas transfectadas.

Esos y otros objetivos y características de la invención se volverán más evidentes cuando la siguiente descripción detallada de la invención sea leída en conjunto con los dibujos acompañantes.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1D ilustran los pasos de la reacción de ureasa. La urea es escindida por la ureasa para producir una molécula de amoniaco y una de carbamato (A). El carbamato se descompone espontáneamente a amoniaco y ácido carbónico (B). El ácido carbónico se equilibra en agua (C), como lo hacen las dos moléculas de amoniaco, las cuales se protonarán para producir iones amonio e hidróxido (D). La reacción da como resultado un aumento del pH del ambiente de reacción.

La Figura 2 muestra el perfil de espectrometría de masas de una muestra cruda que contiene ureasa preparada de acuerdo con una modalidad de la invención.

La Figura 3 ilustra los perfiles de purificación por afinidad de ureasa durante varias etapas del proceso de purificación, de acuerdo con otra modalidad de la invención;

La Figura 4 ilustra la purificación del conjugado de E-coli-αhEGFR IgG por una columna de proteína G preparada de acuerdo a la invención; y

La Figura 5 muestra el título de anticuerpo de conjugado de E-coli-αhEGFR IgG purificado preparado de acuerdo a una modalidad de la invención, de acuerdo a lo determinado por ELISA de espiral K inmovilizado.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

A menos que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que les daría un experto en la técnica de la presente invención. Se dirige particularmente a los practicantes a Sambrook et al. (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Press, 3era Ed., and Ausubel, F.M. et al (1993) in Current Protocols in Molecular Biology, para las definiciones y términos de la técnica. Debe comprenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos, puesto que esos pueden variar.

El término "ureasa" se refiere a una enzima que tiene la actividad enzimática de una urea amidohidrolasa (E.C. 3.5.1.5), natural u obtenida por ejemplo, por técnicas de ácido nucleico recombinante y/o síntesis química. La ureasa también incluye proteínas de fusión que comprende toda la ureasa, subunidades, o fragmentos de la misma, y/o ureasa con sustituciones, supresiones o

adiciones de aminoácidos que preservan la actividad de urea amidohidrolasa del polipéptido. Una secuencia de ureasa truncada como se usa aquí es un fragmento de ureasa que está libre de una porción de la secuencia de ureasa intacta comenzando en el amino o carboxi terminal de la ureasa. Los métodos para aislar ureasa nativa, para sintetizar ureasa de manera recombinante, y para identificar fragmentos activos y polipéptidos de ureasa modificados se dan más adelante.

El significado del término "cáncer" se refiere a una célula o células, o una masa de célula de tejido anormal. El crecimiento de esas células o tejidos excede y no está coordinado con el de tejidos normales o células, y persiste en la misma forma excesiva después de cesar los estímulos que evocaron el cambio. Esos tejidos o células neoplásticas muestran una ausencia de organización y coordinación estructural en relación a tejidos o células normales, la cual puede dar como resultado una masa de tejidos o células que pueden ser benignas o malignas. Como se usa aquí, cáncer incluye cualquier neoplasma. Esto incluye, pero no se limita a, melanoma, adenocarcinoma, glioma maligno, carcinoma prostático, carcinoma renal, carcinoma de vejiga, carcinoma pancreático, carcinoma tiroideo, carcinoma pulmonar, carcinoma de colon, carcinoma rectal, carcinoma

cerebral, carcinoma hepático, carcinoma de mama, carcinoma ovárico, y similares.

Un "tumor" o "tumor sólido" se refiere a una masa cohesiva de células cancerosas, incluyendo pero sin limitarse a tumores semisólidos y sólidos, metástasis de tumores sólidos, angiofibromas, fibroplásica retrolental, hemangiomas y sarcoma de Karposi.

Como se usa aquí, el término "porción que elige el blanco" se refiere a una molécula que se une a una población definida de células o tipo de células seleccionado. La entidad que elige el blanco puede unirse a un receptor, a un oligonucleótido, un sustrato enzimático, un determinante antigénico, u otro sitio de unión presente sobre o en la célula o población de células blanco. Una entidad que elige un blanco ejemplar es un anticuerpo. También se contemplaron como entidades que eligen el blanco fragmentos de anticuerpo y secuencia peptídicas pequeñas capaces de reconocer antígenos expresados.

Como se usa aquí, el término "inhibe el crecimiento de células cancerosas" o "que inhibe el crecimiento de células cancerosas" se refiere a una disminución de la velocidad de proliferación y/o migración de células cancerosas, interrupción de la proliferación y/o migración de células cancerosas, o

eliminación de células cancerosas, puesto que la velocidad de crecimiento de las células cancerosas se reduce en comparación con la velocidad de crecimiento observada o predicha de una célula cancerosa control no tratada. El término "inhibe el crecimiento" también puede referirse a una reducción en el tamaño o desaparición de una célula o tumor canceroso, así como a una reducción en su potencial metastático. Preferiblemente, esa inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, interrumpir el crecimiento, reducir la agresividad, o prevenir o inhibir la metástasis de un cáncer en un paciente. Aquellos expertos en la técnica determinarán fácilmente, por cualquiera de una variedad de indicaciones adecuadas, si se inhibió el crecimiento de la célula cancerosa.

La inhibición del crecimiento de células cancerosas puede ser evidenciado, por ejemplo, por la interrupción de las células cancerosas en una fase particular del ciclo celular, por ejemplo, interrupción en la fase G2/M del ciclo celular. La inhibición del crecimiento de células cancerosas también puede ser evidenciado por la medición directa o indirecta del tamaño de la célula o tumor canceroso. En paciente humanos con cáncer, esas mediciones se hacen generalmente usando métodos de formación de imágenes bien conocidos como la formación de imágenes por resonancia magnética,

tomografía axial computarizada y rayos X. El crecimiento de las células cancerosas también puede ser determinado indirectamente, como determinando los niveles de antígeno carcinoembriónico circulante, antígeno específico de la próstata u otros antígenos específicos del cáncer que se correlacionen con el crecimiento de células cancerosas. La inhibición del crecimiento del cáncer también se correlaciona, generalmente, con una sobrevivencia prolongada y/o mejoría de la salud y bienestar del sujeto.

Como se usa aquí, el término "induce apoptosis" se refiere a la promoción de una forma de muerte celular programada caracterizada por la fragmentación del ADN. La apoptosis puede ser determinada por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se encuentran comercialmente disponibles equipos que detectan la presencia de ADN fragmentado por inmunohistoquímica *in situ* (por ejemplo, Apoptag, disponible Intergen, Purchase, N.Y.). Adicionalmente, la apoptosis también puede ser determinada por análisis FACS, en el cual las células apoptóticas exhiben un contenido de ADN sub_G1, que indican la fragmentación del ADN .

Como se usa aquí, un "anticuerpo" se refiere a un péptido, un polipéptido, o proteína que comprende uno o más péptidos o polipéptidos sustancial o parcialmente

codificados por al menos una molécula de ácido nucleico de inmunoglobulina o gen o fragmento de inmunoglobulina de al menos una molécula de inmunoglobulina o gen de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen a los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como miles de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, lo cual a su vez define las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina típica (por ejemplo, anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está comprendido de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kD). El N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos "cadena ligera variable" (VL) y "cadena pesada variable" (VH) se refieren a esas cadenas ligera y pesada, respectivamente. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión

con varias peptidasas. De este modo, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuros en la región de la bisagra para producir F(ab)'2, un dímero de FAB el cual en sí es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab)'2 puede ser reducido bajo condiciones moderadas para romper el enlace disulfuro en la región de la bisagra, convirtiendo por lo tanto el dímero de (Fab')2 en un monómero de Fab'. El monómero de Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región de la bisagra (véase *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Aunque los diferentes fragmentos de anticuerpos son definidos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la técnica apreciará que esos fragmentos de Fab' pueden ser sintetizados *de novo* ya sea químicamente o utilizando la metodología del ADN recombinante. De este modo, el término "anticuerpo", como se usa aquí, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos incluyen anticuerpos de una sola cadena, incluyendo anticuerpos Fv (sFv) de una sola cadena en los cuales una VH y una VL están unidas juntas (directamente o a través

de un enlazante peptídico) para formar un polipéptido continuo.

Un "fragmento de unión de antígeno" de un anticuerpo es un fragmento de péptido o polipéptido del anticuerpo que se une a un antígeno. Un sitio de unión de antígeno está formado por aquellos aminoácidos del anticuerpo que contribuyen a, como están implicados en, o afectan la unión del antígeno. Véase Scott, T.A. y Mercer, E.I., CONCISE ENCYCLOPEDIA: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (de Gruyter, 3ra ed. 1997) y Watson, J. D. et al., RECOMBINANT DNA (2da ed. 1992), cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o modificada genéticamente que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo.

Los términos "agente activo", "fármaco" y "agente farmacológicamente activo" son usados de manera intercambiable aquí para referirse a un material o compuesto químico el cual, cuando es administrado a un sujeto induce un efecto farmacológico deseado, y se pretende que incluya un agente de diagnóstico o terapéutico, incluyendo radionúclidos, fármacos, agentes anticáncer, toxinas y similares. Preferiblemente, el

término agente activo incluye proteínas, glicoproteínas, péptidos naturales y sintéticos, alcaloides, polisacáridos, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas y similares. De manera más preferible, el término agente activo se refiere a proteínas. Un agente activo ejemplar es la ureasa.

Un agente activo "sensible al pH" se refiere a un agente activo cuya capacidad para inducir un efecto farmacológico deseado depende, al menos en parte, del pH del ambiente extracelular circundante.

El término "agente de eliminación", como se usa aquí, se refiere a un agente capaz de unirse, complejarse o asociarse de otro modo con una entidad administrada, por ejemplo entidad que elige el blanco-ligando, entidad que elige el blanco-anti-ligando o anti-ligando solo, presente en la circulación del receptor, facilitando por lo tanto la eliminación de la entidad en circulación del cuerpo del receptor, remoción de la circulación sanguínea o inactivación de la misma en circulación. El agente de eliminación se caracteriza principalmente por propiedades físicas, como el tamaño, carga, configuración o una combinación de las mismas, que limita el acceso del agente de eliminación a la población de células blanco reconocidas por una entidad que elige el blanco usada en el mismo protocolo de tratamiento como el agente de

eliminación.

El significado del término "agente para la formación de imágenes" se refiere a compuestos que pueden ser detectados.

El término "adyuvante" se refiere a una sustancia o agente agregado a una formulación o composición para ayudar a la operación del ingrediente principal.

Los términos fluidos "intersticial" y "extracelular" se refieren al fluido que se encuentra entre o que baña a las células de los mamíferos.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan de manera intercambiable aquí para referirse a cualquier blanco del tratamiento. También es proporcionado por la presente invención un método para tratar células tumorales *in situ*, o en su posición o ubicación normal, por ejemplo, células neoplásicas de tumores de mama o próstata. Esos tumores *in situ* pueden localizarse dentro de o sobre una variedad de anfitriones, por ejemplo, anfitriones humanos, anfitriones caninos, anfitriones felinos, anfitriones equinos, anfitriones bovinos, anfitriones porcinos y similares. Cualquier anfitrión en el cual se encuentre un tumor o células tumorales puede ser tratado y estar de acuerdo con la presente invención. Un sujeto de este modo

incluye un vertebrado, preferiblemente un mamífero, de manera más preferible un humano.

Por "tiempo de retención de la célula blanco" se entiende la cantidad de tiempo que una molécula de ureasa u otro agente activo permanece en la superficie de la célula blanco o dentro de la célula blanco.

Como se usa aquí, el término "conjugado" abarca conjugados químicos (unidos covalente o no covalentemente), proteínas de fusión y similares.

Los términos "proteína", "polipéptido" o "péptido" como se usan aquí, se refieren, de manera intercambiable, a un biopolímero compuesto de aminoácidos o subunidades análogas de aminoácidos, típicamente algunos o todos los 20 L-aminoácidos comunes encontrados en las proteínas biológicas, ligadas por enlaces peptídicos intersubunidad u otros enlaces intersubunidad. La proteína tiene una estructura primaria representada por la secuencia de su subunidad, y puede tener estructuras secundarias helicoidales o plegadas, así como una estructura total tridimensional. Aunque "proteína" se refiere comúnmente a un polipéptido relativamente largo, por ejemplo, que contiene 100 o más aminoácidos y "péptido" a polipéptidos más pequeños, los términos se usan de manera intercambiable aquí. Es decir, que el término "proteína" puede referirse a un péptido más

grande, así como a un péptido más pequeño, y viceversa.

Un "modulador de ureasa" es un inhibidor de ureasa o un mejorador de ureasa.

Un "inhibidor de ureasa" comprende una molécula o grupo de moléculas que interfiere con: (1) la expresión, modificación, regulación, activación o degradación de ureasa; o (2) una o más de las funciones normales de la ureasa. Las funciones normales de la ureasa incluyen la hidrólisis de urea, que conduce a la producción de carbamato y amoniaco. Un inhibidor "actúa directamente sobre la ureasa" cuando el inhibidor se une a la ureasa vía interacciones electrostáticas o químicas. Esas interacciones pueden o no ser mediada por otras moléculas. Un inhibidor actúa "indirectamente sobre la ureasa" cuando su efecto más inmediato es sobre una molécula diferente a la ureasa que tiene influencia sobre la expresión, activación o funcionamiento de la ureasa.

Un "mejorador de ureasa" comprende una molécula o grupo de moléculas que mejora: (1) la expresión, modificación, regulación o activación de la ureasa; o (2) una o más de las funciones normales de la ureasa. Un mejorar actúa "indirectamente sobre la ureasa" cuando su efecto más inmediato es sobre una molécula diferente a la ureasa la cual tiene influencia sobre la expresión, activación y funcionamiento de la ureasa.

Una "mutación modificada" en un gen de ureasa comprende un cambio en la secuencia nucleotídica del gen de la ureasa que da como resultado la producción de (1) cantidades incrementadas o reducidas de proteína de ureasa en relación a las cantidades producidas en ausencia de ese cambio; o (2) proteína ureasa que tiene funciones normales aumentadas o mejoradas en relación a las funciones en ausencia de esos cambios.

El término "composición farmacéutica" significa una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto, incluyendo un animal o humano. Una composición farmacéutica generalmente comprende una cantidad efectiva de un agente activo y un vehículo, incluyendo por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una "formulación farmacéuticamente aceptable" comprende una formulación que es adecuada para administrar el agente activo (por ejemplo, ureasa o modulador de la ureasa) de tal manera que da los resultados deseados y no produce efectos laterales adversos suficientes para convencer a un médico de que el peligro potencial a un paciente es menor que el beneficio potencial a ese paciente. El ingrediente básico para una formulación inyectable es típicamente un vehículo acuoso. Los vehículos acuosos que son útiles incluyen solución de cloruro de sodio (NaCl), solución de Ringer, solución de

NaCl/dextrosa, y similares. Los vehículos miscibles en agua también son útiles para afectar la solubilidad total del agente activo. Los agentes antimicrobianos, amortiguadores y antioxidantes pueden ser útiles, dependiendo de la necesidad. Igualmente, una sal "farmacéuticamente aceptable" o un derivado "farmacéuticamente aceptable" de un compuesto, como se proporciona aquí, es una sal u otro derivado que no es biológicamente o de otro modo indeseable.

El término "liberación controlada" pretende referirse a cualquier formulación que contenga un fármaco en la cual la forma y perfil de liberación del fármaco de la formulación están controladas. El término "liberación controlada" se refiere a formulaciones de liberación inmediata así como no inmediata, con las formulaciones de liberación no inmediata incluyendo pero sin limitarse a formulaciones de liberación sostenida y liberación retardada.

El término "liberación sostenida" (también referido como "liberación prolongada") se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco durante un periodo de tiempo prolongado, y que, preferiblemente, aunque no necesariamente da como resultado niveles de sangre sustancialmente constante de

un fármaco durante un periodo de tiempo prolongado. El término "liberación retardada" se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco en la cual existe un retraso de tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco de la misma. La "liberación retardada" puede o no implicar la liberación gradual del fármaco durante un periodo de tiempo prolongado, y de este modo puede o no ser una "liberación sostenida".

Un "tratamiento terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta síntomas o signos de patología, enfermedad, o trastorno, en el cual el tratamiento es administrado al sujeto con el propósito de disminuir o eliminar aquellos signos o síntomas de la patología, enfermedad o trastorno. Una "actividad terapéutica" es una actividad de un agente, como un ácido nucleico, vector, polipéptido, proteína, sustancia o composición de la misma, que elimina o disminuye los signos o síntomas de una patología, enfermedad o trastorno, cuando se administra a un sujeto que padece de esos signos o síntomas. Un agente o compuesto "terapéuticamente útil" (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) indica que un agente o compuesto es útil para disminuir, tratar o eliminar los signos o síntomas de una patología, enfermedad o trastorno.

El término "molécula pequeña" incluye un compuesto o complejo molecular, sintético, derivado naturalmente o parcialmente sintético, y que tiene, preferiblemente, un peso molecular de menos de 5,000 Daltons. De manera más preferible, una molécula pequeña tiene un peso molecular de entre 100 y 1,500 Daltons.

Los términos "molécula de ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramáticos aquí, se refieren a al menos dos nucleótidos ligados covalentemente juntos y típicamente ser refieren a moléculas de ARN, ADN y ADNc. Un ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente de una sola hebra o de doble hebra, y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener estructuras alternadas que comprende, por ejemplo enlaces fosforamida, fosforotioato, fosforoditioato y/o O-metilfosforamidita. Se comprenderá que, como resultado de la degeneración del código genético, puede producirse una multitud de secuencias nucleotídicas que codifiquen para péptidos dados como la ureasa.

Un constructo o secuencia de ácido nucleico "heteróloga" tiene una porción de la secuencia que no es nativa a la célula en la cual es expresada. Heteróloga, con respecto a la secuencia control, se refiere a una

secuencia control (es decir, promotor o mejorador) que no funciona en la naturaleza para regular el mismo gen la expresión del cual está actualmente regulando. Generalmente, las secuencias de ácido nucleico heterólogas no son endógenas a la célula o parte del genoma en el cual están presentes, y han sido agregadas a la células, por infección, transfección, microinyección, electroporación o similares. Un plásmido recombinante de ácido nucleico heterólogo puede contener una combinación de secuencia control/secuencia codificadora de ADN que sea la misma que, o diferente de una combinación de secuencia control/secuencia codificadora de ADN encontrada en la célula nativa.

Como se usa aquí, el término "vector" se refiere a un plásmido recombinante de ácido nucleico diseñado para transferirse entre diferentes células anfitrionas. Un "vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogo en una célula de otro origen. Muchos vectores de expresión procarióticos y eucarióticos se encuentran comercialmente disponibles. La selección de vectores de expresión apropiados está dentro del conocimiento de aquellos expertos en la técnica.

Como se usa aquí, un "casete de expresión" o "vector de expresión" es un plásmido recombinante de

ácido nucleico generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico específicos que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula blanco o *in vitro*. El casete de expresión recombinante puede ser incorporado en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plastídico, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción del casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico a ser transcrita y un promotor.

Como se usa aquí, el término "plásmido" se refiere a un plásmido recombinante de ADN de doble hebra circular usado como vector de clonación, y el cual forma un elemento genético autoreplicante extracromosomal en muchas bacterias y algunos eucariotes.

Como se usa aquí, el término "secuencia nucleotídica que codifica para un marcador seleccionable" se refiere a una secuencia nucleotídica la cual es capaz de expresarse en células anfitrionas y donde la expresión del marcador seleccionable confiere a las células que contienen el gen expresado la capacidad de crecer en presencia de un agente selectivo correspondiente.

Como se usa aquí, los términos "promotor" e "iniciador de la transcripción" se refieren a una

secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de un gen corriente abajo. El promotor generalmente será apropiado para la célula anfitriona en la cual el gen blanco está siendo expresado. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladora de la transcripción y traducción (también llamadas "secuencias control"), son necesarias para expresar un gen dado. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y traducción incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras, sitios de unión ribosomal, secuencias de inicio y finalización de la transcripción, secuencias de inicio y finalización de la traducción, y secuencias mejoradoras o activadoras.

"Gen quimérico" o "plásmido recombinante de ácido nucleico heterólogo", como se refiere aquí se refiere a un gen no nativo (es decir, uno que ha sido introducido en un anfitrión) que puede estar compuesto de partes de diferentes genes, incluyendo genes reguladores. Un plásmido recombinante de gen quimérico para la transformación de una célula anfitriona está compuesto típicamente de una región reguladora de la transcripción (promotora) ligada operativamente a una secuencia que codifica para una proteína heteróloga, o , en un gen quimérico de marcador seleccionable, a un gen de marcador seleccionable que codifica para una proteína que confiere

resistencia a antibióticos a células anfitrionas transformadas. Un gen quimérico típico de la presente invención, para la transformación en una célula anfitriona, incluye una región reguladora de la transcripción que es constitutiva o inducible, una secuencia que codifica para una proteína, y una secuencia terminadora. Un plásmido recombinante de gen quimérico también puede incluir una segunda secuencia de ADN que codifique para un péptido señal si se desea la secreción de la proteína blanco.

Un ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando es colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN que codifica para un líder secretor está ligado operativamente al ADN para un polipéptido si es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador está ligado operativamente a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosomal está ligado operativamente a una secuencia codificadora si está colocado de modo que facilita la traducción. De manera general, "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN están ligadas o están contiguas, y en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los mejoradores no

tienen que estar contiguos. El enlace se logra mediante la ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen esos sitios, son usados adaptadores o enlazantes oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa aquí, el término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica, que puede o no incluir regiones que precedan y sigan a la región codificadora, por ejemplo, secuencias 5' no traducidas (5' UTR) o "líder" y secuencia 3'UTR o "finales", así como secuencias intervinientes (intrones) entre segmentos codificadores individuales (exones).

Como se usa aquí, "recombinante" incluye la referencia a una célula o vector que ha sido modificado por la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga o que las célula es derivada de una célula así modificada. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en forma idéntica dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que en otras circunstancias son expresados de manera anormal, subexpresados o no expresados del todo como el resultado de la intervención humana deliberada.

El término "introducida", en el contexto de la

inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula, significa "transfección", "transformación" o "transducción" e incluye la referencia a la incorporación de una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariótica o procariótica donde la secuencia de ácido nucleico puede ser incorporada en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástico o ADN mitocondrial), convertida en un replicón autónomo, o expresada transitoriamente (por ejemplo, ARNm transfectado).

Como se usa aquí, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual es producido un polipéptido sobre la base de la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye la transcripción y traducción.

El término "secuencia señal" se refiere a una secuencia de aminoácidos en la porción N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la forma madura de la proteína hacia fuera de la célula. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia señal que es escindida durante el proceso de secreción.

El término "célula anfitriona" significa una célula que contiene un vector y soporta la replicación, o transcripción y traducción (expresión) del plásmido recombinante de expresión. Las células anfitrionas para

usarse en la presente invención pueden ser células procarióticas, como *E. coli*, o células eucarióticas como células de levaduras, plantas, insecto, anfibios o mamíferos.

Como se usa aquí, "cantidad efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectivas" de un agente activo se refiere a una cantidad suficiente para derivar un cambio medible en un parámetro fisiológico de la célula o sujeto blanco y/o para proporcionar o modular la expresión o actividad del agente activo a través de la administración de una o más unidades de dosificación farmacéuticas. Esa cantidad efectiva puede variar de persona a persona dependiendo de su condición, altura, peso, edad y/o salud, el modo de administración del agente activo (por ejemplo, ureasa o modulador de ureasa), el agente activo particular administrado, y otros factores. Como resultado, puede ser útil determinar empíricamente una cantidad efectiva para un paciente particular bajo un conjunto particular de circunstancias.

Todas las publicaciones y patentes citadas aquí se incorporan expresamente aquí como referencia para el propósito de describir y revelar composiciones y metodologías que pueden ser usadas en relación con la invención.

II. Composición de la Invención

La invención incluye, en un aspecto, una composición que contiene ureasa como agente activo para usarse en la inhibición del crecimiento de células cancerosas. Una entidad química puede estar asociada por el agente activo, como se describe más adelante, para mejorar la liberación el agente activo a las células cancerosas. Se ha descubierto que exponer células cancerosas en un paciente a la ureasa, como se describe aquí, proporciona un tratamiento efectivo para el cáncer en el paciente. Las células cancerosas pueden estar contenidas dentro de un tumor, por ejemplo un tumor sólido o semisólido. De manera alternativa, las células cancerosas pueden estar circulando en el flujo sanguíneo de un sujeto.

Los cánceres, tumores y/o neoplasmas incluyen nuevos crecimientos de célula o tejido en los cuales la multiplicación de las células es incontrolada y progresiva. Algunos de esos crecimientos son benignos, pero otros son llamados "malignos", que conducen a la muerte del organismo. Los neoplasmas malignos se distinguen de los crecimientos benignos en que, además de exhibir proliferación celular agresiva, los cánceres invaden los tejidos circundantes y se vuelven metastáticos. Además, los neoplasmas malignos se

caracterizan porque muestran una mayor pérdida de diferenciación, y por su organización en relación a otros y sus tejidos circundantes.

Los considerados a continuación son los componentes incluidos en las composiciones de la invención.

A. Ureasa

Como se hizo notar anteriormente, el agente activo en la composición es la ureasa. La ureasa puede ser de cualquier origen, incluyendo, por ejemplo, de bacterias, plantas, hongos y virus. Numerosos estudios han proporcionado información detallada acerca de la genética de las ureasas de una variedad de bacterias, plantas, hongos y virus evolutivamente diversos (Mobley, H. L. T: *et al.* (1995) *Microbiol. Rev.* 59:451-480; Eur. J. Biochem., 175, 151-165 (1988); Labigne, A. (1990) publicación Internacional NO. WO 90/04030; Clayton, C.L. et al. (1990) *Nucleic Acid Res.* 18, 362; y Patentes Estadounidenses Nos. 6,248,330 y 5,298,399, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia). De particular interés es la ureasa que se encuentra en plantas (Sirko, A. y Brodzik, R. (2000) *Acta Biochim Pol* 47(4):1189-95). Una ureasa de planta ejemplar es la ureasa de frijol (jack bean), que se describe en los Ejemplos 2-3. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de

ureasa de frijol (jack bean) es la representada por la SEQ ID NO: 7.

Las secuencias de ureasa útiles pueden ser identificadas en bases de datos públicas, por ejemplo, Entrez (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/). Adicionalmente, pueden ser utilizados cebadores que son útiles para amplificar ureasas de una amplia variedad de organismos como se describe en Baker, K. M. y Collier, J.L. (http://www.science.smith.edu/departments/Biology/lkatz/NEMEB_webpage/abstracts.html) o usando el CODEHOP (Cebador Oligonucleotídico Híbrido Degenerado de Consenso) como se describe en Rose, *et al* (1998) *Nucl. Acids Res.* 26:1628.

La ureasa puede entrar en contacto con las células tumoral, ser colocada en el ambiente extracelular o en los fluidos intersticiales que rodean las células tumorales, o puede ser expresada dentro de las células cancerosas o células cercanas a las células cancerosas. Aunque no deseamos limitarnos a ningún mecanismo molecular específico subyacente a la inhibición exitosa del crecimiento de células cancerosas por la ureasa, el compuesto de ureasa puede elevar el pH del fluido intersticial en el cual las células cancerosas se bañan, mediante la adición de ureasa al fluido intersticial en el sujeto. La ureasa puede convertir la urea sustrato

amoniaco y carbamato. La actividad enzimática puede incrementar el pH haciendo el ambiente más básico (Figuras 1A-1D). El ambiente alrededor de las células cancerosas es típicamente ácido (Webb. S. D., et al. (2001) *Novartis Found Symp* 240:169-81. De este modo, elevando el pH del ambiente extracelular de esta manera, se inhibe el crecimiento de las células cancerosas. En consecuencia, además del agente activo en ciertas modalidades de la invención hace que el pH del fluido intersticial se eleve en aproximadamente 0.1 unidades de pH, por ejemplo, 0.1-0.5 unidades de pH o más.

De este modo, los agentes activos de la invención incluyen las formas naturales de la ureasa así como variantes funcionalmente activas de la misma. Se contemplaron dos tipos generales de variantes de la secuencia de aminoácidos. Las variantes de la secuencia de aminoácidos que tienen una o más sustituciones en aminoácidos específicos que no destruyen la actividad de la ureasa. Esas variantes incluyen variantes silenciosas y variantes modificadas de manera conservadora, las cuales son sustancialmente homólogas y funcionalmente equivalentes a la proteína nativa. Una variante de una proteína nativa es "sustancialmente homóloga" a la proteína nativa cuando al menos aproximadamente 80%, de manera más preferible al menos aproximadamente 90%, de

manera aún más preferible al menos aproximadamente 95%, de manera aún más preferible 98%, y de manera más preferible al menos 99% de su secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa. Una variante puede diferir en tan pocos como 1 hasta 10 o más aminoácidos.

Un segundo tipo de variante incluye variantes de tamaño de la ureasa los cuales son fragmentos activos aislados de ureasa. Las variantes de tamaño pueden ser formados por ejemplo, fragmentando la ureasa, por modificación química, por digestión de una enzima proteolítica, o por combinaciones de las mismas. Adicionalmente, pueden ser empleadas técnicas de ingeniería genética, así como métodos para sintetizar polipéptidos directamente a partir de aminoácidos residuales, para producir variantes de tamaño.

"Funcionalmente equivalente" pretende significar que la secuencia de la variante define una cadena que produce una proteína que tenga sustancialmente la misma actividad biológica que la ureasa nativa. Esas variantes funcionalmente equivalentes que comprenden variaciones de secuencia sustancialmente también son abarcadas por la invención. De este modo, una variante funcionalmente equivalente de la proteína ureasa nativa tendrá una actividad biológica suficiente para ser terapéuticamente

útil. Los métodos para determinar la equivalente funcional se encuentran disponibles en la técnica. La actividad biológica puede ser medida usando ensayos diseñados específicamente para medir la actividad de la proteína ureasa nativa, como en el Ejemplo 3. Adicionalmente, los anticuerpos dirigidos contra la proteína nativa biológicamente activa pueden ser probados por su capacidad para unirse a la variante funcionalmente equivalente, donde la unión efectiva es indicativa de una proteína que tiene una conformación similar a la de la proteína nativa.

Será apreciado por aquellos expertos en la técnica que debido a la degeneración del código genético, puede ser producida una multitud de secuencias de ácido nucleico que codifiquen para polipéptidos de ureasa de la invención, algunos de los cuales pueden contener una homología de secuencia mínima con secuencias de ácido nucleico de ureasa conocidas. Esas "variaciones silenciosas" son una especie de "variaciones modificadas de manera conservadora", discutidas más adelante. La invención proporciona todas y cada una de las posibles variaciones de la secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la invención que pudieran se producidas seleccionando combinaciones sobre la base de elecciones de codon posibles. Esas combinaciones se

hacen de acuerdo con el código genético de triplete estándar como se aplica a la secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de proteína ureasa de la invención.

Los polipéptidos de ureasa de la presente invención incluyen una o más variaciones modificadas de manera conservadora (o simplemente "variaciones conservadoras") de las secuencias de secuencias polipeptídicas de ureasas conocidas. Esas variaciones conservadoras comprenden sustituciones, adiciones o supresiones que alteran, agregan o suprimen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos. Un experto en la técnica reconocerá que una sustitución, supresión o adición individual que sustituye, suprime o agrega un solo aminoácido a un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menor del 5%, de manera más típica menor del 4%, 2%, 1% o menos) en una secuencia que constituye típicamente variaciones conservadoras, donde sus cambios dan como resultado la supresión de un aminoácido, adición de aminoácido, o sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. La Tabla 1 expone seis grupos que contienen aminoácidos que

son sustituciones conservadoras o variaciones conservadoras entre sí.

Tabla 1. Grupos de Sustituciones Conservadoras

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

También pueden ser formulados grupos adicionales de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden ser agrupados por función o estructura química o composición similar (por ejemplo, ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, que contengan azufres). Por ejemplo, un grupo alifático puede comprender: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina. Otros grupos que contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí incluyen los siguientes: (i) aromáticos: fenilalanina, tirosina, triptófano; (ii) que contienen azufre: metionina, cisteina; (iii) básicos: arginina, lisina, histidina; y (iv) ácidos: ácido aspártico, ácido

glutámico, asparagina, glutamina. Véase Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company, para agrupamientos adicionales de aminoácidos.

Las secuencias de la proteína ureasa de la invención, incluyendo las secuencias sustituidas de manera conservadora, pueden estar presentes como parte de secuencias polipeptídicas más grandes como las que ocurran tras la adición de uno o más dominios para la purificación de la proteína (por ejemplo, segmentos de poli his, segmentos marcas INDICADORAS, etc.), por ejemplo, donde los dominios funcionales adicionales tienen poco o ningún efecto sobre la actividad de la porción de la proteína ureasa de la proteína, o donde los dominios adicionales pueden ser removidos por paso de procesamiento posteriores a la síntesis, como por tratamiento con una proteasa.

La adición de uno o más ácidos nucleicos o secuencias que no alteren la actividad codificada de una molécula de ácido nucleico de la invención, como la adición de secuencia no funcional, es una variación conservadora de la molécula de ácido nucleico básica, y la adición de uno o más aminoácidos residuales que no alteren la actividad de un polipéptido de la invención es una variación conservadora del polipéptido básico. Ambos de esos tipos de adiciones son características de la

48

invención. Un experto en la técnica apreciará que muchas variaciones conservadoras de los plásmidos recombinantes de ácido nucleico que son descrito producen un plásmido recombinante funcionalmente idéntico.

Una variedad de métodos para determinar las relaciones de secuencia, incluyendo alineación manual, y alineación de secuencias ayudada por computadora pueden ser usados. Este último método es el método preferido de la presente invención, debido al mayor rendimiento proporcionado por los métodos ayudados por computadora. Una variedad de programas de computadora para efectuar la alineación de secuencia se encuentran disponibles, o pueden ser producidos por un experto en la técnica.

Como se hizo notar anteriormente, las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos (y fragmentos de los mismos) empleadas en la materia objeto no necesitan ser idénticas, pero pueden ser sustancialmente idénticas (o sustancialmente similares) a la secuencia correspondiente de un polipéptido de ureasa o molécula de ácido nucleico (o fragmento de las mismas) de la invención o molécula relacionada. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser sometidos a varios cambios, como una o mas inserciones, supresiones y sustituciones de aminoácido o ácido nucleico, conservadoras o no conservadoras, incluyendo donde por ejemplo, esos cambios pueden proporcionar

ciertas ventajas en su uso, por ejemplo en su uso terapéutico o profiláctico o aplicación de administración o diagnóstico.

La alineación y comparación de secuencias de aminoácido relativamente cortas (de menos de aproximadamente 30 residuos) es típicamente fácil. La comparación de secuencias más largas puede requerir métodos más sofisticados para lograr la alineación óptima de dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede ser conducida por el algoritmo homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv Appl Math* 2:482; por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J Mol Biol* 48:443, por la búsqueda del método por similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc Nat'l Acad Sci* EUA 85:2444, por implementaciones computarizadas de esos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis; y BLAST, véase, por ejemplo Altschul et al. (1977) *Nuc Acids Res* 25:3389-3402 y Altschul et al. (1990) *J Mol Biol* 215:403-410), o por inspección, con la mejor alineación (es decir, que de cómo resultado el mayor porcentaje de similitud de secuencia o identidad de secuencia sobre la ventana de comparación) generada por los diferentes métodos que sean

seleccionados.

El algoritmo ejemplar que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia (por ciento de identidad) y similitud de secuencia es el algoritmo FASTA, el cual se describe en Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988) *Proc Nat'l Acad Sci* EUA 85:2444. Véase también W.R. Pearson (1996) Methods Enzymology 266:227-258. Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTA de secuencias de ADN para calcular el por ciento de identidad son optimizados, Matriz BL50 15: -5, k-tuple=2, penalidad de unión =40, optimización =28, penalidad de espacio =-12, penalidad de longitud de espacio =-2; y ancho =16.

Será comprendido por un experto en la técnica, que la discusión anterior de la búsqueda y algoritmos de alineación también se aplica a la identificación y evaluación de secuencias polinucleotídicas, con la sustitución de las secuencias interrogadas comprendiendo secuencias nucleotídicas, y, donde sea apropiado, la selección de bases de datos de ácidos nucleicos.

B. <u>Entidad Química Asociada</u>

La composición de la invención puede comprender una entidad química que esté asociada con el agente activo para mejorar la liberación del agente activo a las

células cancerosas. Se contempló una amplia variedad de entidades químicas asociadas para usarse como se describe más adelante.

B1. <u>Polímeros</u>

La entidad química puede comprender un polímero incluyendo, por ejemplo, polímeros hidrofílicos y polímeros hidrofóbicos, con los polímeros hidrofílicos siendo los preferidos. El término "hidrofílico", como se usa aquí, se refiere, a una composición, sustancia o material, por ejemplo, un polímero, el cual puede generalmente asociarse fácilmente con el agua. De este modo, aunque los polímeros hidrofílicos que pueden ser empleados en la presente invención pueden tener dominios del tipo variable, por ejemplo, dominios los cuales son más hidrofílicos y dominios los cuales son más hidrofóbicos, la naturaleza total de los polímeros hidrofílicos es preferiblemente hidrofílica, comprendiéndose, por supuesto, que esta hidrofilicidad puede variar a través de un intervalo continuo de relativamente más hidrofílico a relativamente menos hidrofílico.

Puede ser empleada una amplia variedad de polímeros en las composiciones y formulaciones de la presente. De manera general, el polímero es uno el cual

tiene la hidrofilicidad y/o hidrofobicidad deseada, y que pueden formar matrices, así como las uniones covalentes con ligandos que elijan el blanco, como se describe aquí. El polímero puede ser reticulado o no reticulado. Los términos "reticulación", "reticulado" y "reticulante", como se usa aquí, se refieren de manera general al enlace de dos o más compuestos o materiales, por ejemplo, polímeros, por uno o más puentes. Los puentes, los cuales pueden estar compuestos de uno o más elementos, grupos o compuestos, generalmente sirven para unir un átomo a un primer compuesto o molécula de material a un átomo del segundo compuesto o molécula de material. Los puentes reticulantes pueden implicar asociaciones covalentes y/o no covalentes. Cualquiera de una variedad de elementos, grupos y/o compuestos pueden formar los puentes en las reticulaciones, y los compuestos o materiales pueden ser reticulados de manera natural o a través de medios sintéticos.

De acuerdo con ciertas modalidades, el polímero, ya sea lineal, estrellado o ramificado, puede ser seleccionado del grupo que consiste de un óxido de polialquileno, polialquilenimina, polialquilen amina, sulfuro de polialqueno, sulfonato de polialquileno, polialquilen sulfona, poli(alquilensulfonilalquilenimina) y copolímeros de los mismos.

Como se hizo notar anteriormente, dependiendo del polímero particular empleado, los polímeros pueden ser relativamente más hidrofílicos o relativamente más hidrofóbicos. Los ejemplos de polímeros relativamente más hidrofílicos incluyen, pero no se limitan a, polietilen glicol, polipropilen glicol, polietilen imina ramificada, polivinilpirrolidona, polilactida, poli(lactida-co-glicolida),. polisorbato, óxido de polietileno, poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), poliglicerol (oxietilado), polisorbitol (oxietilado), poli(glucosa oxietilada), polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, alcohol polivinílico, poli(ácido hidroxialquil-carboxílico), ácido polihidroxietil acrílico, ácido polihidroxipropil metacrílico, polihidroxivalerato, polihidroxibutirato, polioxazolidina, poliaspartamida, ácido polisiálico, y derivados, mezclas y copolímeros de los mismos.

En consecuencia, un polímero, preferiblemente hidrofílico, puede ser conjugado con el agente activo, u otras entidades químicas asociadas descritas aquí, para mejorar la liberación del agente en las células cancerosas. El conjugado polímero-agente activo es administrado preferiblemente en una cantidad efectiva para extender el tiempo de circulación en la sangre y/o

reducir al antigenicidad y/o inmunogenicidad de la composición en relación al agente activo nativo o no derivado. Los polímeros hidrofílicos particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polihidroxipropilo metacrilamida, metacrilato de polihidroxipropilo, acrilato de polihidroxietilo, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, poliaspartamida y/o derivados hidrofílicos de celulosa. Un polímero hidrofílico preferible es el polietilen glicol que tiene, por ejemplo, un peso molecular de entre aproximadamente 1,000 y 10,000 daltones. En una modalidad, el polietilen glicol tiene un peso molecular de entre 1,000 y 5,000 daltones. Los polímeros adicionales contemplados para usarse en la invención son descritos con mayor detalle en la U.S. Preotorgada, Publicada No. 20020041898, publicada en Abril 11, 2002, la cual se incorpora aquí como referencia.

B2. <u>Entidad que Elige el Blanco</u>

Las entidades que eligen el blanco son contempladas como entidades químicas de la presente invención, y se unen a un tipo de célula seleccionado,

definido o población de célula blanco, como células cancerosas. Las entidades que eligen el blanco útiles a este respecto incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, péptidos y hormonas. Las proteínas correspondientes a receptores de la superficie celular conocidos (incluyendo lipoproteínas de baja densidad, transferrina e insulina), enzimas fibrinolíticas, anti-HER2, proteínas de unión plaquetaria como anexinas, y modificadores de la respuesta biológica (incluyendo la interleucina, interferon, eritropoyetina y factor estimulante de colonia) también son contempladas como entidades que eligen el blanco. Los oligonucleótidos, por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido que son complementarios a una porción de un ácido nucleico de célula blanco, pueden usados como entidades que elijan el blanco en la presente invención. Las entidades que eligen el blanco también pueden ser oligonucleótidos que se unan a una superficie celular blanco. Los análogos de las entidades que eligen el blanco listadas anteriormente que retienen la capacidad de unirse a una población celular blanco definida también pueden ser usados como entidades que elijan el blanco.

Los equivalentes funcionales de las entidades que eligen el blanco mencionadas anteriormente también son útiles como entidades que eligen el blanco de la

presente invención. Un equivalente funcional de una entidad que elige el blanco ejemplar es un constructo químico orgánico diseñado para imitar la configuración y/u orientación apropiada para la unión de la célula blanco a la entidad que elige el blanco.

Otro equivalente funcional de entidad que elige el blanco es un polipéptido corto que exhibe la afinidad de unión de la entidad que elige el blanco.

Las entidades que eligen el blanco preferidas de la presente invención son anticuerpos, péptidos, oligonucleótidos o similares, que reaccionan con un antígeno sobre la superficie de una célula blanco. Pueden ser empleados anticuerpos policlonales y monoclonales que se encuentren comercialmente disponibles o como se describe en la literatura. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos y fragmentos monoclonales pueden ser producidos de acuerdo con técnicas convencionales, como la síntesis de hibridoma, técnicas de ADN recombinante y síntesis de proteína. Los anticuerpos y fragmentos monoclonales útiles pueden ser derivados de cualquier especie (incluyendo humanos) o pueden ser formados como proteínas quiméricas que emplean secuencias de más de una especie.

En una modalidad de la invención, son usados

anticuerpos monoclonales humanos o anticuerpos murinos humanizados como entidades que eligen el blanco. Las entidades humanizadas que eligen el blanco son capaces de hacer disminuir la inmunorreactividad del anticuerpo o polipéptido en el receptor anfitrión, permitiendo un incremento en la vida media y una reducción en las reacciones inmunes adversas. Los anticuerpos monoclonales murinos pueden ser humanizados por ejemplo, recombinando genéticamente una secuencia nucleotídica que codifica para la región Fv murina o las regiones determinantes de la complementaridad de los mismos con la secuencia nucleotídica que codifica para una región del dominio constante humano y una región Fc. Los residuos murinos también pueden ser retenidos dentro de dos dominios de la estructura de la región variable humana para asegurar las características de unión del sitio blanco apropiado. Un ejemplo no limitante de la entidad que elige el blanco es el anticuerpo anti-α-2-GP para las células gliales del cerebro (alfa-2-glicoproteína) el cual es descrito por Slepnev *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 3:273-274 (1992). Los anticuerpos modificados genéticamente para la liberación de varios agentes activos a células cancerosas son revisados en Bodey, B. (2001) *Expert Opin Biol. Ther.* 1(4):603-17.

En otra modalidad de la invención, la entidad

que elige el blanco es un ligando el cual reacciona con un receptor sobre la superficie de la célula blanco. De este modo, la entidad que elige el blanco puede incluir sin limitación hormonas con afinidad por un componente de unión celular, cualquier molécula que contenga una entidad de carbohidrato reconocida por un componente de unión celular y fármacos o moléculas pequeñas que se unan a un componente de unión celular. La frase "componente de unión" incluye moléculas receptoras y aceptantes. Preferiblemente, el componente de unión es un componente de unión de la superficie celular. En una modalidad, la entidad que elige el blanco es una proteína natural, como la insulina, que se une a un sitio blanco. Las citocinas, incluyendo las interleucinas y factores como el factor estimulante de la colonia granulocítica/macrofagocítica (GM/CSF) y factor de la necrosis tumoral (TNF) son también entidades que eligen el blanco, específicas, que se sabe se unen a células específicas que expresan altos niveles de sus receptores (Terlikowski SJ (2002) *Toxicology* 174(3):143-152).

Para hacer disminuir la exposición de la ureasa u otro agente activo a células o tejidos no blanco, pueden ser seleccionadas entidades que elijan el blanco para identificar aquellas que presenten actividad no blanco mínima, reteniendo a la vez la especificidad y

reactividad con el blanco. Mediante la reducción de la exposición no blancos (y la localización y/o toxicidad de un no blanco adversa), pueden ser administradas dosis incrementadas de ureasa u otro agente activo. Esto permite la administración de la concentración más alta posible de ureasa u otro agente terapéutico para maximizar la exposición de las células blanco, permaneciendo a la vez por debajo del umbral de toxicidad celular no blanco inaceptable.

En ciertas modalidades de la invención, son empleados dos o más conjugados de agente activo-entidad que elige el blanco, donde cada conjugado incluye una entidad que elige el blanco diferente, por ejemplo, una especie de anticuerpo diferente. Cada una de las entidades que eligen blancos utilizadas se une a una región de un sitio blanco diferente que puede estar asociada con el mismo o un sitio blanco diferente. El agente activo componente de cada conjugado administrado puede ser el mismo o diferente. Véanse, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 4,867,962 y 5,976,535, cada una de las cuales son incorporadas aquí como referencia. En la práctica de esta modalidad de la invención, el acceso al sitio blanco del conjugado de agente activo al sitio blanco es mejorada, debido a que cada entidad que elige el blanco, por ejemplo, especie de anticuerpo,

reconoce una región del sitio blanco diferente, por ejemplo el epitope del sitio blanco. Este método de región del sitio blanco alternativo proporciona puntos de unión con el sitio blanco más potenciales al agente activo. En consecuencia, la saturación del sitio blanco actual o efectiva, por ejemplo, vía la saturación epitópica y/o impedimento estérico, puede ser evitada. De este modo, puede ser lograda la acumulación aditiva del agente activo, por ejemplo, ureasa. De manera alternativa, o en combinación, pueden ser empleados productos genéticos específicos de ureasa adicionales como agentes activos, por ejemplo, para la producción de una holoenzima catalíticamente activa en el sitio blanco. Una apoenzima de ureasa ejemplar incluye a las subunidades gamma, beta y alfa codificadas por los genes *ureABC* bacterianos (Burne, R.A. y Chen, Y. M. (2000) *Microbes and Infection* 2:533-542).

Los patrones de reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un sitio objetivo particular puede ser analizado para identificar un conjunto de dos o más anticuerpos monoclonales específicos del blanco sin reactividad cruzada superpuesta para usarse en una aplicación de diagnóstico o terapéutica. La frase "patrones de reactividad cruzada no superpuestos" indica que el tejido no blanco unidos

por una especie de anticuerpo difieren sustancialmente de los tejidos no blanco unidos por otra especie de anticuerpo. Los patrones de reactividad cruzada difieren en el grado necesario para reducir proporcionalmente la exposición del agente activo para aplicaciones terapéuticas. El par de anticuerpos (o conjunto más grande de anticuerpos) menos superpuesto es el preferido.

Los anticuerpos pueden ser seleccionados o separados por una variedad de métodos.

Pueden emplearse un análisis inmunohistoquímico para determinar la reactividad con el tejido blanco de reactividad cruzada con tejido no blanco. Los tejidos con los cuales las especies de anticuerpos unidas pueden ser identificados exponiendo el tejido al anticuerpo; lavando el tejido para remover cualquier anticuerpo no unido; y detectando la presencia de anticuerpo unido. Los procedimientos histoquímicos *in vitro* son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sanchez-Islas, E. y Leon-Olea, M. (2001) *Nitric Oxide* 5(4):302-16.

La composición de la presente invención también puede ser de utilidad en el tratamiento de tumores que secreten hCG. Debido a que el trofoblasto placentario es el sitio normal de síntesis de hCG, es comprensible que tumores trofoblásticos gestacionales y no gestacionales sinteticen y secreten hCG. En realidad, las mediciones de

hCG han sido muy útiles para el diagnóstico de esos tumores, evaluar la etapa de los tumores, y para verificar los efectos de la terapia. Además, algunos tumores no trofoblásticos pueden producir hCG ectópicamente. La hCG puede actuar como un factor del crecimiento para algunos tumores (Melmed S. and Braunstein GD: Human chorionic gonadotropin stimulates prolfieration of Nb 2 rat lymphoma cells. *J. Clin Endocrinol. Metab* 56:1068-1070, (1983)). Véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 6,448,022, la cual se incorpora aquí como referencia.

Por lo tanto, de acuerdo a una modalidad de la invención, el uso de un anticuerpo anti-hCG como blanco para el agente activo para un tumor que secreta hCG suprime el crecimiento del tumor que secreta hCG. De este modo, en ciertas modalidades, la entidad química de la invención es una entidad que elige el blanco unida a un agente activo y es un anticuerpo anti-antígeno tumoral, un anticuerpo anti-hCG o un ligando capaz de unirse específicamente a receptores de la superficie de células cancerosas. La entidad que elige el blanco es, preferiblemente, un polipéptido ligado a la enzima ureasa para formar una proteína de fusión.

Como se hizo notar anteriormente, de acuerdo con una modalidad de la invención, el agente activo es

conjugado directamente con la entidad que elige el blanco. De manera alternativa, de acuerdo a otra modalidad de la invención, se usa un método de dos o tres pasos para liberar un agente activo a las células cancerosas. De este modo, el agente activo puede incluir un primer patrón de unión el cual es capaz de interactuar con un segundo patrón de unión, y la entidad química puede incluir una entidad que elija el blanco que incluye el segundo patrón de unión. Esas modalidades son descritas con mayor detalle en la sección III más adelante.

Un experto apreciará que las entidades que eligen el blanco de esta invención y los agentes activos pueden ser unidos juntos en cualquier orden. De este modo cuando la entidad que elige el blanco es un polipéptido, el agente activo puede ser unido a cualquiera del amino o carboxi terminal de la molécula que elige el blanco. La entidad que elige el blanco también puede ser unida a una región interna del agente activo, o por el contrario, el agente activo puede ser unido en un lugar dentro de la entidad que elige el blanco, en tanto la unión no interfiera con las actividades respectivas de las moléculas.

La entidad que elige el blanco y el agente activo pueden ser unidos por cualquier de un número de

medios conocidos por aquellos expertos en la técnica. Típicamente, el agente activo es conjugado, ya sea directamente o a través de un enlazante (separador), la entidad que elige el blanco. Sin embargo, donde ambos de la entidad que elige el blanco y el agente activo son polipéptidos, puede ser preferible expresar recombinantemente la molécula quimérica como una proteína de fusión de una sola cadena.

En una modalidad, la entidad que elige el blanco (por ejemplo, Ab αhEGFR IgG) es conjugada químicamente con el agente activo o entidad química (por ejemplo, un fármaco, ureasa o liposoma). Los medios para conjugar moléculas químicamente son bien conocidos por aquellos expertos.

El procedimiento para unir un agente a un anticuerpo u otra molécula polipeptídica que elija el blanco variará de acuerdo a la estructura química del agente. Los polipéptidos típicamente contienen una variedad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH) o amina libre (--NH2), los cuales están disponibles para reaccionar con un grupo funcional adecuado sobre un agente activo para unir la entidad que elige el blanco a este.

De manera alternativa, la entidad que elige el blanco y/o agente activo pueden ser derivados para

exponerse o unirse a grupos funcionales reactivos adicionales. La derivación puede implicar la unión de cualquiera de un número de moléculas enlazantes como aquellas disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford III.

Un "enlazante", como se usa aquí, es una molécula que es usada para unir la entidad que elige el blanco a un agente activo. El enlazante es capaz de formar enlaces covalentes con la entidad que elige el blanco y con el agente activo. Los enlazantes adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluye, pero no se limitan a, enlazantes con cadenas de carbono lineales o ramificadas, enlazantes de carbono heterocíclicos, o enlazantes peptídicos. Donde la entidad que elige el blanco y la molécula de agente activo son polipéptidos, los enlazantes pueden ser unidos a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro con cisteína). Sin embargo, en una modalidad preferida, los enlazantes se unirán a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

Un enlazante bifuncional que tiene un grupo funcional que reacciona con un grupo sobre un agente particular, y otro grupo que reacciona con un anticuerpo, puede ser usado para formar el inmunoconjugado deseado.

De manera alternativa, la derivación puede implicar el tratamiento químico de la entidad que elige el blanco, por ejemplo, escisión con glicol de la entidad azucarada de un anticuerpo glicoprotéico con peryodato para generar grupos aldehído libres. Los grupos aldehído libres sobre el anticuerpo pueden hacerse reaccionar con grupos amina o hidrazina libres o un agente para unir el agente a este. (véase la Patente Estadounidense No. 4,671,958). En los procedimientos para la generación de grupos sulfhidrilo libre sobre el polipéptido, como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, son también conocidos (véase la Patente Estadounidense No. 4,659,839).

Muchos procedimientos y moléculas enlazantes para la unión de varios compuestos, incluyendo quelatos de metal con radionuclidos, toxinas y fármacos a proteínas, como anticuerpos, son conocidos (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea No. 188, 256; las Patentes Estadounidenses Nos. 4,671,958; 4,659,839; 4,414,148; 4,699,784; 4,680,338; 4,569,789; y 4,589,071; y Borlinghaus et al. (1987) *Cancer Res.* 47:4071-4075). En particular, la producción de varias inmunotoxinas también está dentro de la técnica y puede encontrarse, por ejemplo, en "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpe et al., *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, pp. 168-190 (1982),

Waldmann (1991) Science, 252: 1657, Patentes Estadounidenses Nos. 4,545,985 y 4,894,443.

En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula de agente activo de la entidad que elige el blanco cuando la molécula quimérica haya alcanzado su sitio blanco. Por lo tanto, los conjugados quiméricos que comprenden enlaces los cuales son escindibles en la vecindad del sitio objetivo pueden ser usados cuando el efector vaya a ser liberado en el sitio blanco. La escisión del enlace para liberar el agente de la entidad que elige el blanco puede ser promovida por la actividad enzimática o condiciones a las cuales el conjugado sea sometido ya sea dentro de la célula blanco o en la vecindad del sitio blanco. Deberá apreciarse que cuando el sitio blanco es un tumor, puede ser usado un enlazante que sea escindible bajo las condiciones presentes en el sitio del tumor (por ejemplo cuando se exponga a enzimas asociadas con el tumor o pH ácido).

Numerosos enlazantes escindibles diferentes son conocidos por aquellos expertos en la técnica (véanse las Patentes Estadounidenses Nos. 4,618,492; 4,542,225, y 4,625,014). El mecanismo para la liberación de un agente activo de esos grupos enlazantes incluyen, por ejemplo, irradiación de un enlace fotolábil e hidrólisis catalizada con ácido. La Patente Estadounidense No.

4,671,958, por ejemplo, incluye una descripción de inmunoconjugados que comprenden enlazantes los cuales son escindibles en el sitio blanco *in vivo* por las enzimas proteolíticas del sistema del complemento del paciente. En vista del gran número de método que han sido reportados para unir una variedad de compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, fármacos, toxinas, y otros agentes a entidades que eligen blancos, un experto en la técnica podrá determinar un método adecuado para unir un agente dado a una entidad que elija el blanco seleccionada.

Donde la entidad que elige el blanco y/o el agente activo es relativamente corto, ellos pueden ser sintetizados usando técnicas de síntesis peptídica química estándar. Cuando ambas moléculas son relativamente cortas, la molécula quimérica puede ser sintetizada como un solo polipéptidos contiguo. De manera alternativa, la entidad que elige el blanco y el agente activo pueden ser sintetizado por separado y entonces fusionados por condensación del amino terminal de una molécula con el carboxilo terminal de otra molécula, formando por lo tanto un enlace peptídico. De manera alternativa, la entidad que elige el blanco y la molécula de agente activo pueden ser condensadas cada una con un extremo de una molécula separadora peptídica, formando

por lo tanto una proteína de fusión contigua.

La síntesis en fase sólida en la cual el aminoácido C-terminal de la secuencia es unido a un soporte insoluble seguido por la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia se contempló para una modalidad del método para la síntesis química de los polipéptidos de esta invención. Las técnicas para la síntesis en fase sólida son descritas por Barany and Merrifield, Solid -Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol.* 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A, Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156 (1963), y Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis,* 2da ed. Pierce Chem. Co., Rockford, III. (1984).

En una modalidad preferida, las proteínas de fusión quiméricas de la presente invención son sintetizadas usando la metodología del ADN recombinante. De manera general, esta implica crear una secuencia de ADN que codifica para la proteína de fusión, colocar el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar la proteína en un anfitrión, aislar la proteína expresada y, si se requiere, renaturalizar la proteína.

El ADN que codifica para las proteínas de fusión de esta invención puede ser preparado por cualquier

método adecuado incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de las secuencias apropiadas o síntesis química directa por métodos como el método del fosfotriéster de Narang et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99; el método del fosfodiéster de Brown et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151; el método de la dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859-1862; y el método en soporte sólido de la Patente Estadounidense No. 4,458,066.

La síntesis química produce un oligonucleótido de una sola hebra. Este puede ser convertido en ADN de doble hebra por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una ADN polimerasa usando el ADN de una sola hebra como modelo. Un experto reconocerá que aunque la síntesis química de ADN se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden ser obtenidas secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

De manera alternativa, las subsecuencias pueden ser clonadas y las secuencias apropiadas escindidas usando enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos pueden ser usados entonces para producir la secuencia de ADN deseada.

Aunque las dos moléculas son, de manera preferible, unidas juntas de manera esencialmente

directa, un experto en la técnica apreciará que las moléculas pueden ser separadas por un separador peptídico que consiste de uno o más aminoácidos. Generalmente el separador no tendrá actividad biológica específica además de la unión de las proteínas o para preservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, los aminoácidos constituyentes del separador pueden ser seleccionados de tal manera que tengan influencia sobre alguna propiedad de la molécula, como el pliegue, carga neta o hidrofobicidad.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican para las proteínas de fusión pueden ser expresadas en una variedad de células anfitrionas, incluyendo *E. coli*, otros anfitriones bacterianos, levaduras, y varias células eucarióticas mayores, como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y líneas celulares de mieloma. El gen de la proteína recombinante será ligado operativamente a las secuencias de control de la expresión apropiadas por cada anfitrión. Para *E. coli* esta incluye un promotor como los promotores T7, trp, o lambda, un sitio de unión ribosomal y preferiblemente una señal de finalización de la transcripción. Para células eucarióticas, las secuencias control incluirán un promotor y preferiblemente un mejorador o derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de

poliadenilación, y puede incluir secuencias donadoras y aceptantes de empalme.

Los plásmidos de la invención pueden ser transferidos a la célula anfitriona elegida por métodos bien conocidos como la transformación con cloruro de calcio para *E. coli* y el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para células de mamíferos. Las células transformadas por los plásmidos pueden ser seleccionadas por la resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, como los genes amp, gpt, neo y hyg.

Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes, pueden ser purificadas de acuerdo a los procedimientos estándar de la técnica, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification.*, Academic Press, Inc. N.Y.). Las composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad son las preferidas, y de 98 a 99% o más de homogeneidad son las más preferidas para uso farmacéutico. Una vez purificados, los polipéptidos parcial u homogeneamente deseados pueden entonces ser

usados terapéuticamente.

Un experto en la técnica reconocerá que después de la síntesis química, expresión biológica, o purificación, la proteína de fusión dirigida puede poseer una conformación sustancialmente diferente a las conformaciones nativas de los polipéptidos constituyentes. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y entonces hacer que el polipéptido se repliegue a la conformación preferida. Los métodos para reducir y desnaturalizar proteínas e inducir el repliegue son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica (véase, Debinski et al. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268:14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4:581-585; y Buchner, et al. (1992) *Anal. Biochem.*, 205:263-270).

Un experto reconocerá que pueden hacerse modificaciones a las proteínas de fusión dirigidas sin disminuir su actividad biológica. Algunas modificaciones pueden hacerse para facilitar la clonación, expresión, o incorporación de la molécula que elige el blanco en una proteína de fusión. Esas modificaciones son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, metionina agregada en el amino terminal para proporcionar un sitio de inicio, o aminoácidos adicionales colocados sobre cualquier término para crear

sitios de restricción o codones de terminación o finalización localizados convenientemente.

B3.Agentes Activos Atrapados

En ciertas modalidades, la invención contempla el uso de vesículas como liposomas y/o nanocápsulas como entidades químicas para la liberación de un agente activo o agentes activos, por ejemplo, ureasa para células cancerosas. Esas formulaciones pueden ser las preferidas para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos, fármacos, y/o anticuerpos descritos aquí. La formación y uso de liposomas es conocida, de manera general, por aquellos expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Backer, M.V., *et al.* (2002) *Bioconjug Chem* 13(3):462-7). En una modalidad preferida, la composición descrita puede ser atrapada en un liposoma.

Las nanocápsulas generalmente atrapan compuestos en una forma estable y reproducible (Whelan, J. (2001) *Drug Discov Today* 6(23):1183-84). Para evitar los efectos naturales debido a la superposición polimérica intracelular, esas partículas ultrafinas (con un tamaño de aproximadamente 0.1 μm) pueden ser diseñadas usando polímeros que puedan ser degradados *in vivo*. Las nanopartículas de poliisobutil cianoacrilato

biodegradables que satisfacen esos requerimientos son contempladas para usarse en la presente invención, y esas partículas pueden ser producidas fácilmente, como se describen, por ejemplo, Lambert, G., *et al.* (2001) *Int J Pharm* 214(1-2):13-6. Los métodos para preparar nanopartículas de polialquil-ciano-acrilato que contienen sustancias biológicamente activas y su uso son descritas en las Patentes Estadounidenses Nos 4,329,332, 4,489,055 y 4,193,908. Las nanocápsulas se encuentran comercialmente disponibles de fuentes como Capsulution, Inc. (www.casulution.com).

Las composiciones farmacéuticas que contienen nanocápsulas para la liberación de agentes activos son descritas en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,500,224, 5,620,708 y 6,514,481. La Patente Estadounidense No. 5,500,224 describe una composición farmacéutica en forma de una suspensión coloidal de nanocápsulas que comprende una fase oleosa que consiste esencialmente de un aceite que contiene disuelto en él un tensoactivo, y suspendidas en el una pluralidad de nanocápsulas que tienen un diámetro de menos de 500 nanómetros. La Patente Estadounidense No. 5,620,708 describe composiciones y métodos para la administración de fármacos y otros agentes activos. Las composiciones comprenden una partícula portadora de agente activo unida a una entidad

de unión que se une específicamente a una molécula blanco presente sobre la superficie de un enterocito de mamífero. La entidad de unión se une a la molécula blanco con una afinidad o avidez de unión suficiente para iniciar la endocitosis o fagocitosis del portador del agente activo particulado de modo que el portador sea absorbido por el enterocito. El agente activo será entonces liberado del portador o vehículo a la circulación sistémica del anfitrión. De esta manera, puede ser evitada la degradación de fármacos sensibles a la degradación, como polipéptidos, en el intestino, incrementando a la vez la absorción de proteínas y polipéptidos del tracto intestinal. De manera alternativa, la invención contempla la liberación del agente activo en el ambiente que rodea la célula blanco. Por ejemplo, en una modalidad, la ureasa es liberada de la nanocápsula después de que la entidad blanco se une a la célula objetivo, de modo que la ureasa es liberada al microambiente que rodea la célula blanco, por ejemplo, una célula tumoral. Las Patentes Estadounidenses Nos. 6,379,683 y 6,303,150 describen métodos para fabricar nanocápsulas y el uso de las mismas, y se incorporan aquí como referencia.

De este modo, en una modalidad de la invención, el contacto incluye agregar a las células un conjugado

que comprende una entidad que elige el blanco y un primer péptido que forma un espiral caracterizado por una carga seleccionada y una capacidad para interactuar con un segundo péptido formador de espiral de carga opuesta para formar un heterodímero espiral enrollado α-helicoidal estable. Posteriormente, se agrega liposoma a las células. El liposoma comprende una superficie exterior y un compartimiento interno; un agente activo, por ejemplo ureasa, localizada dentro del compartimiento interno del liposoma; y una pluralidad de segundos péptidos, donde cada segundo péptido está conectado a la superficie exterior del liposoma.

En otra modalidad, descrita con detalle más adelante, el contacto incluye agregar liposomas a las células, donde los liposomas tienen el agente activo, por ejemplo, ureasa, en forma atrapada y las superficies externas del liposoma incluyen una entidad que elige el blanco celular efectiva para unirse específicamente a una superficie blanco, y un recubrimiento polimérico hidrofílico efectivo para proteger a la entidad que elige el blanco de la interacción con la superficie blanco. El recubrimiento polimérico hidrofílico puede estar constituido de cadenas poliméricas que están ligadas covalentemente a los componentes lipídicos de la superficie en los liposomas a través de enlaces

liberables. En esta modalidad, se agrega un agente de liberación a las células tumorales de una cantidad efectiva para producir la liberación de una porción sustancial de los enlaces en los liposomas agregados, exponiendo por lo tanto la entidad que elige el blanco a la superficie blanco. Los enlaces liberables pueden ser enlaces químicos reducibles como enlaces disulfuro, éster y peptídicos. Preferiblemente, la entidad de afinidad es efectiva para unirse específicamente a un antígeno específico del cáncer.

De acuerdo a esta modalidad de la invención, se contempló un método de terapia basado en liposomas para un sujeto mamífero. El método incluye administrar sistémicamente al sujeto, por ejemplo, administrar intravenosamente, liposomas que tengan una entidad que elija el blanco unida a la superficie y un recubrimiento polimérico hidrofílico. El recubrimiento polimérico hidrofílico, comprendido de cadenas poliméricas unidas de manera liberable, es efectivo para proteger la entidad que elige el blanco de la interacción con su blanco. Los polímeros hidrofílicos preferidos son discutidos más arriba. Los liposomas administrados se dejan circular sistémicamente hasta que se alcanza una biodistribución deseada de los liposomas. Un agente de liberación, como se describe más adelante, es administrado al sujeto en

una cantidad efectiva para producir la escisión de una porción sustancial, por ejemplo, mayor de aproximadamente 50%, preferiblemente mayor de aproximadamente 70%, y de manera más preferible mayor de aproximadamente 90% de los enlaces liberados en los liposomas administrados. La entidad que elige el blanco es expuesta tras la liberación de la cadena polimérica hidrofílica para la interacción con su blanco.

En una modalidad preferida, los liposomas son usados para tratar un tumor sólido. Los liposomas incluyen ureasa, y opcionalmente, un agente activo adicional, por ejemplo un fármaco antitumoral, en forma atrapada y son dirigidos a la región tumoral por una región que elige el blanco efectivo para unirse específicamente a un antígeno específico del tumor. En un método ejemplar, los liposomas son dirigidos a las células endoteliales vasculares de los tumores, incluyendo un ligando de VEGF en los liposomas, para la unión selectiva a los receptores Flk-1,2 expresados sobre las células endoteliales tumorales proliferantes (Niederman, T.M., *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99(10):7009-14).

Preferiblemente, los liposomas tienen un tamaño de entre aproximadamente 30-400 nm. Los liposomas en este intervalo de tamaño han mostrado ser capaces de entrar a

tumores a través de "espacios" presentes en el revestimiento celular endotelial de la vasculatura tumoral (Maruyama, K. *et al.* (1999) *Adv Drug Deliv Rev* 40(1-2):89-102).

Después de la administración de los liposomas, por ejemplo, la administración intravenosa, y después de que ha transcurrido un tiempo suficiente para permitir que los liposomas se distribuyan a través del sujeto y se unan al tumor, se administra un agente de liberación al sujeto para liberar el recubrimiento superficial hidrofílico de los liposomas. La liberación del recubrimiento superficial es efectiva para exponer la entidad que elige el blanco para permitir la unión de los liposomas a las células blanco. En una modalidad, el recubrimiento superficial hidrofílico está unido a los liposomas por enlaces sensibles al pH. Los enlaces son liberados después de que los liposomas se unen al tumor.

Los liposomas en cualquiera de las modalidades descritas anteriormente pueden, opcionalmente, incluir uno o más fármacos antitumorales o agentes formadores de imágenes atrapados o ambos. Los liposomas pueden ser agregados y dejarse distribuir, después de lo cual puede ser administrado un agente de liberación para liberar el recubrimiento superficial hidrofílico para exponer la entidad que elige el blanco unida e iniciar la unión. De

este modo, el fármaco antitumoral o agente formador de imágenes atrapado o ambos son administrados específica o localmente al blanco. Los fármacos anticáncer ejemplares son descritos en la Sección III.A. más adelante. Los agentes formadores de imágenes ejemplares para usarse en el método de la invención son descritos en la Sección III.B. más adelante. Los liposomas pueden ser preparados y administrados como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,043,094, la cual se incorpora aquí como referencia.

Pueden ser empleados agentes de liberación adicionales como vesículas unilamelares pequeñas (SUV), como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,180,114, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad, en la presente invención.

B4. Moduladores del Agente Activo

Los moduladores del agente activo también son contemplados como entidades químicas asociadas por la presente invención. Un modulador del agente activo preferido es un modulador de ureasa. Un "modulador de ureasa" es un inhibidor de ureasa o un mejorador de ureasa. El modulador en las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) en consecuencia puede ser seleccionado de entre todas o porciones de las secuencias

polinucleotídicas de ureasa, moléculas antisentido de ureasa, polipéptidos de ureasa, proteína, péptido, o moduladores orgánicos de la bioactividad de la ureasa como inhibidores, antagonistas (incluyendo anticuerpos) o agonistas. Preferiblemente, el modulador es activo para tratar una condición médica que sea mediada por, o aliviada por, la expresión de la ureasa o actividad de la ureasa.

Un "inhibidor de la ureasa" comprende una molécula o grupo de moléculas que interfieren con: (1) la expresión, modificación, regulación, activación o degradación de la ureasa; o (2) una o más funciones normales de la ureasa, incluyendo la hidrólisis de urea que conduce a la producción de carbamato y amoniaco. Un inhibidor "actúa directamente sobre la ureasa" cuando el inhibidor se une a la ureasa vía interacciones electrostáticas o químicas. Esas interacciones pueden o no ser mediadas por otras moléculas. El inhibidor actúa "indirectamente sobre la ureasa" cuando su efecto más inmediato es una molécula diferente a la ureasa la cual tiene influencia sobre la expresión, activación o funcionamiento de la ureasa.

Los inhibidores de la ureasa sirven para disminuir la conversión de urea a iones amonio. Los inhibidores de ureasa incluyen pero no se limitan a

derivados del ácido hidroxámico (por ejemplo, ácido acetohidroxámico), derivados de fosforamida (por ejemplo, fluorofamida), fosfatos, tioles (por ejemplo, 2-mercaptoetanol, etc.), ácido bórico, compuestos halogenados (por ejemplo, fluoruros, etc.) y extracto de corteza de casia. Los inhibidores de ureasa adicionales son conocidos por aquellos expertos en la técnica y son descritos en la Patente Estadounidense No. 4,824,783 (Abril 25, 1989), la cual se incorpora aquí como referencia.

Un "mejorador de ureasa" comprende una molécula o grupo de moléculas que mejora: (1) la expresión, modificación, regulación o activación de la ureasa; o (2) una o más de las funciones normales de la ureasa. Un mejorador "actúa directamente sobre la ureasa" cuando el mejorador se une a la ureasa vía interacciones electrostáticas o químicas. Esas interacciones pueden o no ser mediadas por otras moléculas. Un mejorador actúa "indirectamente sobre la ureasa" cuando su efecto más inmediato es sobre una molécula diferente a la ureasa la cual tiene influencia sobre la expresión, activación o funcionamiento de la ureasa.

C. Agentes Activos Adicionales

También pueden estar agentes activos adicionales

en la composición de la invención. Los agentes activos adicionales, por ejemplo, un agente anti-tumor (un agente activo contra células proliferantes), pueden ser utilizados en la composición antes de, concurrentemente con, o después de que las células sean puestas en contacto con un primer agente activo. Por ejemplo, después de que la ureasa haya sido dirigida a las células tumorales, esta puede tener la capacidad de modular o regular el ambiente externo al tumor, por ejemplo, a través de cambios del pH. Los agentes activos, por ejemplo, los agentes anti-tumor que favorecen un ambiente básico serán entonces más eficaces.

En ciertas modalidades, los sustratos que pueden ser procesados enzimáticamente por la ureasa son contemplados para usarse como agentes activos. Preferiblemente, el agente activo es un sustrato que la ureasa puede utilizar para formar iones amonio, por ejemplo, urea.

Los agentes anti-tumor ejemplares incluyen citocinas y otras entidades como interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 y similares), factor beta del crecimiento transformante, linfotoxina, factor de la necrosis tumoral, interferones (por ejemplo, gamma-interferón), factores estimulantes de colonias (por ejemplo, GM-CSF, M-CSF y similares), factor de

permeabilidad vascular, promotores de la respuesta inflamatoria a la lecitina (selectinas) como la L-selectina, E-selectina, P-selectina y entidades proteinaceas, como la proteína receptora de C1q y NK. Los agentes anti-tumor adecuados adicionales incluyen compuestos que inhiben la angiogénesis y por lo tanto inhiben la metastásis. Los ejemplos de esos agentes incluyen protamina medroxiprogesterona, polisulfato de pentosan, suramina, taxol, talidomida, angiostatina, interferón-alfa, inhibidores de metaloproteinasa, factor plaquetario 4, somatostatina, trombospondina. Otros ejemplos representativos y no limitantes de agentes activos útiles de acuerdo con la invención incluyen a la vincristina, vinblastina, vindesina, busulfan, clorambucil, espiroplatino, cisplatino, carboplatino, metotrexato, adriamicina, mitomicina, biomicina, citosina arabinósido, arabinosil adenina, mercaptopurina, mitotano, procarbacina, dactinomicina (antinomicina D), daunorubicina, clorhidrato de doxorrubicina, taxol, plicamicina, aminoglutetimida, estramustina, flutamida, leuprolida, acetato de megestrol, tamoxifen, testolactona, trilostano, amsacrina (m-AMSA), asparaginasa (L-asparaginasa), etopósido, productos de sangre como las hematoporfirinas o derivados de los anteriores. Otros ejemplos de agentes activos incluyen

material genético como ácido nucleicos, ARN y ADN de origen natural o sintético, incluyendo ADN y ARN recombinante. El ADN que codifica para ciertas proteínas puede ser usado para el tratamiento de muchos tipos diferentes de enfermedades. Por ejemplo, el factor de la necrosis tumoral o genes de interleucina-2 puede ser proporcionados para tratar cánceres avanzados; los genes de timidina cinasa pueden ser proporcionados para tratar el cáncer de ovario o tumores cerebrales; y los genes de interleucina-2 pueden ser proporcionados para tratar neuroblastomas, melanoma maligno o cáncer de riñón. Los agentes activos adicionales contemplados para usarse en la presente invención son descritos en la Patente Estadounidense No. 6,261,537, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los agentes y tamices antitumorales para detectar esos agentes son revisados en Monga, M. y Sausville, E.A. (2002) *Leukemia* 16(4):520-6.

En ciertas modalidades, el agente activo es un compuesto antitumoral débilmente básico cuya efectividad es reducida por un gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido. Los compuestos antitumorales débilmente básico ejemplares incluyen a la doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, epirrubicina, mitomicina, bleomicina, alcaloides de vinca, como la vinblastina y vincristina, agentes

alquilantes como el clorhidrato de ciclofosfamida y mecloretamina, y derivados de purina y pirimidina antineoplásicos.

En una modalidad de la invención, la composición incluye ureasa, y carece sustancialmente de citocinas, por ejemplo factor de la necrosis tumoral y/o interferones. En esta modalidad, la ureasa sola, o con agentes activos diferentes a las citocinas, preferiblemente en combinación con agente antitumorales de molécula pequeña, es efectiva para inhibir el crecimiento de células cancerosas. De este modo, en esta modalidad, la composición puede o no actuar en concierto con citocinas endógenas o nativas presentes en el sujeto que esté siendo tratado, pero la composición que esté siendo administrada no contenga citocinas exógenas adicionales.

D. **Agentes para formar imágenes**

De igual modo, pueden ser incluidos agentes para formar imágenes en la composición o en composiciones adicionales. Los agentes para formar imágenes adecuados incluyen agentes comercialmente disponibles usados en la tomografía de emisión positrónica (PET), tomografía ayudada por computadora (CAT), tomografía computarizada de emisión fotónica simple, rayos X, fluoroscopia,

formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

Los agentes formadores de imágenes incluyen metales, isótopos radioactivos y agentes radioopacos (por ejemplo, galio, tecnesio, indio, estroncio, yodo, bario, bromo y compuestos que contienen fósforo), agentes radiolucentes, agentes de contraste, tintes (por ejemplo, tintes fluorescentes y cromófores) y enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica. En general, esos agentes pueden ser unidos o atrapados usando una variedad de técnicas como se describió anteriormente, y pueden estar presentes en cualquier orientación. Véase, por ejemplo las Patentes Estadounidenses Nos. 6,159,443 y 6,391,280, ambas de las cuales se incorporan expresamente aquí como referencia.

Los agentes de contraste de acuerdo a la presente invención son útiles en las modalidades de formación de imágenes, como agentes de contraste de rayos X, sondas formadoras de imágenes luminosas, marcas de espina o unidades radioactivas.

Los ejemplos de materiales adecuados para usarse como agentes de contraste en MRI incluyen los quelatos de gadolinio actualmente disponibles, como el ácido dietilen triamin pentaacético (DTPA) y gadopentotato de dimeglumina, así como hierro, magnesio, manganeso, cobre y cromo.

Los ejemplos de materiales útiles para CAT y rayos X incluyen materiales basados en yodo, como monómero iónicos tipificados por el diatrizoato y yotalamato, monómeros no iónicos como el yopamidol, isohexol e yoversol, dímeros no iónicos como el yotrol e yodixanol, y dímeros iónicos, por ejemplo, yoxagalto.

Puede ser incorporado aire y otros gases para usarse en la formación de imágenes por ultrasonido. Esos agentes pueden ser detectados usando las técnicas estándar disponibles en la técnica y equipo comercialmente disponible.

De acuerdo a una modalidad de la invención, las células cancerosas son puestas en contacto con un agente formador de imágenes antes o después, o antes y después de ser puestas en contacto con el agente activo. Por ejemplo, después de que la ureasa ha hecho blanco en las células tumorales, esta puede tener la capacidad de modular o regular el ambiente externo del tumor, por ejemplo, a través de cambios de pH. Los agentes formadores de imágenes que favorecen un ambiente básico serán entonces más eficaces.

Los quelatos de lantánido basados en ciclos luminiscentes y aquellos que producen principalmente firmas de resonancia magnética han mostrado ser sensibles a cambios en el pH. Las sondas luminiscentes usadas para

detectar cambios de pH típicamente detectan cambios en el tiempo de vida de la fluorescencia del ion lantánido como función del pH. De manera análoga, los agentes de contraste de resonancia magnética que modulan la capacidad de relajación del protón del agua vía cambios en el pH son útiles en la presente invención. En ambos casos, cambiando el pH en un sistema dado, pueden contemplarse agentes con contraste mejorado.

En consecuencia, se utiliza un agente de contraste sensible al pH en o cerca de la célula cancerosa. La células o células cancerosas también son expuestas a una composición de ureasa que contiene una enzima ureasa que produce un cambio en el pH en o cerca de la célula cancerosa. De esta manera, un cambio en el pH hace que las propiedades de relajación de la resonancia magnética nuclear de los protones del agua u otros núcleos en el medio acuoso cambien de tal forma que reflejen el pH. Los ejemplos de agentes de contraste sensibles al pH que pueden ser utilizados incluyen aquellos agentes que contienen un metal lantánido, como Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Db, Dy, Ho, Er, Tm, Yb y similares, u otros elementos paramagnéticos, como Fe, Mn, 17O o similares. Los agentes de contraste específicos que pueden ser utilizados incluyen H (2)(17)O, GdDOTA-4AmP(5-) el cual es descrito en *Magn Reson Med.*

2003 Feb; 49(2):249-57, y Fe(III)meso-tetra(4-sulfonaftofenil)porfina (Fe-TPPS4) como se describe en Helpern et al. (1987) *Magnetic Resonance in Medicine* 5:302-305 y la Patente Estadounidense No. 6,307,372, la cual se incorpora aquí como referencia. Además, puede ser usado en la invención Gd basado en poliion, como se describe en Mikawa et al. *Acad. Radiol* (2002) 9(suppl 1):S109-1111.

Como otra alternativa, puede ser proporcionado un reactivo de desviación en el medio acuoso que rodee a la célula cancerosa. El reactivo de desviación está configurado de modo que un cambio en el pH afecte las propiedades de desviación química de los protones del agua u otros núcleos en una forma que refleje el pH. El cambio en las propiedades de desviación química puede entonces ser medido usando resonancia magnética nuclear para determinar si el agente activo es biológicamente activo. Los reactivos de desviación ejemplares que pueden ser usados incluyen aquellos que contienen un metal lantánido como Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Db, Dy, Ho, Er, Tm o Yb, u otro elemento paramagnético. Los ejemplos específicos de reactivos de desviación que pueden ser utilizados incluyen Tm(DOTP) (5-), el complejo de tulio (III) del 1,4,7,10-tetraazocilododecan-N,N',N'',N'''-tetra(metilenfosfato). Tripolifosfato de (2)(7)-disprosio

Dy(PPP) y similares.

En una modalidad de la invención, puede ser utilizada una estrategia de agente de contraste doble usando dos agentes de gadolinio, como el GdDOTP(5-) insensible al pH y el GdDOTA-4AmP(5-) sensible al pH, para generar mapas de pH por MRI, como se describe en *Magn Reson Med* (2003) Feb; 49(2):249-57.

Los agentes preferidos para usarse con la exploración PET incluyen a la 13N y fluorodesoxiglucosa (FDG).

E. Formulación de la composición

Como se hizo notar anteriormente, las composiciones de la invención comprenden un agente activo y, opcionalmente, una entidad química asociada. Por ejemplo, un polipéptido de ureasa y polinucleótido de ureasa y/o comprenden un compuesto químico o biológico que es activo como modulador de la expresión de la ureasa o actividad de la ureasa. Además, también puede estar incluido un portador, adyuvante o vehículo farmacéutico biocompatible.

La composición también puede incluir otras secuencias nucleotídicas, polipéptidos, fármacos u hormonas mezcladas con excipientes u otros portadores farmacéuticamente aceptables. Otras composiciones además

de las composiciones farmacéuticas comprenden opcionalmente líquido, es decir, agua o líquido basado en agua.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables a ser agregados a las composiciones farmacéuticas también son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, y se encuentran fácilmente disponibles. La elección del excipiente será determinada en parte por el método particular usado para administrar el producto de acuerdo a la invención. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas para usarse en el contexto de la presente invención.

Las técnicas para la formulación y administración de composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19 Ed., Williams & Wilkins, 1995, y son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. La elección del excipiente será determinada en parte por el método particular usado para administrar el producto de acuerdo a la invención. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas para usarse en el contexto de la presente invención. Los siguientes métodos y excipientes son meramente ejemplares y no son de ninguna manera limitantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente

invención pueden ser elaboradas usando cualquier método convencional, por ejemplo, procesos de mezclando, disolución, granulación, levigación, emulsificación, encapsulación, captura, centrifugación en estado fundido, secado por rocío y liofilización. Sin embargo, la formulación farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica dependiendo de la ruta de administración la dosis deseada. Esas formulaciones pueden tener influencia sobre el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de eliminación *in vivo* del agente administrado. Dependiendo de la condición que esté siendo tratada, esas composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas y administradas de acuerdo a lo descrito en la Sección III más adelante.

Las composiciones farmacéuticas son formuladas de modo que contengan portadores farmacéuticamente aceptables adecuados, y pueden comprender opcionalmente excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que puedan ser usadas farmacéuticamente. En la modalidad de la administración generalmente determinará la naturaleza del portador o vehículo. Por ejemplo, las formulaciones para administración parenteral pueden comprender soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en

agua. Los portadores o vehículos adecuados para la administración parenteral pueden ser seleccionados de entre la solución salina, solución salina amortiguada, dextrosa, agua y otras soluciones fisiológicamente compatibles. Los portadores o vehículos preferidos para la administración parenteral son amortiguadores fisiológicamente compatibles como la solución de Hank, solución de Ringer, o solución salina amortiguada fisiológicamente. Para la administración tisular o celular, son usados en la formulación penetrantes apropiados para la barrera particular a ser penetrada. Estos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Para preparaciones que comprenden proteínas, la formulación puede incluir materiales estabilizadores, como polioles (por ejemplo, sucrosa) y/o tensoactivos (por ejemplo, tensoactivos no iónicos), y similares.

De manera alternativa, las formulaciones para uso parenteral pueden comprender suspensiones de los compuestos activos preparadas como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos apropiados incluyen aceites grasos, como el aceite de ajonjolí y ésteres de ácido graso sintéticos, como el oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas por inyección pueden contener sustancias que no incrementen la viscosidad de la

suspensión, como la carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextran. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que incrementen la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. También pueden ser usadas emulsiones, por ejemplo, dispersiones como aceite en agua y agua en aceite, opcionalmente estabilizadas por un agente emulsificante o dispersante (materiales tensoactivos; tensoactivos). También pueden ser empleados liposomas, como se describió anteriormente que contengan el agente activo para administración parenteral.

De manera alternativa, las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente en las dosis adecuadas para administración oral pueden ser formuladas usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Las preparaciones formuladas para la administración oral pueden estar en forma de tabletas, píldoras, cápsulas, obleas, pastillas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones o polvos. Para ilustración, las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden ser obtenidas combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar los auxiliares

adecuados, si se desea, para obtener tabletas. Las formulaciones orales pueden emplear vehículos líquidos similares en tipo a aquellos descritos para uso parenteral, por ejemplo, soluciones acuosas amortiguadas, suspensiones y similares.

Esas preparaciones pueden contener uno más excipientes, los cuales incluyen, sin limitación: a) diluentes como azúcares, incluyendo la lactosa, dextrosa, sucrosa, manitol o sorbitol; b) aglutinantes como el silicato de magnesio y aluminio, almidón de maíz, trigo, arroz, papa, etc; c) materiales de celulosa como la metil celulosa, hidroxipropin etil celulosa y carboximetil celulosa sódica, polivinil pirrolidona; gomas como la goma arábiga y goma de tragacanto, y proteínas como la gelatina y colágeno; d) agentes desintegrantes o solubilizantes como la polivinil pirrolidona reticulada, almidones, agar, ácido algínico o una sal del mismo como el alginato de sodio; o composiciones efervescentes; e) lubricantes como la sílice, talco, ácido esteárico o su sal de magnesio o calcio, y polietilen glicol; f) saborizantes y edulcorantes; g) colorantes o pigmentos; por ejemplo para identificar el producto o para caracterizar la cantidad (dosis) de agente activo; y h) otros ingredientes como preservativos, estabilizadores, agentes leudantes, agentes emulsificantes, promotores de

la solución, sales para regular la presión osmótica, y amortiguadores.

La composición farmacéutica puede ser proporcionada como una sal del agente activo, la cual puede ser formada con muchos ácidos, incluyendo pero sin limitarse al clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en solventes acuosos o protónicos que en las formas de base libre correspondiente.

Como se hizo notar anteriormente, las características del agente en sí y la formulación del agente puede tener influencias sobre el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de eliminación *in vivo* del agente administrado. Esa información farmacocinética y farmacodinámica puede ser recolectada a través de estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*, confirmada posteriormente en humanos durante el curso de ensayos clínicos. La guía para efectuar ensayos clínicos en humanos basados en datos en animales *in vivo* pueden obtenerse de numerosas fuentes, incluyendo, por ejemplo, http://www.clinicaltrials.gov. De este modo, para cualesquier compuestos usados en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva en animales, particularmente en humanos, puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos bioquímicos y/o basados

en células. Entonces, la dosis puede ser formulada en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación deseable que module la expresión o actividad del agente activo. Cuando se conduzcan estudios en humanos, emergerá información adicional con respecto a los niveles de dosis apropiados y duración del tratamiento para varias enfermedades y condiciones.

La toxicidad y eficacia terapéutica de esos compuestos puede ser determinada por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población).

III. Método de la Invención

Otro aspecto de la presente invención incluye el método para inhibir el crecimiento de células cancerosas. El método emplea uno o más de los componentes de la composición descritos en la Sección II anteriormente, y/o en las Secciones IV-VII, más adelante. El método incluye exponer las células a la ureasa como un agente activo en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de las células cancerosas.

A. Exposición de las Células Cancerosas a un Agente Activo

La composición de ureasa, por ejemplo, la ureasa sola o ureasa en combinación con una entidad química efectiva para mejorar la liberación de la enzima a las células cancerosas, puede ser liberada o proporcionada a las células cancerosas por un número de métodos conocidos en la técnica. En aplicaciones terapéuticas, la composición es administrada a un paciente que tiene células cancerosas en una cantidad eficiente para inhibir el crecimiento de las células cancerosas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser expuestas a células cancerosas mediante la administración por un número de rutas, incluyendo sin limitación, la parenteral, enteral, transpitelial, transmucosa, transdérmica y/o quirúgica.

Las modalidades de administración parenteral incluyen aquellas en las cuales la composición es administrada, por ejemplo, por inyecciones intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramedular, intramuscular, intraarticular, intratecal e intraventricular, inyecciones de bolo con aguja subcutánea, intragonadal o intratumoral, o perfusiones o microinfusiones continua prolongada, pulsátil o planeada usando la tecnología de bombeo apropiada. Las modalidades

de administración enteral incluyen, por ejemplo, oral, (incluyendo la bucal y sublingual) y administración rectal. Las modalidades de administración trasepitelial incluyen, por ejemplo, la administración transmucosa y la administración transdérmica. La administración transmucosa incluye, por ejemplo, la administración enteral así como la nasal, inhalación y administración pulmonar profunda, administración vaginal y administración rectal. La administración transdérmica incluye las modalidades transdérmica o transcutánea pasiva o activa, incluyendo, por ejemplo, parches y dispositivos de iontoforésis, así como aplicaciones tópicas de pastas, cataplasmas o ungüentos. Las técnicas quirúrgicas incluyen la implantación de composiciones de depósito (reservorios), bombas osmóticas, y similares.

Puede efectuarse una o múltiples administraciones de agente activo dependiendo de la dosis y frecuencia requerida y tolerada por el sujeto. En cualquier caso, la composición deberá proporcionar una cantidad suficiente del agente activo de la invención para tratar efectivamente al sujeto.

Será apreciado por un experto en la técnica que existen algunas regiones que no están muy vascularizadas o que están protegidas por células unidas por uniones fuertes y/o mecanismos de transporte activo que reducen o

evitan la entrada de moléculas presentes en el flujo sanguíneo. De este modo, por ejemplo, la administración sistémica de agentes terapéuticos para tratar gliomas, u otros cánceres cerebrales, puede ser restringida por la barrera cerebro-sanguínea que resiste la entrada de macromoléculas hacia el espacio subaracnoide. En esos tipos de tumores, la composición terapéutica puede ser administrada, de manera preferible, directamente al sitio del tumor. De este modo, por ejemplo, los tumores cerebrales pueden ser tratados administrando la composición terapéutica directamente al sitio del tumor, por ejemplo, a través de la inyección de un bolo, microinfusión o un catéter implantado quirúrgicamente.

La exposición puede incluir visualizar la célula o tumor canceroso con una herramienta para guiar imágenes, por ejemplo, como se describe en Enhanced Magnetic Resonance Imaging, V. M. Runge, ed., C. V. Mosby Co. (1989) para MRI; por ejemplo en la EP 188,256; Kozak et al., TIBTEC Octubre 1986, 262; Radiotracers for Medical Applications, CRC Press, Boca Raton, Fla., para radiodiagnosticos y/o para radioterapia; en Positron Emission Tomography of the Brain, Springer Verlag 1983, for PET; y en J. W. Nowicky et al., "Macroscopic UV-Making Through Affinity," J. Tumor Marker Oncology 31, 463-465 (1988). De este modo, puede ser incorporado

cualquiera de una variedad de agentes de diagnóstico dentro de las composiciones, las cuales pueden ser suministradas local o sistémicamente a los agentes incorporados después de la administración al paciente.

Los agentes para formar imágenes, como se describió anteriormente, pueden ser usados para permitir la verificación del tratamiento del tumor después de la administración de las composiciones en el paciente. Por ejemplo, ellos son administrados típicamente antes de efectuar el procedimiento de formación de imágenes. También es posible que la administración sea simultánea con la formación de imágenes donde se desee, por ejemplo, en estudios farmacocinéticos. El periodo de tiempo óptimo requerido para la localización del sitio blanco y la mejora óptima de la imagen también variará con el agente activo y/o conjugado y/o el tejido y/o modalidad de formación de imágenes, y también será determinable de manera rutinaria. Típicamente, la formación de imágenes ocurrirá antes de una eliminación significativa del agente activo del sitio, periodo de tiempo el cual también puede ser determinado de manera rutinaria por aquellos expertos en la técnica. En ciertas modalidades, los agentes activos o conjugados serán administrados de 15 minutos a 4 horas antes de efectuar el procedimiento de formación de imágenes, puesto que los agentes activos

pueden ser localizados rápidamente en sus sitios blancos y entonces, opcionalmente, eliminados rápidamente de los mismos, como se discute más adelante.

En una modalidad de la invención, la exposición incluye interrogar al sujeto con una herramienta de diagnóstico capaz de detectar cambios en el pH extracelular en el tejido de un sujeto, e identificar una región tisular dentro del sujeto que no esté en elevación seleccionada en el pH extracelular después de la administración. Sobre la base de la identificación, la exposición puede ser repetida hasta que se alcance el cambio seleccionado en el pH extracelular dentro de todo el tumor sólido.

En una modalidad de la invención, incluye administrar la composición de agente activo parenteralmente al sujeto de manera diferente a la inyección directa. El agente activo puede ser derivado como se discutió en la Sección II, anteriormente.

Como se discutió anteriormente, la ureasa cataliza la hidrólisis de urea, conduciendo a la producción de carbamato y amoniaco. En un ambiente acuoso, el carbamato se descompone rápida y espontáneamente para producir una segunda molécula de amoniaco y una de dióxido de carbono (Fig. 1). La ureasa tiene una amplia variedad de funciones. Su papel

ambiental principal es permitir a los organismos usar la urea generada externa o internamente como fuente de nitrógeno. En plantas la ureasa puede participar en las vías sistémicas de transporte y posiblemente actuar como una proteína de defensa tóxica.

El sustrato para la ureasa es la urea, la cual es producida en el hígado, llevada en la corriente sanguínea a los riñones, y excretada en la orina. Las concentraciones de urea en suero en humanos sanos son típicamente de entre 1 y 10 mM, aunque los niveles de urea en la orina pueden exceder de 0.5 M (Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck and Co., Inc., Rahway, NJ, 1999). La urea también esta presente en las secreciones de las glándulas exocrinas mayores y menores a concentraciones aproximadamente equivalentes a suero, de modo que una gran proporción de urea circulante es translocada sobre las superficies celulares por los sistemas secretorio, o en exudados tisulares (Burne, R.A. and Chen, Y.M., *Microbes and Infection*, 2, 2000; 533-542). Por ejemplo, los humanos adultos secretan casi un litro de saliva por día que contiene 1-10 mM de urea, y aproximadamente 20-25% de toda la urea producida entra al tracto intestinal en lugar de salir del cuerpo en la orina (Visek, W.J., *Fed. Proc.* 31(1972) 1178-1193). No existe un mecanismo de afluente activo aparente para la

secreción exocrina de urea, de modo que se cree que la molécula de urea sin cargar simplemente sigue al agua a través de las células y uniones apretadas del epitelio. Como consecuencia, las superficies de las células en el cuerpo humano son bañadas en un fluido que contiene urea (McLean R. J. C., et al. CRC, *Crit. Rev. Microbiol.* 16 (1988) 37-79).

B. Exposición de Dos y Tres Etapas.

Como se hizo notar anteriormente, de acuerdo con una modalidad de la invención, el agente activo es conjugado directamente con una entidad que elige el blanco. De manera alternativa, de acuerdo a otra modalidad de la invención, se usa un método de dos pasos para proporcionar el agente activo a las células tumorales. Preferiblemente, las células tumorales están contenidas dentro de un sujeto. El método de dos pasos tiene la ventaja de desacoplar la farmacocinética del agente activo de la entidad que elige el blanco. A la entidad que elige el blanco se le permite tener acceso a los sitios blanco mientras esté conjugada con un primer par de unión, por ejemplo, un péptido que forma una espiral. Después de la secreción de la entidad que elige el blanco, sustancialmente todo el conjugado que no hizo blanco puede ser eliminado de la circulación del sujeto.

El agente activo puede entonces ser administrado a un conjugado al miembro del par de unión complementario, por ejemplo, un segundo péptido formador de espiral.

Puede ser usado cualquier sistema de dos etapas conocido en la técnica, como la biotina, haptenos, etc que tenga un par de unión de alta afinidad, por ejemplo, avidina, anticuerpos específicos, etc. Véase, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 6,190,923, 6,187,285 y 6,183,721.

Un sistema de dos etapas preferido incluye un sistema helicoidal enrollado. De este modo, en ciertas modalidades de la invención que emplean un método de dos etapas como se describió anteriormente, un primer conjugado que comprende una entidad que elige el blanco y un primer péptido que forma una espiral se caracteriza por una carga seleccionada y la capacidad de interactuar con un segundo péptido que forma una espiral de carga opuesta para formar un heterodímero helicoidal enrollado α-helicoidal estable se agrega a las células tumorales. Un método ejemplar para conjugar una entidad que elige el blanco del anticuerpo con un péptido formador de espiral se describe en el ejemplo 4.

Posteriormente, se agrega un segundo conjugado que comprende un segundo péptido formador de espiral y el agente activo a las células. Un agente activo preferible

es la ureasa. Un método ejemplar para la conjugación de la ureasa de frijol (jack bean) con el péptido que forma la espiral es descrito en el Ejemplo 2.

Cuando un primer péptido formador de espiral y un segundo péptido formador de espiral son mezclados juntos bajo condiciones que favorecen la formación de heterodímeros helicoidales enrollados α-helicoidales, ellos interactúan para formar un complejo heterodimérico helicoidal enrollado α-helicoidal de dos subunidades. Los péptidos en la conformación helicoidal enrollada α-helicoidal interactúan entre sí en una forma característica que es determinada por la secuencia primaria de cada péptido. La estructura terciaria de la α hélice es tal que siete aminoácidos residuales en la secuencia primaria corresponden a aproximadamente dos vueltas de la α-hélice. En consecuencia, una secuencia de aminoácidos primaria que da lugar a una conformación α-helicodial puede ser dividida en unidades de siete residuos cada una, llamadas "heptadas". Los péptidos de la subunidad heterodimérica están compuestos de una serie de heptadas en serie. Cuando la secuencia de una heptada se repite en un péptido de la subunidad heterodimérica particular, la heptada puede ser referida como una "repetición de heptada" o simplemente "repetición".

Un primer péptido formador de espiral y un segundo péptido formador de espiral pueden montarse en una hélice helicoidal enrollada heterodimérica (heterodímero helicoidal enrollado) en cualquier configuración paralela o antiparalela. En una configuración paralela, las dos hélices peptídicas de la subunidad heterodimérica están alineadas de modo que tienen la misma orientación (amino-terminal a carboxilo-terminal). En una configuración antiparalela, las hélices están arregladas de modo que el extremo amino-terminal de una hélice está alineado con el extremo carboxilo terminal de la otra hélice, y viceversa. Esas subunidades heterodiméricas son descritas en la solicitud de patente PCT WO 95/31480 "Composición que Contiene Inmunógeno Polipeptídico Heterodimérico y Método", fecha de publicación 23 de Noviembre de 1995, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Las subunidades ejemplares son referidas aquí como espirales K, que se refieren a subunidades cargadas positivamente cuya carga es proporcionada de manera dominante por residuos de lisina y espirales E, que se refieren a subunidades cargadas negativamente cuya carga es proporcionada de manera dominante por residuos de ácido glutámico. Los ejemplos preferidos de la aplicación mencionada anteriormente incluyen a las SEQ ID NOS: 1-2.

Los péptidos de la subunidad heterodimérica diseñados de acuerdo con la guía presentada en la solicitud referida anteriormente típicamente muestran una preferencia de montaje en una orientación paralela contra una orientación antiparalela. Por ejemplo, los péptidos ejemplares identificados por la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 forman heterodímeros de configuración paralela, como lo hacen otras secuencias peptídicas (como se discute en la solicitud WO 95/31480). Un péptido ejemplar adicional incluye un péptido de espiral K constituido de 7 aminoácidos, por ejemplo, repeticiones de la SEQ ID NO: 5. En una modalidad, la espiral K es de 35 aminoácidos de longitud; está cargada positivamente, sin estructura específica en solución. La espiral E puede ser un péptido constituido de 7 aminoácidos, por ejemplo, repeticiones de la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, la espiral E es de 35 aminoácidos de longitud, está cargada negativamente, y no tiene estructura específica en solución.

Como se hizo notar anteriormente, una de las dos subunidades peptídicas en el heterodímero tiene una entidad que elige el blanco, y el otro péptido contiene un agente activo. En ambos casos, el péptido puede ser sintetizado o derivado después de la síntesis, para proporcionar la función de unión requerida. Un método ejemplar de síntesis peptídica es el descrito en el

ejemplo 1. En general, la mayoría de los métodos de conjugación no perturban la actividad de formación de espiral de cualquiera del péptido formador de espiral, ni las conjugaciones perturban la actividad del agente activo conjugado, o la entidad que elige al blanco.

Considerando la modificación del primer péptido formador de espiral, el péptido puede ser sintetizado en su N- o C- terminal para soportar péptidos terminales adicionales que puedan funcionar como separadores entre la entidad que elige el blanco y la parte que forma la hélice del péptido. La entidad que elige el blanco-péptido que forma espiral y/o el agente activo-péptido que forma la espiral puede ser sintetizada, como se hizo notar anteriormente, por cualquier método en estado sólido, PCR o recombinante, *in vivo* o *in vitro*.

En la formación del conjugado a través del método en estado sólido, el agente activo o entidad que elige el blanco es unida covalentemente, de manera preferible, al aminoácido residual N-terminal, o a uno de los residuos orientados hacia la cara expuesta del heterodímero. Los grupos de acoplamiento preferidos son los grupos tiol de los residuos de cisteína, los cuales son modificados fácilmente por métodos estándar. Otros métodos de acoplamiento útiles incluyen al tioéster de la metionina, el grupo imidazolilo de la histidina, el grupo

guanidinilo de la arginina, el grupo fenólico de la tirosina y el grupo indolilo de triptófano. Esos agentes de acoplamiento pueden ser derivados usando condiciones de reacción conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Para unir el péptido formador de espiral del segundo agente activo al primer péptido formador de espiral de la entidad que elige el blanco, los dos péptidos son puestos en contacto bajo condiciones que favorezcan la formación del heterodímero. Un medio ejemplar para favorecer la formación del heterodímero helicoidal enrollado, es una solución acuosa fisiológicamente compatible, que tiene, típicamente, un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8 y una concentración de sal de entre aproximadamente 50 mM y de aproximadamente 500 mM. Preferiblemente, la concentración de sal es de entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 200 mM. Un medio ejemplar tiene la siguiente composición: fosfato de potasio 50 mM, KCl 100 mM, pH 7. Un medio igualmente efectivo puede hacerse sustituyendo, por ejemplo, el fosfato de sodio por fosfato de potasio y/o NaCl por KCl. Los heterodímeros pueden formarse bajo condiciones fuera del intervalo de pH y sal anterior, medio, pero algunas de las interacciones moleculares y estabilidad relativa de los

heterodímeros contra los homodímeros pueden diferir de las características detalladas anteriormente. Por ejemplo, las interacciones iónicas entre los grupos iónicos que tienden a estabilizar los heterodímeros pueden romperse a valores de pH bajos o altos debido a la protonación de, por ejemplo, las cadenas laterales de Glu a pH ácido, o la desprotonación de, por ejemplo, las cadenas laterales de Lys a pH básico. Esos efectos de valor de pH bajo y alto sobre la formación del heterodímero helicoidal enrollado pueden ser superadas, sin embargo, incrementando la concentración de sal.

El incremento de la concentración de sal puede neutralizar las atracciones iónicas estabilizantes o suprimir las repulsiones iónicas desestabilizantes. Ciertas sales tienen mayor eficacia en la neutralización de las interacciones iónicas. Por ejemplo en el caso del péptido de espiral K, se requiere una concentración de 1M o mayor de aniones ClO^{4-} para inducir una estructura α-helicoidal máxima, mientras que se requiere una concentración de 3M o más de iones Cl^{-} para el mismo efecto. Los efectos de una alta concentración de sal sobre la formación de la espiral enrollada a pH bajo y alto también muestran que las atracciones iónicas interhélice no son esenciales para la formación de la hélice, sino que, la controlan si una hélice enrollada

tiende a formarse como un heterodímero contra un homodímero. El primer péptido formador de espiral, por ejemplo, un péptido de espiral E, y el segundo péptido formador de espiral, por ejemplo un péptido de espiral K también pueden ser conjugados con entidades que elijan blancos y agentes activos como se describió en el Ejemplo 2 de la solicitud Estadounidense, coposeída, número 09/654,191 (Expediente del Apoderado #: 4800-0015.31), la cual se incorpora expresamente aquí como referencia en su totalidad. Véase, también, la Patente Estadounidense No. 6,300,141, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

En una modalidad de la invención, el péptido formador de espiral del agente activo tiene una vida media en suero corta y es excretado por la vía renal. De este modo, el agente activo accede al sitio blanco o es removido rápidamente del sujeto. La biodistribución del agente activo facilita la protección de los tejidos normales del receptor contra la exposición indeseable. Para mejorar la excreción renal, puede ser empleada la conjugación con una molécula que dirija la biodistribución que promueva la excreción renal. Una alternativa al paso de eliminación opcional es permitir que pase un periodo de tiempo suficiente que permita que los mecanismos de eliminación nativos del sujeto remuevan

sustancialmente el primer conjugado en circulación.

En otra modalidad, son empleadas entidades que eligen blancos basadas en anticuerpos y no basadas en anticuerpos para proporcionar un ligando o un antiligando a un sitio blanco que controla el antígeno desregulado. Preferiblemente, para este propósito se usa un agente de unión natural para ese antígeno no regulado. Por ejemplo, enfermedades como el hepatoma o mieloma se caracterizan, de manera general, por receptores de IL-6 no regulados para los cuales la IL-6 actúa como una entidad autócrina o paracrina con respecto a la rápida proliferación de esos tipos de célula blanco. Para el tratamiento de esas enfermedades, la IL-6 puede ser empleada por lo tanto como la entidad que elige el blanco. Véase, por ejemplo, Miki, C. et al. (2002) *Cancer* 94(5):1584-92.

Por ejemplo, la IL-6 y un primer péptido formador de espiral pueden ser conjugados vía medios químicos o ser formados con una molécula recombinante. El conjugado de IL-6-un primer péptido formador de espiral es administrado a un receptor, y la IL-6 componente del conjugado dirige la localización del conjugado a los receptores de IL-6. Esta localización ocurrirá preferiblemente en sitios que contienen receptores de IL-6 no regulados. Después de que ocurra la localización del sitio blanco, se administra, opcionalmente un agente de

eliminación, como se describe más adelante, para eliminar sustancialmente de la circulación del receptor el conjugado de IL-6-primer péptido formador de espiral. Los agentes de eliminación adecuados para este propósito son, por ejemplo, receptor de IL-6-HSA-galactosa o anticuerpo anti-IL-6-HSA-galactosa. Después de un tiempo suficiente para la eliminación sustancial, por ejemplo, del 50%, 70%, o preferiblemente 90% de la IL-6 de la circulación del receptor, el agente activo-segundo péptido formador de espiral, por ejemplo, la ureasa-segundo péptido formador de espiral, es administrado y localiza los sitios de unión vía el conjugado de IL-6-primer péptido formador de espiral.

Como se describe con mayor detalle en la Sección VII más adelante, los vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, herpes o vaccinia virus, o de varios plásmidos bacterianos, pueden ser usados para la liberación de moléculas de ureasa recombinante a la población celular que actúa como blanco. Los métodos que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica pueden ser usados para construir vectores recombinantes que contengan ureasa. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., y Ausubel et al. De manera alternativa, los agentes activos pueden ser proporcionados a las células blanco utilizando liposomas

o nanocápsulas como se describió en la Sección II anteriormente. En una modalidad, el método de la invención incluye agregar al sujeto una composición que contiene el agente activo y una entidad que elige el blanco efectiva para dirigir la composición a las células.

C. **Agentes de Eliminación**

Como se discutió anteriormente, un agente de eliminación puede ser administrado a un sujeto. Un agente de eliminación es capaz de dirigir el primer conjugado en circulación a los receptores hepatocíticos, haciendo disminuir por lo tanto la cantidad del primer conjugado en circulación antes de administrar el segundo conjugado.

Como se hizo notar anteriormente, los agentes de eliminación de proteína o composición no proteica que tienen propiedades físicas que facilitan el uso para la complejación *in vivo* y eliminación de la sangre de conjugados de la entidad que elige blancos no unidos pueden ser útiles cuando las células tumorales estén contenidas dentro de un sujeto, por ejemplo, un humano. Los agentes de eliminación preferiblemente exhiben una o más de las siguientes características: complejación rápida, eficiente, con la entidad que elige el blanco *in vivo;* eliminación rápida de la sangre de los conjugados

de entidad que eligen blanco capaces de unirse a un agente activo administrado posteriormente; alta capacidad para eliminar o inactivar grandes cantidades de conjugados de entidad que elige el blanco; y baja inmunogenicidad.

Los agentes de eliminación útiles incluyen entidades basadas en hexosa y no basadas en hexosa. Los agentes de eliminación basados en hexosa son moléculas que han sido derivadas para incorporar una o más hexosas (entidades de azúcar de 6 carbonos) reconocidas por receptores de Ashwell u otros receptores como el receptor de manosa/N-acetilglucosamina los cuales están asociados con células endoteliales y/o células de Kupffer de hígado o el receptor de manosa 6-fosfato. Las hexosas ejemplares incluyen a la galactosa, manosa, manosa 6-fosfato, N-acetilglucosamina y similares. Otras entidades reconocidas por receptores de Ashwell, incluyendo la glucosa, N-galactosamina, N-acetilgalactosamina, tioglicósidos de galactosa y, generalmente D-galactósidos y glucósidos también pueden ser usadas. La conjugación de tioglicósido de galactosa con una proteína puede ser lograda, por ejemplo, como se describe en Lee et al. (1976) *Biochemistry*, 15(18):3956 o Drantz et al. (1976) *Biochemistry*, 15(18):3963.

Los agentes de eliminación tipo proteína basados

en galactosa incluyen proteínas que tienen residuos de galactosa endógenos expuestos o que han sido derivados para exponer o incorporar esos residuos de galactosa. Los residuos de galactosa expuestos dirigen el agente de eliminación para la eliminación rápida por endocitosis hacia el hígado a través de receptores específicos (receptores de Ashwell). Esos receptores se unen al agente de eliminación e inducen la endocitosis hacia el hepatocito, conduciendo a la fusión con un lisosoma y reciclan al receptor nuevamente a la superficie celular. Este mecanismo de eliminación se caracteriza por una alta eficiencia, alta capacidad y cinética rápida.

El agente de eliminación ejemplar de la variedad basada en proteína/que contiene galactosa es el derivado de asialoorosomucoide de glicoproteína ácida alfa-1 humana. La rápida eliminación de la sangre del asialoorosomucoide es descrito en Galli, et al., *J. of Nucl Med Allied Sci* (1988) 32(2):110-16. El tratamiento de orosomucoide con neuraminidasa remueve residuos de ácido siálico, exponiendo por lo tanto los residuos de galactosa. Los agentes de eliminación derivados adicionales incluyen, por ejemplo albúmina galactosilada, IgM galactosilada, IgG galactosilada, asialohaptoglobina, asialofetuina, y asialoceruloplasmina.,

Los agentes de eliminación adicionales son

descritos en la Patente Estadounidense No. 6,358,490, expedida en Marzo 19, 2002, Patente Estadounidense No. 6,172,045, expedida en Enero 9, 2001; y la Patente Estadounidense No. 5,886,143, expedida en Marzo 23, 1999, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia.

Una clase adicional de agentes de eliminación útiles en la presente invención incluyen moléculas pequeñas, por ejemplo, que fluctúan de aproximadamente 500 hasta aproximadamente 10000 Daltones. Las moléculas pequeñas pueden ser derivadas con galactosa. Los agentes de eliminación de molécula pequeña son preferiblemente capaces de (1) complejarse rápida y eficientemente con el conjugado relevante, el péptido formador de espiral, agente activo y/o entidad que elige el blanco; y (2) eliminar esos complejos de la sangre vía el receptor de galactosa, un sistema de degradación específico del hígado, en oposición a la agregación en complejos que son absorbidos por ejemplo, por el pulmón y el bazo. Adicionalmente, la cinética rápida de la absorción hepática mediada por galactosa, acoplada con la afinidad de la interacción ligando-antiligando, permite el uso de intermediarios o aún portadores de peso molecular bajo.

En una modalidad de la invención, se usan agentes de eliminación no basados en galactosa del tipo proteico y del tipo polimérico. Esos agentes de

eliminación pueden actuar a través de un mecanismo mediado por la agregación. En esta modalidad de la invención, el agente de eliminación usado puede ser seleccionado sobre la base del órgano blanco al cual el acceso del agente de eliminación se ha excluido. Por ejemplo, los de alto peso molecular, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 200000 hasta aproximadamente 1000000 de Daltones pueden ser útiles cuando estén implicados blancos de células tumorales.

Otra clase de agentes de eliminación incluyen agentes que no remueven conjugados de agente activo/entidad que elige el blanco en circulación, sino que en su lugar inactivan los conjugados en circulación bloqueando los sitios relevantes sobre el agente activo, la entidad que elige el blanco, liposoma, vector viral y/o cualquier otra porción de los mismos. Esos agentes de eliminación "tipo tapa" son preferiblemente pequeños, por ejemplo, de 500 a 10000 Daltones, moléculas altamente cargadas, por ejemplo, sal tetrasódica derivada de 6,6'-[(3,3'-dimetil[1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis(azo)bis[ácido 4-amino-5-hidroxi-1,3-naftalen disulfónico].

E. <u>Dosis/Administración.</u>

Para el método de la invención, puede ser usado cualquier régimen de administración efectiva que regule

el tiempo y secuencia de las dosis. Los niveles de dosis ejemplares para un sujeto humano dependerán del modo de administración, extensión (tamaño y distribución) del tumor, la talla del paciente, y la respuesta del cáncer al tratamiento con ureasa.

Donde una composición de ureasa es inyectada directamente en un tumor, una dosis ejemplar es de 0.1 a 1000 unidades internacionales de actividad de ureasa por mm^3 de tumor. Por ejemplo, y asumiendo que se alcanza una distribución relativamente uniforme de la ureasa en el tumor, una dosis de entre 0.5 y 5 unidades internacionales puede ser adecuada. La colocación de la aguja de inyección puede ser guiada por técnicas guiadas por formación de imágenes convencionales, por ejemplo, fluoroscopia, de modo que el médico pueda ver la posición de la aguja con respecto al tejido blanco. Esas herramientas guía pueden incluir ultrasonido, fluoroscopia, CT o MRI.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la efectividad o distribución de la dosis de urea administrada puede ser verificada, durante o después de la inyección directa de la ureasa en el tumor, verificando el tejido tumoral por medio de una herramienta capaz de detectar cambios de pH dentro de la región del tejido canceroso del sujeto. Esas herramientas

pueden incluir una sonda de pH que pueda ser insertada directamente en el tumor, o una herramienta de visualización, como formación de imágenes de resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada (CT), o fluoroscopia. La interrogación por MRI puede ser llevada a cabo en ausencia de agentes formadores de imágenes adicionales, basándose simplemente en las diferencias en las propiedades magnéticas del tejido como función del pH. La CT o formación de imágenes fluoroscópicas puede requerir un agente formador de imágenes sensible al pH adicional cuya opacidad sea afectada por el pH del medio tisular. Esos agentes son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Antes de cualquier inyección de ureasa, el tejido tumoral puede ser visualizado por su pH más bajo en relación al tejido normal circundante. De este modo, el tejido normal puede tener un pH normal de aproximadamente 7.2, mientras que el tejido tumoral puede tener 0.1 a 0.4 o más unidades de pH. Es decir, que antes de que sea inyectada cualquier ureasa, la extensión del tejido tumoral puede ser definido por su pH más bajo. Después de la administración de ureasa, el pH de la región tumoral que tiene ureasa comenzará a elevarse, y puede ser identificado comparando las imágenes resultantes con las imágenes iniciales previas a la

dosificación.

Interrogando el tejido de esta manera, el grado de cambio en el pH y extensión del tejido afectado pueden ser verificados. Sobre la base de esta interrogación, el médico puede administrar composición adicional al sitio, y/o puede administrar composición a áreas adicionales dentro del sitio del tumor. Este procedimiento puede repetirse hasta que haya sido alcanzado un grado deseado de cambios de pH, por ejemplo, de 0.2 a 0.4 unidades de pH en toda la región del tumor sólido.

La dosificación por inyección directa puede ser repetida a intervalos adecuados, por ejemplo, cada semana o cada dos semanas, hasta que se observe un punto final deseado, preferiblemente de una regresión sustancial o completa de la masa tumoral. La eficacia del tratamiento puede ser verificada, como anteriormente, visualizando cambios en el pH del tejido tratado durante el curso del tratamiento. De este modo, antes de cada inyección adicional, el pH del tejido puede ser visualizado para determinar la extensión actualmente existente del tumor, después de lo cual los cambios en el pH del tejido pueden ser usados para verificar la administración de la nueva dosis de composición de ureasa al tejido.

Donde la ureasa es administrada parenteralmente por un método diferente a una inyección directa, una

dosis ejemplar de ureasa es de 100-100000 unidades internacionales/kg de actividad de ureasa/kg de peso corporal del sujeto. Como se hizo notar aquí, la composición de ureasa en este método incluye preferiblemente un agente que elige el blanco para que la ureasa haga blanco en las células cancerosas, por ejemplo, en el sitio del tumor sólido, o para secuestrar ureasa, por ejemplo, en forma liposomal, selectivamente en el sitio del tumor.

Como anteriormente, las técnicas de formación de imágenes que son sensibles al cambio del pH tisular, pueden ser usadas para verificar la efectividad de la dosis administrada. Puesto que esa elección del blanco puede tomar varias horas o más, el método puede implicar verificar el pH del tumor, como anteriormente, antes de la inyección de ureasa, y varias horas, por ejemplo, 12-24 horas después de la dosificación para confirmar que el sitio del tumor ha sido dosificado adecuadamente, de acuerdo a lo evidenciado por el aumento del pH de la región del tumor. Dependiendo de los resultados de esta interrogación, el método puede evitar la dosificación adicional hasta que sea observado un aumento deseado en el pH, por ejemplo, de 0.2-0.4 unidades de pH. Una vez establecida esta dosis, el paciente puede ser tratado con una dosis similar de la composición de ureasa sobre una

base regular, por ejemplo, una o dos veces a la semana, hasta que se alcance un cambio en el tamaño o condición del tumor.

En ambos tipos de administración, el régimen de la dosis final será determinado por el médico que preste la atención en vista de una buena práctica médica, considerando varios factores que modifiquen la acción de los fármacos, por ejemplo la actividad especifica del agente, la severidad del estado de la enfermedad, la respuesta del paciente, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la severidad de cualquier infección, y similares. Pueden ser tomados en cuenta factores adicionales, incluyendo el tiempo y frecuencia de la administración, combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción, y tolerancia/respuesta a la terapia. El refinamiento adicional de la dosis apropiada para el tratamiento que implica cualquiera de las formulaciones mencionadas aquí es efectuado de manera rutinaria por el experto practicante, especialmente, a la luz de la información de la dosis y ensayos descritos, así como los datos farmacocinéticos observados en ensayos clínicos. Las dosis apropiadas pueden ser determinadas a través del uso de ensayos establecidos para determinar la concentración del agente en un fluido corporal u otra muestra junto con

los datos de respuesta a la dosis.

La frecuencia de la dosis dependerá de los parámetros farmacocinéticos del agente y la ruta de administración. La dosis y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de agente activo o para mantener el efecto deseado. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas en una sola dosis, dosis discretas múltiples, infusión continua, depósitos de liberación sostenida, o combinaciones de los mismos, según se requiera para mantener el nivel mínimo deseado del agente.

Las composiciones farmacéuticas de acción breve (es decir, vida media corta) pueden ser administradas una vez al día o más de una vez al día (por ejemplo, dos, tres, o cuatro veces al día). Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden ser administradas cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas. Las bombas, como las bombas subcutáneas, intraperitoneales o subdurales pueden ser las preferidas para la infusión continua.

Las composiciones que comprenden un agente activo de la invención formulado como se describió en la Sección II, anteriormente, en un portador farmacéuticamente aceptable, pueden ser preparadas, colocadas en un recipiente apropiado, y etiquetadas para

129

el tratamiento de una condición indicada. Las condiciones indicadas en la etiqueta pueden incluir, pero no limitarse a, el tratamiento y diagnóstico de varios tipos de cánceres. También se contemplaron equipos, como se describe más adelante, donde el equipo comprende una forma de dosificación de una composición farmacéutica y un inserto de paquete que contiene instrucciones para el uso de una composición en el tratamiento de una condición médica.

De manera general, los agentes activos usados en la invención son administrados a un sujeto en una cantidad efectiva. Generalmente, una cantidad efectiva es una cantidad efectiva para (1) reducir los síntomas de la enfermedad que se busca sea tratada; o (2) inducir un cambio farmacológico relevante para tratar la enfermedad que se busca sea tratada. Para el cáncer, una cantidad efectiva puede incluir una cantidad efectiva para: reducir el tamaño de un tumor; retardar el crecimiento de un tumor; prevenir o inhibir metástasis; o incrementar la expectativa de vida de un sujeto afectado. Un método ejemplar de administración del agente activo a ratones es descrito en el Ejemplo 6, más adelante.

Los agentes activos, agentes de eliminación y/o agentes formadores de imágenes de la presente invención pueden ser administrados en una sola o múltiples dosis.

De manera alternativa, los agentes pueden ser infundidos intravenosamente durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, un agente de eliminación puede ser administrado intravenosamente durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar la entidad que elige el blanco en una forma continua.

En modalidades que administran unidades que eligen el blanco múltiples de la invención, descritas anteriormente, la dosis de cada componente administrado puede ser determinada por el médico que preste la atención de acuerdo con su experiencia; los particulares de la condición del receptor, por ejemplo, la naturaleza y localización del sitio blanco, incluyendo los antígenos asociados con este, tendrán impacto sobre las decisiones de selección de la entidad que elija el blanco y la ruta de administración; y la combinación de la entidad que elija el blanco a ser empleado, por ejemplo, el desempeño del anticuerpo puede variar con respecto a la densidad del antígeno y la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

IV. Método para Potenciar un Fármaco Anticáncer

Como se hizo notar anteriormente, una de las limitaciones en la quimioterapia actual es que el tumor blanco se vuelve cada vez más resistente al efecto del

compuesto antitumoral. Esta resistencia puede deberse a la absorción reducida del compuesto hacia las células tumorales, disponibilidad reducida del fármaco en el sitio de absorción, o incremento del metabolismo intracelular.

Para un número de fármacos débilmente básicos, es decir, fármacos que tienen una o más aminas protonizables, el mecanismo de absorción del fármaco puede implicar la difusión pasiva a través de la membrana celular en forma no cargada. En consecuencia, la velocidad de movimiento del compuesto a través de la membrana celular dependerá del gradiente de pH interno/externo. Si el pH extracelular es igual o mayor que el pH intracelular, por ejemplo, alrededor de un pH de 7.2, el compuesto tenderá a pasar hacia las células en forma no cargada al menos tan frecuentemente como sale de la célula. Por el contrario, cuando el pH extracelular cae con respecto al pH intracelular, como ocurre en tumores sólidos, el pH externo más bajo favorecerá la forma cargada, protonada, del compuesto y esto inhibirá la absorción del fármaco hacia las células. En efecto uno de los efectos del pH extracelular más bajo en los tumores es que protege al tumor contra compuestos antitumorales débilmente básicos.

El compuesto antitumoral débilmente básico cuya

actividad puede ser afectada de manera adversa por un pH extracelular más bajo incluye a la doxorrubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, epirrubicina, mitomicina, bleomicina, alcaloides de vinca como la vinblastina y vincristina, agentes alquilantes, como la ciclofosfamida y clorhidrato de mecloretamina y derivados de purina o pirimidina antineoplásicos.

En el método de la presente, la ureasa o una composición que contiene ureasa es administrada a un tumor sólido en una cantidad efectiva para elevar el pH extracelular del fluido tumoral al menos 0.1 unidades de pH, por ejemplo de 0.1 a 0.5 unidades de pH o más. En ciertas modalidades, el pH extracelular del fluido se eleva a al menos un pH de 7.0, 7.2 o más.

La ureasa puede ser administrada de acuerdo a lo descrito en la Sección III anteriormente, por ejemplo, directamente al tumor del sujeto o parenteralmente además de por inyección directa. También, como se describió anteriormente, el cambio en el pH producido por la administración de ureasa puede ser verificado determinando cambios en el pH en el tejido tumoral y el grado de aquellos cambios, usando herramientas de formación de imágenes para la visualización del pH del tumor, o por mediciones de pH directas del tumor.

La dosis administrada en este método puede ser

menor que la necesaria donde la ureasa sea el único agente antitumoral, en tanto la cantidad inyectada sea suficiente para producir el aumento deseado en el pH del tumor. De manera alternativa, el método puede implicar la administración de una cantidad terapéutica de ureasa y una cantidad terapéutica o subterapéutica del compuesto anticáncer. Como puede ser apreciado, el método puede permitir que se de una dosis más baja de lo normal del compuesto antitumoral, tanto debido a que la ureasa mejora el efecto terapéutico del compuesto, como debido a que la ureasa en sí contribuye al efecto terapéutico. Como resultado se obtiene una mayor eficacia con menos efectos laterales.

En una modalidad, una entidad química, como se describió anteriormente, también puede ser asociada con el agente activo para mejorar la liberación del agente activo. En esta modalidad, el agente activo puede ser administrado por cualquier método, por ejemplo, parenteralmente, además de la inyección directa.

V. **Método de Verificación del Tratamiento Anticáncer**

La invención también proporciona, en otro aspecto más, un método para verificar el tratamiento anticáncer evaluando la presencia, tamaño o condición de un tumor sólido en un sujeto. El método incluye

administrar una agente activo como se describió anteriormente, por ejemplo, ureasa, a un sujeto que contenga, o se sospeche que contiene, un tumor sólido. El agente activo es administrado bajo condiciones efectivas para localizar el agente activo en el tumor sólido en el sujeto.

El sujeto es interrogado con una herramienta de diagnóstico capaz de detectar cambios en el pH extracelular en el tejido de un sujeto, como se describió anteriormente. La herramienta de diagnóstico es preferiblemente un agente de diagnóstico sensible al pH, como un reactivo formador de imágenes, de contraste o de desviación, como se describió en la Sección II, anteriormente, capaz de localizarse en el tumor, que puede ser administrado antes de, después de o concurrentemente con el agente activo. Es identificada una región tisular dentro del sujeto que muestra una elevación en el pH extracelular después de la administración. Puede ser usada cualquier herramienta capaz de identificar al agente de diagnóstico para identificar al agente, como MRI, exploración PET, y similares, como se describió anteriormente.

En una modalidad, el método incluye administrar ureasa al sujeto empleado en una terapia antitumor, y la identificación es usada para detectar la localización de

ureasa en un tumor sólido.

La identificación puede ser usada para verificar el cambio en el tamaño y forma del tumor en respuesta a la administración de ureasa.

En una modalidad que emplea exploración PET, al sujeto se administra amoniaco marcado con 13N. Al paciente se administra entonces ureasa en una cantidad efectiva para alcanzar el sitio del tumor. La ureasa hidroliza a la urea para producir amoniaco no marcado. Con el tiempo, el amoniaco marcado se diluye o es desplazado, produciendo una eliminación gradual en la exploración.

En una modalidad que emplea exploración PET, se administra al sujeto urea marcada con 13N. Al paciente se administra entonces urea en una cantidad efectiva para alcanzar el sitio del tumor. La ureasa hidroliza la urea marcada para producir amoniaco marcado, el cual podría ser detectado en la exploración.

VI. Equipos

En un aspecto más, esta invención proporciona equipos para inhibir el crecimiento de células tumorales usando los métodos descritos aquí. Los equipos incluyen un recipiente que contiene uno o más agentes activos. Los equipos pueden incluir adicionalmente cualesquier otros

componentes descritos aquí para la práctica de los métodos de esta invención. esos componente incluyen, pero no se limitan a componentes farmacéuticos, entidades que eligen blancos, agentes de formación de imágenes, gentes de iluminación, componentes de terapia genética y similares.

El equipo puede incluir, opcionalmente, materiales de instrucciones que contengan instrucciones (es decir, protocolos) que describan el uso de los agentes activos para inhibir el crecimiento de células tumorales. De este modo, en una modalidad, el equipo incluye una composición farmacéutica que contiene un agente activo, preferiblemente una enzima ureasa, y material con instrucciones que enseña la administración de la composición en un sujeto, para el tratamiento de un cáncer en un sujeto. En una modalidad, el material con instrucciones enseña la administración de la composición de ureasa a un sujeto en una cantidad que depende del tamaño del tumor y de entre 0.1 a 100 unidades internacionales de actividad de ureasa por mm^3 de tumor, cuando la composición es administrada por inyección directa en el tumor, y en una cantidad entre 100-100,000 unidades internacionales/kg de peso corporal del sujeto, cuando la composición es administrada parenteralmente al sujeto además de inyección directa al tumor.

En otra modalidad, el material con instrucciones enseña la administración de la composición de ureasa a un sujeto que también está recibiendo un compuesto antitumor débilmente básico cuya efectividad es reducida por un gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido, en una cantidad de ureasa efectiva para reducir o revertir el gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido.

De manera alternativa, el material con instrucciones enseña la administración de la composición de ureasa a un sujeto que contiene, o se sospecha que contiene, un tumor sólido, bajo condiciones efectivas para localizar la ureasa en un tumor sólido en el sujeto, interrogar al sujeto con una herramienta de diagnóstico capaz de detectar cambios en el pH extracelular en el tejido de un sujeto, e identificar la región del tejido dentro del sujeto que muestra una elevación en el pH extracelular seguida de la administración.

Aunque los materiales con instrucciones típicos comprenden materiales escritos o impresos no se limitan a esos. Cualquier medio capaz de almacenar esas instrucciones y comunicarlas a un usuario final es contemplado por esta invención. Esos medios incluyen, pero no se limitan a medios electrónicos de

almacenamiento (por ejemplo discos magnéticos, cintas, cartuchos, microcircuitos integrados), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Esos medios pueden incluir direcciones de sitios en la Internet que proporcionen esos materiales con instrucciones.

VII. Terapia Genética/Celular

También se contempló la composición de terapia genética, en otro aspecto de la invención, para usarse en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. La composición de terapia genética incluye un vector que elige el blanco efectivo, cuando se administra a un sujeto, de células cancerosas que se transfectan selectivamente, y contenido en el vector, una secuencia de ácido nucleico recombinante efectiva para producir una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, ARNm, la cual codifica para el agente activo, preferiblemente ureasa, en células cancerosas transfectadas.

En una modalidad, las células tumorales son puestas en contacto con células no tumorigénicas modificadas que expresan la molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica para el agente activo. Las células no tumorigénicas modificadas pueden ser, sin limitación, fibroblastos, células epiteliales, células

endoteliales, células óseas, queratinocitos o células no tumorigénicas modificadas irradiadas derivadas de tumores.

En otra modalidad, las células tumorales son transfectadas con un plásmido recombinante genético que codifica para una entidad que elige el blanco celular y una molécula de ácido nucleico heteróloga la cual codifica para la proteína ureasa y una secuencia líder secretora. El plásmido recombinante genético es capaz de expresar la entidad que elige el blanco celular y la proteína ureasa heteróloga y la secuencia líder secretora con un conjugado dentro de las células tumorales y por lo tanto el conjugado es dirigido por la secuencia líder secretora para abandonar la célula posteriormente para su localización selectiva en un antígeno de la superficie celular reconocido por la entidad que elige el blanco celular.

Preferiblemente, la entidad que elige el blanco celular es localizada selectivamente en un antígeno de la superficie celular, y el antígeno de la superficie celular es específico para al menos un tumor sólido humano. El plásmido recombinante genético puede comprender una secuencia reguladora de la transcripción que comprenda un promotor y un elemento de control que comprenda un cambio genético a la expresión de control

del plásmido recombinante genético.

De acuerdo a una modalidad de la invención, el plásmido recombinante genético está empaquetado dentro de un vector viral. Una variedad de vectores virales están disponibles para elegir el blanco tumoral. Se sabe que los parvovirus infectan células tumorales selectivamente. De manera alternativa, el virus puede ser diseñado para replicar selectivamente en células tumorales, de acuerdo a métodos publicados. Véase, por ejemplo, Puhlmann M; *et al.*, *Hum Gene Ther*, (1999) 10 (4):649-57; Noguiez-Hellin P; *et al. Proc Natl Acad Sci U EUA*, (1996) 93(9):4175-80; y Cooper MJ, *Semin Oncol* (1996) 23(1) 172-87. Por ejemplo, los virus pueden ser alterados de modo que contengan un gen de timidina cinasa o polimerasa mutante que permita la replicación viral únicamente en células que se dividen rápidamente que contengan esas enzimas. De manera alternativa, el virus puede ser modificado genéticamente de modo que contenga elementos de control específicos del tumor, por ejemplo, regiones promotoras específicas del tumor, que respondan a y expresen la proteína deseada o la proteína necesaria para la replicación viral únicamente en células tumorales. Preferiblemente, el plásmido recombinante genético está empaquetado dentro de un adenovirus.

A. Vectores para Clonar, Transferir y Expresar Genes

Dentro de ciertas modalidades de la invención, se emplean vectores de expresión para expresar el producto polipeptídico de la ureasa, el cual puede entonces ser purificado. En otras modalidades, los vectores de expresión son usados en terapia genética. Los vectores de expresión pueden incluir señales apropiadas proporcionadas sobre el vector, y varios elementos reguladores, como mejoradores/promotores de fuentes virales y/o de mamífero que dirijan la expresión de los genes de interés en las células anfitrionas. También se definen los elementos diseñados para optimizar la estabilidad y capacidad de la introducción del ARNm mensajero en células anfitrionas. También se proporcionan las condiciones para el uso de un número de marcadores de selección de fármacos dominantes para establecer clonas celulares permanentes, estables que expresen los productos, como lo es un elemento que liga la expresión de los marcadores de selección de fármacos a la expresión del polipéptido.

B. Elementos Reguladores

El significado del término "plásmido recombinante de expresión" incluye cualquier tipo de

plásmido recombinante genético que contenga un ácido nucleico que codifique para un producto genético en el cual parte de o toda la secuencia codificadora de ácido nucleico sea capaz de ser transcrita. El transcrito puede ser traducido en una proteína, pero en realidad no lo es. En ciertas modalidades, la expresión incluye la transcripción de un gen y la traducción del ARNm en un producto genético. En otras modalidades, la expresión únicamente incluye la transcripción del ácido nucleico que codifica para un gen de interés.

En modalidades preferidas, el ácido nucleico que codifica para un producto genético está bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. La frase "bajo el control transcripcional" significa que el promotor está en la localización y orientación correctas en relación al ácido nucleico para controlar el inicio de la ARNm polimerasa y la expresión del gen.

El término promotor será usado aquí para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que están agrupados alrededor del sitio de inicio para la ARN polimerasa II. Los promotores

pueden estar compuestos de módulos funcionales discretos, cada uno consistiendo de aproximadamente 7-20 pb de ADN, y que contiene uno o más sitios de reconocimiento para el activador transcripcional o proteínas represoras. Al menos un módulo en cada promotor funciona colocando un sitio de inicio para la síntesis de ARNm. Un módulo ejemplar está en la casilla TATA, pero en algunos promotores que carecen de una casilla TATA, como el promotor del gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor del gen tardío del SV40, el elemento discreto superpuesto al sitio de inicio en sí ayuda a fijar el lugar de inicio.

Se cree que el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés no es importante, dado que es incapaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula en la que hace blanco. De este modo, donde se hace blanco en una célula humana, es preferible colocar la región codificadora del ácido nucleico adyacente y bajo el control de un promotor que sea capaz de ser expresado en una célula humana. Generalmente, ese promotor puede incluir un promotor humano o viral.

En varias modalidades, puede ser usado el promotor del gen inicial inmediato de citomegalovirus (CMV) humano, el promotor inicial de SV40, en la

repetición terminal prolongada del virus del sarcoma de Rous, el promotor de insulina de rata y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para obtener un alto nivel de expresión de la secuencia codificadora de interés. El uso de otros promotores de fagos celulares o bacterianos virales o de mamífero, los cuales son bien conocidos en la técnica para lograr la expresión de una secuencia codificadora de interés, también es contemplado.

Donde sea empleado un inserto de ADNc, puede ser deseable incluir una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación apropiada del transcripto genético. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de la invención, y puede ser empleada cualquier secuencia, como señales de poliadenilación de hormona del crecimiento humano y SV40. También se contempló como un elemento del casete de expresión un terminador. Los elementos pueden servir para mejorar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura a través del casete hacia otras secuencias.

C. Marcadores Seleccionables

En ciertas modalidades de la invención, las células que contienen plásmidos recombinantes de ácido nucleico en la presente invención pueden ser

identificadas *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el plásmido recombinante de expresión. Esos marcadores confieren un cambio identificable a la célula que permite la fácil identificación de las células que contienen el plásmido recombinante de expresión. Típicamente, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda a la clonación y a la selección de transformante, por ejemplo, los gentes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. De manera alternativa, pueden ser empleadas enzimas como la timidina cinasa (tk) de virus del herpes simple o cloranfenicol acetiltransferasa. También pueden ser empleados marcadores inmunológicos. Los ejemplos adicionales de marcadores seleccionables son bien conocidos por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Baumann, R.P. *et al.* (2002) *Biotechniques* 32(5):1030-34.

D. **Liberación de los Vectores de Expresión**

Existen numerosas formas en las cuales los vectores de expresión pueden ser introducidos en las células. En ciertas modalidades de la invención, el plásmido recombinante de expresión que comprende un virus o plásmido recombinante modificado derivado del genoma

viral que es usado para liberar una composición de ureasa en la célula blanco. La capacidad de ciertos para entrar a células vía endocitosis mediada por el receptor, para integrarse al genoma de la célula anfitriona y expresar genes de manera estable y eficiente, los han vuelto candidatos atractivos para la transferencia de genes externos a células de mamífero.

Uno de los métodos preferidos para la liberación *in vivo* implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. El significado de "vector de expresión de adenovirus" incluye a aquellos plásmidos recombinantes que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento del plásmido recombinante y (b) expresar un polinucleótido que ha sido clonado en él. En este contexto, la expresión no requiere que el producto genético sea sintetizado. Véase, por ejemplo, Barnett, B.G. *et al.* (2002) "Targeted Adenovirus Vectors" *Biochim Biophys Acta* 1575 (1-3):1-14.

En una modalidad de la invención, el vector de expresión puede comprender una forma modificada genéticamente del adenovirus. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN de doble hebra, lineal de 36 kb, permiten la sustitución de piezas grandes de ADN adenoviral con secuencias externas de hasta 7 kb. En contraste con los retrovirus, la

infección adenoviral de células anfitrionas no da como resultado una integración cromosómica, debido a que el ADN adenoviral puede replicarse de manera episomal sin genotoxicidad potencial. También, los adenovirus son estructuralmente estables, y no se ha detectado rearreglo del genoma después de una amplificación extensa.

El adenovirus es particularmente adecuado para usarse con un vector de transferencia genética debido a su genoma de tamaño medio, facilidad de manipulación, alto título, amplia gama de células blanco y alta efectividad. La generación y propagación de vectores adenovirales puede depender de una línea celular auxiliar. Las líneas celulares auxiliares pueden ser derivadas de células humanas, o células de riñón embriónico humano, células de músculo, células hematopoyéticas u otras células mesenquimales o epiteliales embriónicas humanas. De manera alternativa, las células auxiliares pueden ser derivadas de las células de otra especie de mamífero que sean pérmisivas para adenovirus humanos. Esas células incluyen, por ejemplo, células Vero u otras células mesenquimales o epitelialas embriónicas de mono. Una línea celular auxiliar ejemplar es la línea celular 293, la cual fue transformada a partir de células de riñón embriónico humano por fragmentos de ADN Ad5 y proteínas que expresan

constitutivamente E1. Los métodos para cultivar células 293 y propagar adenovirus han sido descritos.

Pueden ser empleados virales adicionales como plásmidos recombinantes de expresión en la presente invención. Pueden ser empleados vectores derivados de virus como *vaccinia virus* (Walther, W. and Stein, U. (2000) *Drugs* 60(2):249-71), virus adeno asociados (Zhao, N. *et al.* (2001) *Mol Biotechnol* 19(3):229-37) y herpesvirus (Burton, E.A. *et al.* (2001) *Adv Drug Deliv Rev* 53(2):155-70). Los virus de replicación selectiva, específicos de tumor adicionales que pueden ser usados en la presente invención son revisados en Hawkins, L.K. *et al* (2002) *Lancet Oncol* 3(1):17-26.

También son contemplados por la presente invención varios métodos no virales para la transferencia de plásmidos recombinantes de expresión a células de mamífero cultivadas. Esos incluyen la precipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextran, electroporación, microinyección directa, liposomas cargados con ADN y complejos de lipofectamina-ADN, sonicación celular, bombardeo genético usando microproyectiles de alta velocidad, y transfección mediada por un receptor.

Una vez que ha sido liberado el plásmido recombinante de expresión en la célula, el ácido nucleico que codifica para el gen de interés, por ejemplo, el gen

de ureasa, puede ser colocado y expresado en sitios diferentes. En ciertas modalidades, el ácido nucleico que codifica para el agente activo puede ser integrado de manera estable en el genoma de la célula. Esta integración puede ser en un lugar u orientación cognada, vía recombinación homóloga (reemplazo de genes) o puede ser integrada en un lugar no específico, aleatorio (aumento de genes). En otras modalidades más, el ácido nucleico puede ser mantenido de manera estable en la célula como un segmento episomal separado del ADN. Esos segmentos de ácido nucleico o "episomas" que codifican para secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y replicación independientemente o en sincronización con el ciclo de la célula anfitriona. El método de liberación del gen recombinante de expresión y la ubicación de la célula donde permanece el ácido nucleico es dependiente del tipo de plásmido recombinante de expresión empleado.

En otra modalidad más de la invención, el plásmido recombinante de expresión puede consistir simplemente de ADN recombinante o plásmidos puros. La transferencia de plásmido recombinante puede ser efectuada por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente que permeabilicen física o químicamente la membrana celular. Esto es particularmente aplicable para

la transferencia *in vitro*, pero puede ser aplicada al uso *in vivo* también.

En otra modalidad más de la invención para transferir un plásmido recombinante de expresión de ADN puro a las células puede implicar bombardeo de partículas. Este método depende de la capacidad para acelerar microproyectiles recubiertos de ADN a una alta velocidad que les permita perforar las membranas celulares y entrar a las células sin matarlas. Varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas son útiles a este respecto. Uno de esos dispositivo depende de una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, la cual a su vez proporciona la fuerza motriz. Los microproyectiles usados pueden consistir de sustancias biológicamente inertes como perlas de tungsteno u oro.

En una modalidad, esos plásmidos recombinantes de expresión pueden ser atrapados en un liposoma, complejo lipídico, nanocápsula, u otra formulación usando uno o más de los métodos descritos en la Sección II, anteriormente. También se contemplaron complejos de lipofectamina-ADN.

En ciertas modalidades de la invención, el liposoma puede ser complejado con un virus sin hemaaglutinante (HVJ). En otras modalidades, el liposoma

puede ser complejado o empleado en conjunto con proteínas cromosomales nucleares diferentes a la histona (HMG-1). En modalidades adicionales, el liposoma puede ser complejado o empleado en conjunto con HVJ y HMG-1.

Otros plásmidos recombinantes de expresión que pueden ser usados para liberar un ácido nucleico que codifica para un gen particular a células son vehículos de liberación mediados por un receptor. Esos toman ventaja de la absorción selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por un receptor en casi todas las células eucarióticas. Debido a la distribución específica del tipo celular de varios receptores, la liberación puede ser altamente específica.

Los vehículos de elección de blancos genéticos mediados por el receptor generalmente consisten de dos componentes: ligando específico del receptor celular y un agente de unión de ADN. Han sido usados varios ligandos para la transferencia genética mediada por el receptor, por ejemplo, asialoorosomucoide y transferrina. Además, también ha sido usado el factor de crecimiento epidérmico (EGF) para liberar genes a células de carcinoma escamoso (Publicación de Solicitud de Patente Europea No. EP 0360257, incorporada específicamente aquí como referencia).

En otras modalidades, el vehículo de liberación

puede comprender un ligando y un liposoma. De este modo, es factible que un ácido nucleico que codifique para un gen particular también pueda ser liberado a un tipo específico de célula como células de pulmón, epiteliales o tumorales, por cualquier número de sistema receptor-ligando con o sin liposomas. Por ejemplo, el EGR u otras moléculas pequeñas puede ser usado como el receptor para la liberación mediada de un ácido nucleico que codifique para un gen en muchas células tumorales que exhiban sobrerregulación del receptor de EGF (Basela, J. (2002) *J. Clin Oncol* 20(9):2217-9). También, pueden ser usados, de manera similar, anticuerpos para CD5 (CLL), CD22 (linfoma), CD25 (leucemia de células T) y MAA (melanoma) como entidades que elijan el blanco.

En ciertas modalidades, la transferencia genética puede ser efectuada más fácilmente bajo condiciones *ex vivo*. La terapia genética *ex vivo* se refiere al aislamiento de células de un animal, la liberación de un ácido nucleico en las células *in vitro*, y entonces el regreso de las células modificadas al animal. Esto puede implicar la remoción quirúrgica del tejido/órganos de un animal o el cultivo primario de células y tejidos. Véase, por ejemplo, Ahonen, M. *et al.* (2002) *Mol Ther* 5(6):705-15 y Kawai, K. *et al.* (2000) *Mol Urol* 4(2):43-6; Patentes Estadounidenses Nos. 6,395,712,

6,149,904 y 6,410,029, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia.

Los cultivos primarios de células de mamífero pueden ser preparados de varias formas. Para que las células sean mantenidas viables *in vitro* y en contacto con el plásmido recombinante de expresión, las células típicamente mantendrán contacto con la relación correcta de oxígeno y dióxido de carbono y nutrientes y serán protegidas de contaminación microbiana. Las técnicas de cultivo celular son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los ejemplos de líneas celulares anfitrionas de mamífero son células Vero y HeLa y líneas celulares de ovario de hamster Chino, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, NIH3T3, RIN y MDCK. Además, puede ser elegida una cepa de célula anfitriona que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto genético en la forma deseada. Esas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos protéicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraslacional de las proteínas. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas anfitriones apropiados para asegurar

la modificación y procesamiento correctos de la proteína externa expresada.

Puede ser usado un número de sistemas de selección incluyendo, pero sin limitarse a, genes de timidina cinasa de HSV, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosoforribosiltransferasa, en células tk-, hgprt- o aprt- respectivamente. También, puede ser usada la resistencia a un anti-metabolito como base de la selección para gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G418; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina.

De lo anterior, puede observarse como varios objetivos y características de la invención son satisfechos.

Tabla 2

Secuencias Proporcionadas para Apoyar la Invención

Descripción	SEQ ID NO.
Espiral E. Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys	1

54

Tabla 2 (continuación)

Descripción	SEQ ID NO.
Espiral K: Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu	2
Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys	3
Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Cys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys	4
Espiral K: KVSALKE	5
Espiral E: EVSALEK	6
Ureasa de frijol (Jack Bean) MKLSPREVEKLGLHNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGE KTVAQLMCLGQHLLGRRQVLPAVPHLLNAVQVEATFPDGTKLVTVHDPISR ENGELQEALFGSLLPVPSLDKFAETKEDNRIPGEILCEDECLTLNIGRKAV ILKVTSKGDRPIQVGSHYHFIEVNPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEP GDCKSVTLVSIEGNKVIRGGNAIADGPVNETNLEAAMHAVRSKGFGHEEEK DASEGFTKEDPNCPFNTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGDTNLLAEIEKDY ALYGDECVFGGGKVIRDGMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIIDYTGIIKADI	7

Tabla 2 (continuación)

Descripción	SEQ ID NO.
GIKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHV HYICPQLVYEAISSGITTLVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMRLMLQSTDD LPLNFGFTGKGSSSKPDELHEIIKAGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAE HHDIQINIHTDTLNEAGFVEHSIAAFKGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIIKVC GIKNVLPSSTNPTRPLTSNTIDEHLDMLMVCHHLDREIPEDLAFAHSRIRK KTIAAEDVLNDIGAISIISSDSQAMGRVGEVISRTWQTADKMKAQTGPLKC DSSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKLADLVMWKPSFFG TKPEMVIKGGMVAWADIGDPNASIPTPEPVKMRPMYGTLGKAGGALSIAFV SKAALDQRVNVLYGLNKRVEAVSNVRKLTKLDMKLNDALPEITVDPESYTV KADGKLLCVSEATTVPLSRNYFLF	7

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran mejor la invención descrita aquí y de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

A. Ejemplo 1

A1. Síntesis Peptídica

Los péptidos fueron preparados por la metodología de síntesis en fase sólida usando la química del N-t-butiloxicarbonilo (t-Boc) convencional. Los

péptidos fueron escindidos de la resina por reacción con fluoruro de hidrógeno (20 ml/g de resina) con un contenido de anisol al 10% y 2% de 1,2-etanditiol durante 1.5 h a 4°C. Los péptidos crudos fueron lavados con éter frío, y extraídos de la resina con ácido acético glacial y secados por congelamiento o liofilización. El péptido sintético fue purificado por CLAP en fase inversa sobre una columna C-8 semipreparativa Zorbax (250 x 10 mm de D.I., tamaño de partícula de 6.5-µm, tamaño de poro de 300 Å) con un gradiente AB lineal (que fluctúa de 0.2 a 1.0% de B/min) a una velocidad de flujo de 2 ml/min, donde el solvente A es ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0.05% y el solvente B es TFA al 0.05% en acetonitrilo. La homogeneidad de los péptidos purificados fue verificada por CLAP en fase invertida, analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas MALDI.

A2. <u>Purificación por Afinidad de la Ureasa</u>

La columna de afinidad fue preparada haciendo reaccionar hidroxiurea con Sefarosa 6B (Amersham Biosciences) activada con epoxi. Los grupos activos restantes fueron bloqueados usando etanolamina 1 M.

La purificación se efectuó como sigue. La columna fue equilibrada con PEB (fosfato 0.02 M, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, pH 7.0). Se aplicó una muestra

de ureasa cruda (Figura 2) (0.5 mg/ml en PEB, 8 ml en total). La columna fue lavada con 15 ml de PB (fosfato 0.02 M, β-mercaptoetanol 1 mM, pH 7.0). La columna fue lavada entonces con 8 ml de cada uno de los siguientes: PB + NaCl 0.1 M PB + NaCl 0.5 M, y PB + NaCl 0.95M. La ureasa se eluyó con 8 ml de EB (fosfato 0.2 M, β-mercaptoetanol 1 mM, pH 4.6), recolectando fracciones de 1 ml. Las fracciones fueron verificadas leyendo la OD a 280 nm (Figura 3) y análisis por CLAP (columna C5). La columna fue almacenada en NaN_3 al 0.01%.

B. <u>Ejemplo 2 - Preparación de Conjugado de Ureasa-Espiral</u>

El conjugado de ureasa-espiral fue preparado disolviendo 10 mg de ureasa de frijol (Jack Bean) en 300 ul de amortiguador de fosfato 2 mM, pH 7.2. Entonces se agregaron 5 mg de sulfo-MBS reticulado bifuncional a la solución y la mezcla fue agitada lentamente un hora a temperatura ambiente. La mezcla fue dializada entonces contra amortiguador de fosfato de 2 mM a pH 7.2 para remover el exceso de enlazante.

La espiral K o la espiral E con enlazante cys C-terminal (1.5 mg) fue agregada a la solución de ureasa modificada con enlazante y mezclada lentamente durante 3

horas a temperatura ambiente. El conjugado de espiral-ureasa fue dializado contra amortiguador de fosfato 2 mM fresco a pH 7.2 durante la noche para remover el péptido espiral no conjugado. El conjugado de ureasa dializado fue liofilizado, disuelto entonces en 1 mL de amortiguador de fosfato 2 mM, PH 7.2 y aplicado a una columna sephadex G75 para su purificación adicional. Las fracciones de volumen vacío, que contenían el conjugado de espiral-ureasa, fueron reunidas, secadas por congelamiento o liofilización y almacenadas a 4°C.

La pureza del conjugado y la relación de espiral a ureasa en la preparación fueron determinadas por análisis de aminoácidos y espectrometría de masas MALDI usando procedimientos estándar.

C. **Ejemplo 3- Ensayo de Actividad de Ureasa y conjugado de Ureasa**

La actividad enzimática de la ureasa o conjugado de ureasa se llevó a cabo en una reacción de enzima acoplada con glutamato deshidrogenasa (GLDH). La cantidad de NADH oxidada fue determinada midiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm (Kaltwasser, H. and Schlegel, H.G., Anal. Biochem., 16, 132, 1966). Los reactivos usados fueron: amortiguador de fosfato de potasio 0.10 M, pH 7.6; Urea 1.80 M preparada en amortiguador de fosfato;

Adenosin-5'-difosfato (ADP) 0.025 M (10.7 mg/ml) en amortiguador; NADH 0.008 M (5 mg/ml) en amortiguador de fosfato; α-Cetoglutarato 0.025 M (3.7 mg/ml) en amortiguador de fosfato; solución de Glutamato deshidrogenasa (GLDH), libre de iones amonio; amortiguador de fosfato 50 U/ml preparado fresco antes del ensayo. La solución de ureasa fue preparada disolviendo en amortiguador de fosfato para producir una concentración de 0.1-0.5 U/ml. Esta solución fue preparada fresca antes del ensayo.

El ensayo fue iniciado agregando los siguientes 2.0 mL de amortiguador de Fosfato 2.40 ml, 0.10 ml de cada uno de ADP, NADH, GLDH y α-Cetoglutarato en una cubeta. El espectofotómetro fue ajustado a 340 nm y 25°C. La cubeta con los ingredientes agregados fue colocada en el espectofotómetro a 25°C durante 5 minutos para alcanzar la temperatura de equilibrio y establecer entonces la velocidad blanco, si la hay, a 340 nm.

Para iniciar la reacción enzimática se agregó 0.1 ml de solución de ureasa a la cubeta. Los cambios en la absorbancia as 340 nm fueron registrados durante 15 min. La actividad enzimática fue correlacionada con una disminución en la absorbancia a 340 nm por minuto.

160

D. **Ejemplo 4-Preparación de Conjugado de Espiral y Anticuerpo**

Los materiales incluyen: (1) Anti-hEGFR IgG2a de Rata (Serotec), 200 µg/0.2 ml (es decir 1 mg/ml); (2) Espiral E (enlazante N); (3) m-Peryodato de sodio (Pierce); y (4) Reticulador bifuncional, KMUH (Pierce).

La modificación funcional del espiral E se efectuó llevando a cabo los siguientes pasos:

a. Disolver KMUH en DMSO para preparar una solución de 10 mg/ml (2.5 mg en 250 µl de DMSO).

b. Disolver la espiral E en PB (~2 mg en 392 µl de PB 10 mM, pH 7.4 + 4 µl de TCEP, patrón de 100 mM)

c. Agregar 1 µl de Tris (2 M) para neutralizar la solución de espiral E.

d. Agregar la solución de espiral E a la solución de KMUH e incubar a T.A. durante 2 hr.

e. Almacenar la solución a 4°C durante la noche.

f. A la siguiente mañana, centrifugar a 12000 rpm durante 5 min para remover el precipitado insoluble.

g. Remover el KMUH y DMSO sobre la columna de CLAP C8 (acetonitrilo al 0-20%/H_2O con TFA al 0.05%) y recolectar todas las fracciones peptídicas (acetonitrilo al 75%).

g. Liofilizar las fracciones peptídicas y

verificar por EM.

El anticuerpo fue oxidado por los siguientes pasos:

a. Por cada 2 mg de anticuerpo, pesar 20 mg de peryodato en un frasco ámbar.

b. Agregar 2 ml de PBS, pH 7.2 y 2 ml de anticuerpo patrón en frasco (el [anticuerpo]final es 0.5 mg/ml) y agitar suavemente hasta que se disuelva el polvo de peryodato.

c. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.

d. Remover el peryodato dializando 3 veces contra amortiguador de acetato 100 mM, pH 5.5.

La conjugación se efectuó por los siguiente pasos:

a. Concentrar el anticuerpo oxidado (~2 mg en 4 ml) usando unidades Millipore Ultrafree Filter (30k MWc/o).

b. Agregar 75 µl de solución de espiral E funcionalizada (4 µg/µl ddH_2O) a la mitad de la solución de anticuerpo oxidado (que contiene ~0.75 mg de anticuerpo en amortiguador de acetato, pH 5.5).

c. Incubar a temperatura ambiente durante 2 hr con agitación.

D. Purificar la mezcla de anticuerpo usando una columna de Proteína G (Véase la Figura 4).

E. Comparar y analizar la muestra (antes y después de la purificación por afinidad).

E. Ejemplo 5-Análisis de Biacore de Conjugado de Espiral y Ureasa y el Conjugado de Espiral y Anticuerpo

La cisteína que contiene el péptido de espiral K o el péptido de espiral E fue acoplada covalentemente al microcircuito integrado biodetector Pioneer B1 de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. De manera breve, la superficie de dextrán del microcircuito integrado detector fue activada primero con NHS/EDC (15 ul) seguido por la adición de PDEA (20 ul). Se inyectó espiral K (o espiral E (50 µg/ml) en amortiguador de acetato de sodio 10 mM, pH 4.3, y se dejó reaccionar para dar una densidad superficial de aproximadamente 200-400 RU. Los grupos activados restantes fueron bloqueados por inyección (10 ul) de una solución de desactivación de cisteína 50 mM, NaCl 1 M, formiato 0.1 M, pH 4.3.

Los experimentos cinético se efectuaron en un instrumento BIAcore 3000 a 25°C. Cada ensayo en el biodetector consistió de (1) una fase de inyección de muestra 600s (espiral y ureasa o espiral y anticuerpo), (2) una fase de disociación de 600s, y (3) una fase de

regeneración de 2x 15s (guanidina HCl a 6M). Se mantuvo a una velocidad de flujo de 5 ul/min a través del ciclo. Se usó PBS como amortiguador. La señal de SPR fue registrada en tiempo real con muestreos cada 0.5 s y se graficó con RU contra el tiempo (sensograma). Cada sensograma obtenido fue corregido por cambios en el índice de refracción sustrayendo el ciclo de inyección de muestra correspondiente sobre la superficie de una célula blanco.

F. Ejemplo 6-Estudios en Animales

Se usaron ratones hembras un/un atímicos con xenoinjertos de adenocarcinoma de glándula mamaria para la prueba. Los animales seleccionados fueron generalmente de 5 a 7 semanas de edad, y sus pesos corporales al inicio del tratamiento fluctuaron de aproximadamente 15 a 28 gramos.

Se usaron células MCF para generar los xenoinjertos. Las células se hicieron crecer en medios MEM suplementados con 5000 U/ml de Penicilina/Estreptomicina, L-glutamina 200 mM, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, vitaminas, y FBS 10%; El incubador celular fue mantenido con 5% de CO2, 37.5°C, y una humedad del 80%. Las células fueron cosechadas con solución de tripsina al 0.25% (p/v)-EDTA al 0.03% (p/v). Se inyectaron subcutáneamente

aproximadamente $1x10^6$ en 100 uL en el flanco derecho de cada ratón.

Se permitió que procediera el crecimiento de tumor durante aproximadamente 6-8 días, permitiendo que el tamaño del tumor alcanzara al menos 2-4 mm de diámetro. Las dosis fueron inyectadas vía inyección intratumor. El volumen de dosis de cada animal fue de 50 µL. Cada tumor se dejó inyectar con la dosis dada del artículo de prueba en una "forma de abanico". Los volúmenes del tumor fueron tomados por mediciones por un calibrador externo. Los pesos corporales se tomaron al inicio del ensayo y al momento del sacrificio.

Los resultados, como se muestra en la Tabla 3 a continuación, muestran que los tumores no fueron perceptibles a las 24 horas después del tratamiento.

Tabla 3

Tratamiento Exitoso de Tumores en Ratones

Ratón	1	2	3	4	5	6
Célula MCF inyectada	$0.8x10^6$	$0.8x10^6$	$0.8x10^6$	$0.8x10^6$	$1.3x10^6$	$0.8x10^6$
Tamaño del tumor antes del tratamiento	22.5 mm^3	33.5 mm^3	15.6 mm^3	31.1 mm^3	32.5 mm^3	8.2 mm^3

Tabla 3 (continuación)

Ratón	1	2	3	4	5	6
Cantidad de ureasa inyectada	50U/50uL	50U/50uL	50U/50uL	50U/50uL	40U/50uL	10U/50uL
Tamaño del tumor después de la inyección (24 horas)	No perceptible	No perceptible	No perceptible	No perceptible	No perceptible	No perceptible

Aunque la invención ha sido descrita con respecto a modalidades particulares, será evidente a aquellos expertos en la técnica que pueden hacerse varios cambios y modificaciones sin apartarse de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110>Helix BioPharma Corp.

<120> Método y Composición para inhibir el crecimiento de células cancerosas

<130> 08-898277WO

<140> n/a

<141> 2003-07-16

<150> US 60/397,244

<151> 2002-07-18

<160> 7

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido formador de espiral E

<400> 1

Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala

20 25 30

Leu Glu Lys

35

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido formador de espiral K

<400> 2

Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala

20 25 30

Leu Lys Glu

35

<210> 3

<211> 35

<212> PTR

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido formador de espiral

<400> 3

Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ser Ala Leu Glu Cys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Glu Ala
20 25 30

Leu Gln Lys
35

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido formador de espiral

<400> 4

Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ser Ala Leu Lys Cys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Glu Ala

165

20 25 30

Leu Lys Lys

35

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido formador de espiral K

<400> 5

Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido formador de espiral E

<400> 6

Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys
1 5

<210> 7
<211> 840
<212> PRT
<213> *Canavalia ensiformis*

<400> 7

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

Glu Asp Asn Arg Ile Pro Gly Glu Ile Leu Cys Glu Asp Glu Cys Leu
130 135 140
Thr Leu Asn Ile Gly Arg Lys Ala Val Ile Leu Lys Val Thr Ser Lys
145 150 155 160
Gly Asp Arg Pro Ile Gln Val Gly Ser His Tyr His Phe Ile Glu Val
165 170 175
Asn Pro Tyr Leu Thr Phe Asp Arg Arg Lys Ala Tyr Gly Met Arg Leu
180 185 190
Asn Ile Ala Ala Gly Thr Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Asp Cys Lys
195 200 205
Ser Val Thr Leu Val Ser Ile Glu Gly Asn Lys Val Ile Arg Gly Gly
210 215 220
Asn Ala Ile Ala Asp Gly Pro Val Asn Gly Thr Asn Leu Gly Ala Ala
225 230 235 240
Met His Ala Val Arg Ser Lys Gly Phe Gly His Glu Glu Glu Lys Asp
245 250 255
Ala Ser Glu Gly Phe Thr Lys Glu Asp Pro Asn Cys Pro Phe Asn Thr
260 265 270
Phe Ile His Arg Lys Glu Tyr Ala Asn Lys Tyr Gly Pro Thr Thr Gly
275 280 285
Asp Lys Ile Arg Leu Gly Asp Thr Asn Leu Leu Ala Glu Ile Glu Lys
290 295 300
Asp Tyr Ala Leu Tyr Gly Asp Glu Cys Val Phe Gly Gly Gly Lys Val
305 310 315 320
Ile Arg Asp Gly Met Gly Gln Ser Cys Gly His Pro Pro Ala Ile Ser

325 330 335

Leu Asp Thr Val Ile Thr Asn Ala Val Ile Ile Asp Tyr Thr Gly Ile

340 345 350

Ile Lys Ala Asp Ile Gly Ile Lys Asp Gly Leu Ile Ala Ser Ile Gly

355 360 365

Lys Ala Gly Asn Pro Asp Ile Met Asn Gly Cal Phe Ser Asn Met Ile

370 375 380

Ile Gly Ala Asn Thr Gly Val Ile Ala Gly Glu Gly Leu Ile Val Thr

385 390 395 400

Ala Gly Ala Ile Asp Cys His Val His Tyr Ile Cys Pro Gln Leu Val

405 410 415

Tyr Glu Ala Ile Ser Ser Gly Ile Thr Thr Leu Val Gly Gly Gly Thr

420 425 430

Gly Pro Ala Ala Gly Thr Arg Ala Thr Thr Cys Thr Pro Ser Pro Thr

435 440 445

Gln Met Arg Leu Met Leu Gln Ser Thr Asp Asp Leu Pro Leu Asn Phe

450 455 460

Gly Phe Thr Gly Lys Gly Ser Ser Ser Lys Pro Asp Glu Leu His Glu

465 470 475 480

Ile Ile Lys Ala Gly Ala Met Gly Leu Lys Leu His Glu Asp Trp Gly

485 490 495

Ser Thr Pro Ala Ala Ile Asp Asn Cys Leu Thr Ile Ala Glu His His

500 505 510

Asp Ile Gln Ile Asn Ile His Thr Asp Thr Leu Asn Glu Ala Gly Phe

515 520 525

Val Glu His Ser Ile Ala Ala Phe Lys Gly Arg Thr Ile His Thr Tyr
530 535 540
His Ser Glu Gly Ala Gly Gly Gly His Ala Pro Asp Ile Ile Lys Val
545 550 555 560
Cys Gly Ile Lys Asn Val Leu Pro Ser Ser Thr Asn Pro Thr Arg Pro
565 570 575
Leu Thr Ser Asn Thr Ile Asp Glu His Leu Asp Met Leu Met Val Cys
580 585 590
His His Leu Asp Arg Glu Ile Pro Glu Asp Leu Ala Phe Ala His Ser
595 600 605
Arg Ile Arg Lys Lys Thr Ile Ala Ala Glu Asp Val Leu Asn Asp Ile
610 615 620
Gly Ala Ile Ser Ile Ile Ser Ser Asp Ser Gln Ala Met Gly Arg Val
625 630 635 640
Gly Glu Val Ile Ser Arg Thr Trp Gln Thr Ala Asp Lys Met Lys Ala
645 650 655
Gln Thr Gly Pro Leu Lys Cys Asp Ser Ser Asp Asn Asp Asn Phe Arg
660 665 670
Ile Arg Arg Tyr Ile Ala Lys Tyr Thr Ile Asn Pro Ala Ile Ala Asn
675 680 685
Gly Phe Ser Gln Tyr Val Gly Ser Val Glu Val Gly Lys Leu Ala Asp
690 695 700
Leu Val Met Trp Lys Pro Ser Phe Phe Gly Thr Lys Pro Glu Met Val
705 710 715 720
Ile Lys Gly Gly Met Val Ala Trp Ala Asp Ile Gly Asp Pro Asn Ala

725 730 735

Ser Ile Pro Thr Pro Glu Pro Val Lys Met Arg Pro Met Tyr Gly Thr

740 745 750

Leu Gly Lys Ala Gly Gly Ala Leu Ser Ile Ala Phe Val Ser Lys Ala

755 760 765

Ala Leu Asp Gln Arg Val Asn Val Leu Tyr Gly Leu Asn Lys Arg Val

770 775 780

Glu Ala Val Ser Asn Val Arg Lys Leu Thr Lys Leu Asp Met Lys Leu

785 790 795 800

Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ile Thr Val Asp Pro Glu Ser Tyr Thr Val

805 810 815

Lys Ala Asp Gly Lys Leu Leu Cys Val Ser Glu Ala Thr Thr Val Pro

820 825 830

Leu Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Phe

835 840

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una enzima ureasa en un portador o excipiente farmacéutico para usar en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero.

2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque incluye una entidad química efectiva para mejorar la liberación de la enzima a células cancerosas cuando la composición es administrada al sujeto.

3. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la entidad química incluye un polímero hidrofílico (i) conjugado con la ureasa, (ii) seleccionado del grupo que consiste de polietilen glicol, polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polihidroxipropil metacrilamida, metacrilato de polihidroxipropilo, acrilato de polihidroxietilo, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxietiloxazolina, polihidroxipropioxazolina, poliaspartamida y derivados

hidrofílicos de células, y (iii) presente en una cantidad efectiva para extender el tiempo de circulación en la sangre o reducir la antigenicidad de la composición en relación a la ureasa nativa.

4. La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque el polímero hidrofílico es polietilen glicol que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1,000 y 10,000 daltones.

5. La composición de conformidad con la reivindicación 2 ó 3, caracterizada porque la entidad química es una entidad que elige el blanco unida a la ureasa y seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo de antígeno antitumoral, anticuerpo anti-hCG, y un ligando capaz de unirse específicamente a receptores de la superficie de células cancerosas.

6. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la entidad que elige el blanco es un polipéptido, y la composición es una proteína de fusión de la entidad que elige el blanco y enzima ureasa.

7. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la ureasa incluye, en su C- o N-terminal, un primer péptido que forma un espiral, caracterizada por una carga seleccionada y una

capacidad para interactuar con un segundo péptido formador de espiral con carga opuesta para formar un heterodímero espiral enrollado α-helicoidal estable; y la entidad química incluye una entidad que elige el blanco que incluye el segundo péptido formador de espiral.

8. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque entidad química incluye vesículas que tienen enzima ureasa en forma atrapada.

9. La composición de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque las vesículas son liposomas que circulan durante mucho tiempo en virtud de un recubrimiento exterior de cadenas de polietilen glicol, y dimensionadas para extravasarse a regiones tumorales, cuando la composición es administrada intravenosamente.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque las vesículas son liposomas que tienen entidades que eligen el blanco unidas a la superficie, seleccionadas del grupo que consiste de un anticuerpo de antígeno anti-tumoral, anticuerpo anti-hCG, y ligandos capaces de unirse específicamente a receptores de la superficie de células cancerosas.

11. La composición de conformidad con la

reivindicación 2, caracterizada porque la entidad química incluye un inhibidor de ureasa asociado con ésta, en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de la enzima.

12. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la ureasa es una ureasa de planta o bacteriana.

13. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste de urea, un agente antitumoral terapéuticamente activo y un agente formador de imágenes.

14. La composición de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada porque incluye además vesículas que contienen la ureasa y agente en forma atrapada.

15. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además un compuesto antitumoral débilmente básico cuya efectividad es reducida por un gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido.

16. La composición de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque el compuesto antitumoral es seleccionado del grupo que consiste de

doxorrubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, epirrubicina, mitomicina, bleomicina, alcaloides de vinca como la vinblastina y vincristina, agentes alquilantes como la ciclofosfamida y clorhidrato de mecloretamina, y derivados antineoplásicos de purina y pirimidina.

17. El uso de una enzima ureasa en la elaboración de un medicamento para tratar o diagnosticar cáncer en un sujeto mamífero.

18. El uso de conformidad con la reivindicación 17, en la elaboración de un medicamento para tratar un tumor sólido en un sujeto mamífero.

19. El uso de conformidad con la reivindicación 17, en la elaboración de un medicamento para tratar un tumor sólido en un sujeto que está siendo tratado con un compuesto antitumoral débilmente básico cuya efectividad es reducida por un gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido.

20. El uso de conformidad con la reivindicación 17, en la elaboración de un medicamento para usarse en la generación de información de diagnóstico acerca del pH en una región de tumor sólido en un sujeto.

21. Una composición de terapia genética para usarse en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero, la composición comprende

un vector que elige el blanco efectivo, cuando se administra a un sujeto, de células cancerosas que se transfectan selectivamente, y

conteniendo el vector, una secuencia de ácido nucleico recombinante efectiva para producir un ARNm de ureasa en células cancerosas transfectadas.

22. La composición de conformidad con la reivindicación 21, donde el vector es un adenovirus.

23. La composición de terapia genética de conformidad con la reivindicación 21, donde la secuencia codifica para ureasa y una secuencia líder secretora efectiva para promover la secreción de ureasa de células cancerosas transfectadas.

181

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen una composición farmacéutica y un método para usarse para inhibir el crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero. La composición incluye una enzima ureasa, y asociada con esta, una entidad química efectiva para mejorar la liberación de la enzima a células cancerosas, cuando la composición es administrada al sujeto. También se describen un método para mejorar la efectividad de compuestos antitumorales débilmente básico, y un método para evaluar la presencia, tamaño o condición de un tumor sólido en un sujeto, de una composición para terapia genética para tratar un cáncer en un sujeto.



FIG. 1A



FIG. 1B

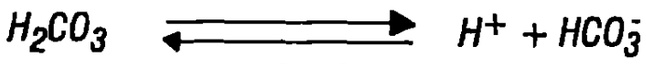


FIG. 1C



FIG. 1D

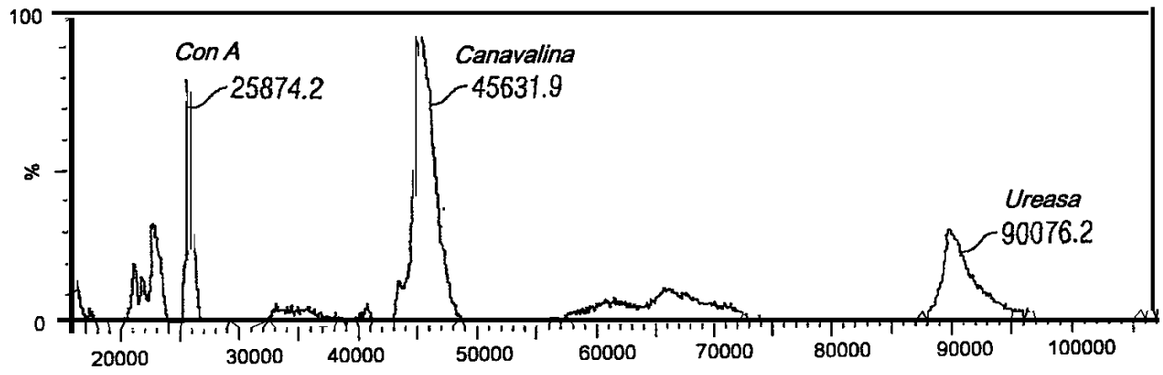

100
%
0
Con A
25874.2
Canavalina
45631.9
Ureasa
90076.2
20000
30000
40000
50000
60000
70000
80000
90000
100000

FIG. 2

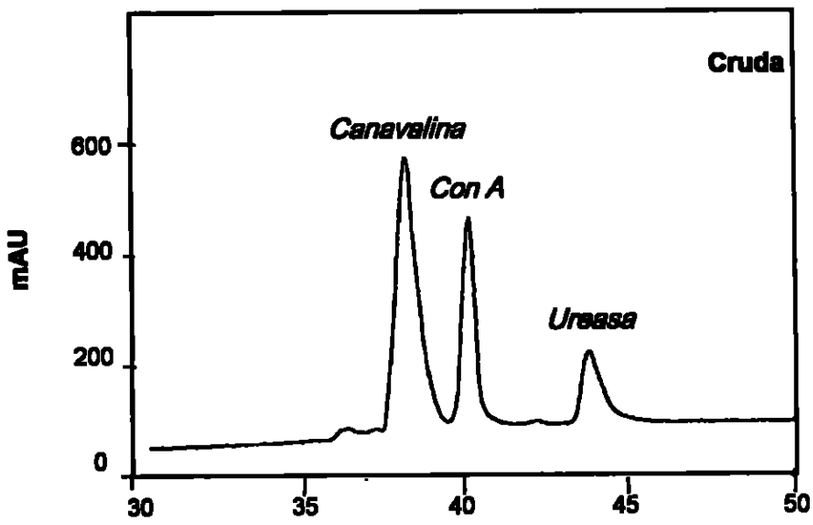

Cruda
Canavalina
Con A
Ureasa
mAU
600
400
200
0
30
35
40
45
50

FIG. 3A

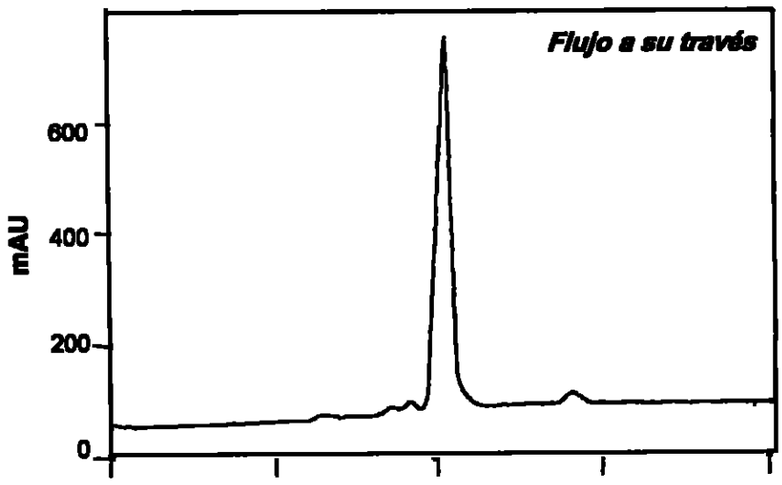

Flujo a su través
mAU
600
400
200
0

FIG. 3B

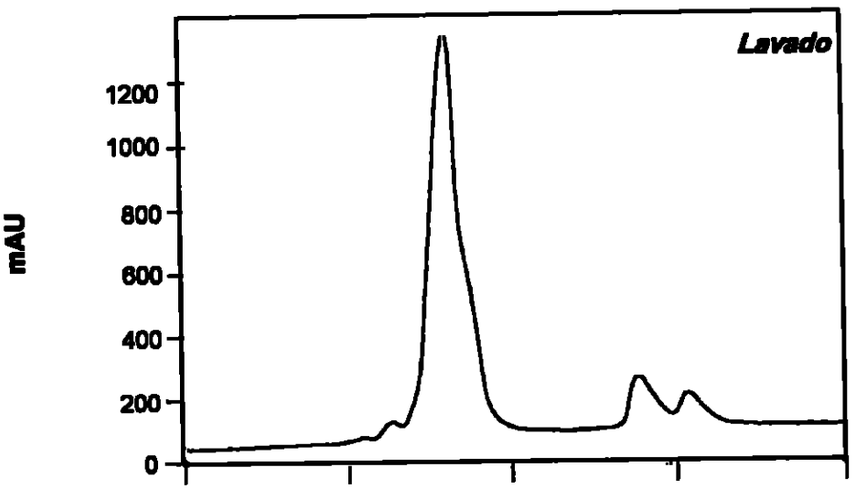

Lavado
mAU
1200
1000
800
600
400
200
0

FIG. 3C

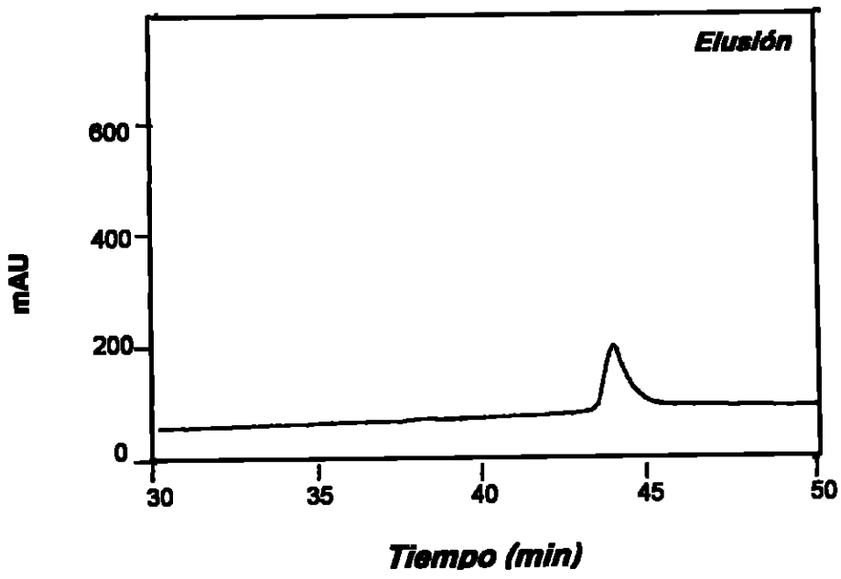

Elusión
mAU
600
400
200
0
30
35
40
45
50
Tiempo (min)

FIG. 3D

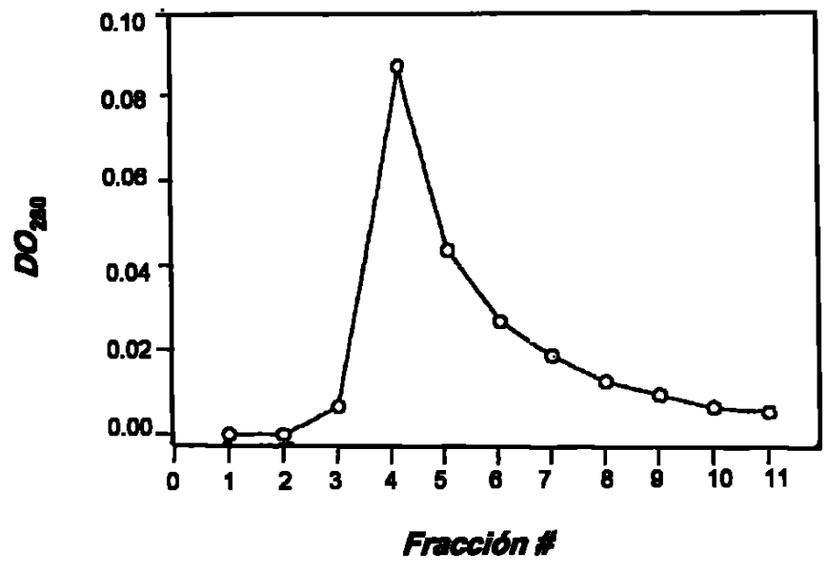

0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
DO280
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Fracción #

FIG. 4

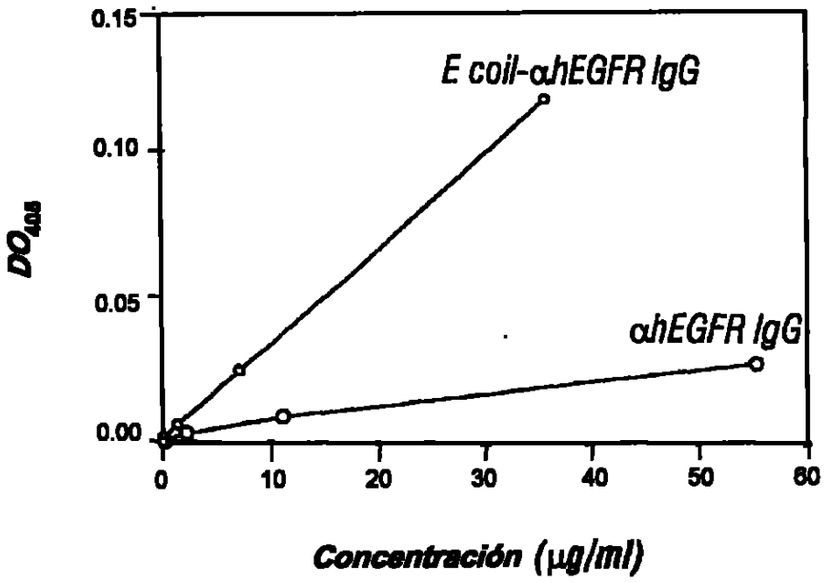

0.15
0.10
0.05
0.00
DO405
E coil-αhEGFR IgG
αhEGFR IgG
0 10 20 30 40 50 60
Concentración (µg/ml)

FIG. 5

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 January 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/009112 A1

(51) International Patent Classification[7]: A61K 38/50, 47/48, A61P 35/00

(21) International Application Number: PCT/CA2003/001061

(22) International Filing Date: 16 July 2003 (16.07.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/397,244 18 July 2002 (18.07.2002) US

(71) Applicant: HELIX BIOPHARMA CORP. [CA/CA]; 3-305 Industrial Parkway South, Aurora, Ontario L4G 6X7 (CA).

(72) Inventors: CHAO, Herman; 20 Gilbank Drive, Aurora, Ontario L4G 5G4 (CA). WONG, Wah; 17915 77th Avenue, Edmonton, Alberta T5T 2S1 (CA). SEGAL, Donald; Rural Route 3, Stouffville, Ontario L4A 7X4 (CA). McELROY, Jerry; 26 High Oak Trail, Richmond Hill, Ontario L4E 3L0 (CA). DOCHERTY, John; 65 Ostick St., Aurora, Ontario L4G 7K4 (CA). DICKSTEIN, Jodi; 18 Cornell Park Ave., Markham, Ontario L6B 1B5 (CA).

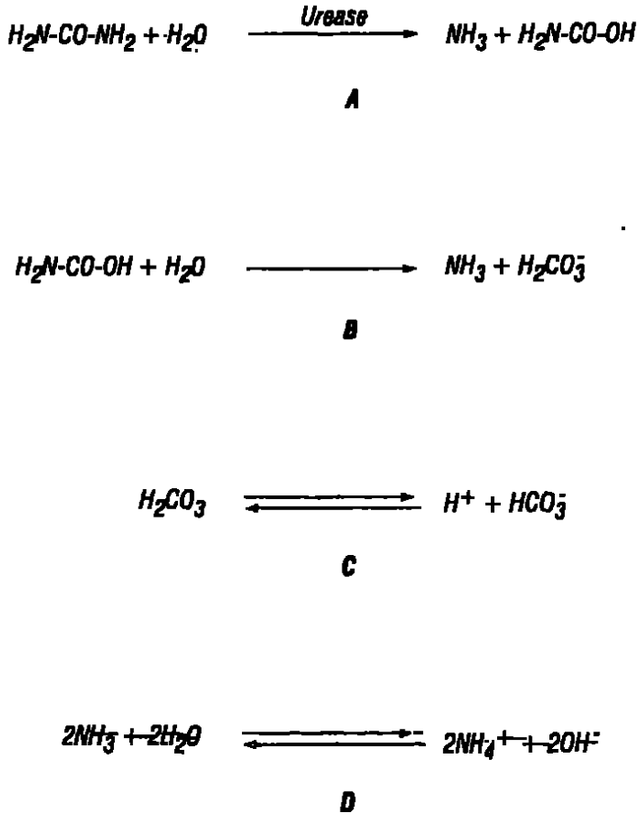
(74) Agents: ERRATT, Judy, A. et al.; Gowling Lafleur Henderson LLP, 160 Elgin Street, suite 2600, Ottawa, Ontario K1P 1C3 (CA).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Continued on next page]

(54) Title: USE OF UREASE FOR INHIBITING CANCER CELL GROWTH



(57) Abstract: A pharmaceutical composition and method for use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject are disclosed. The composition includes a urease enzyme, and associated therewith, a chemical entity effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells, when the composition is administered to the subject. Also disclosed are a method of enhancing the effectiveness of weakly basic anti-tumor compounds, a method assessing the presence, size or condition a solid tumor in a subject, and a gene therapy composition for treating a cancer in a subject.

WO 2004/009112 A1

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

USE OF UREASE FOR INHIBITING CANCER CELL GROWTH

Cross-Reference to Related Applications

This application claims priority to and benefit of U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/397,244, filed July 18, 2002, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.

Field of the Invention

The present invention relates to anticancer therapeutic methods employing urease proteins and polypeptides.

Background of the Invention

Cancer accounts for one-fifth of the total mortality in the United States, and is the second leading cause of death. Cancer is typically characterized by the uncontrolled division of a population of cells. This uncontrolled division may involve blood cells, such as various types of lymphomas, or cells that aggregate in or are native to a particular tissue or organ, e.g., solid tumors, such as secondary or primary tumors of the breast, liver, esophagus, stomach, intestines, brain, bone, or prostate.

A variety of treatment modalities have been proposed for cancer therapy. These generally include surgical resection of solid tumors, treatment with radiation, such as x-ray, chemotherapy, immune therapy, and gene therapy. The type(s) of therapy that are selected for a given cancer will depend on such factors as patient age, degree of localization of the cancer, and the type and stage of the cancer. Often the therapy will involve a combination of two or more modalities, such as x-ray therapy in combination with chemotherapy, or with immunotherapy in combination with chemotherapy.

A large number of chemotherapeutic compounds and compositions and strategies have been employed in treating cancers. Many anti-neoplastic compounds are designed to disrupt replication in rapidly dividing cells, or to inhibit a key metabolic link in actively proliferating cells. Although such approaches have met with levels of success in certain types of cancers, or

cancers at certain stages, chemotherapy is generally associated with unpleasant to debilitating side effects, such as malaise, nausea, loss of appetite, alopecia, and anemia. Further, compounds which act at the level of cell replication, either by introducing nucleotide analogs into dividing cells, or by disrupting normal replication, have the potential of introducing widespread genetic mutations in normal cells in the subject. In addition, cancer cells may develop resistance to many types of anti-tumor agents, either by limiting uptake of the agent into the cells, or by altering the metabolism of the agent within the cells.

In response to these limitations, attempts to modify chemotherapeutic agents to reduce their side effects, overcome problems of resistance, or improve their targeting to selected tumor sites have been developed. While these efforts have yielded improved therapeutic results in some cases, there remains a need to provide an improved chemotherapeutic agent and method. In particular, such an agent should be effective in killing or inhibiting the growth of cancer cells, should be relatively non-toxic both in terms of side effects and long-term effects on the genetic integrity of the treated subject, and preferably deliverable in a form that allows direct introduction into a tumor or selective targeting to tumors.

Summary of the Invention

The invention provides a pharmaceutical composition for use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject. The composition includes a urease enzyme, such as bacterial or plant urease, and a chemical entity associated with the urease for enhancing the delivery of the enzyme to cancer cells, when the composition is administered to the subject.

In one embodiment, the chemical entity includes a hydrophilic polymer conjugated to the urease in an amount effective to extend the blood circulation time or reduce the antigenicity of said composition relative to native urease. The polymer may be, for example, polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, polyvinylmethylether, polyhydroxypropyl methacrylamide, polyhydroxypropyl methacrylate, polyhydroxyethyl acrylate, polymethacrylamide, polydimethylacrylamide, polymethyloxazoline, polyethyloxazoline, polyhydroxyethyloxazoline, polyhydroxypropyoxazoline, polyaspartamide, or hydrophilic cellulose derivatives. The polymer is preferably a linear chain

polymer, such as polyethylene glycol linear chain, having a molecular weight between about 1,000 and 10,000 daltons.

The chemical entity may be a targeting moiety attached to the urease, such as an anti-tumor antigen antibody, anti-hCG antibody, or a ligand capable of binding specifically to cancer-cell surface receptors. Where the targeting moiety is a polypeptide, the composition may be a fusion protein of the targeting moiety and urease enzyme. Alternatively, where the urease may include, at its C- or N-terminus, a first coil-forming peptide characterized by a selected charge and an ability to interact with a second, oppositely charged coil-forming peptide to form a stable α-helical coiled-coil heterodimer; and the chemical entity may include a targeting moiety which includes the second coil-forming peptide.

The chemical entity may include vesicles having urease enzyme in entrapped form. Exemplary vesicles include liposomes, which are long-circulating by virtue of an exterior coating of polyethylene glycol chains and sized to extravasate into tumor regions, when the composition is administered intravenously, and liposomes having surface bound targeting moieties. The vesicles may include additional agents, such as urea, a therapeutically active anti-tumor agent or an imaging agent.

The chemical entity may include a urease inhibitor associated therewith, in an amount sufficient to inhibit the activity of said enzyme.

In another aspect, the invention includes a method for inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject. The method includes exposing the cells to urease in an amount effective to inhibit growth of the cancer cells.

Where the cancer cells comprise a solid tumor, the urease may be injected directly into the tumor of the subject, or by parenteral administration, e.g., injection, other than by direct administration. In addition to urease in a pharmaceutically acceptable carrier, the various compositions containing urease noted above are suitable for use in the invention.

The method may include modulating the activity of urease on cancer cells by administering to the subject, an amount of a urease inhibitor effective to reduce the activity of urease on said cancer cells. Urease activity may be modulated in the opposite direction by administering urea to the subject, before, during, or after urease administration.

The urease may be administered in two stages: a first stage involving a conjugate of a tumor targeting moiety and a first binding moiety having an ability to interact with a second binding moiety; and a second stage second conjugate comprising the second binding moiety conjugated with urease.

In still another embodiment, the method may include administering to the subject, a gene therapy composition composed of a targeting vector effective, when administered to the subject, of selectively transfecting cancer cells, and carried in said vector, a recombinant nucleic acid sequence effective to produce a urease mRNA in transfected cancer cells. An exemplary vector is an adenovirus. An exemplary nucleic acid sequence encodes urease and a secretory leader sequence effective to promote secretion of the urease from the transfected cancer cells.

In a related aspect, the invention provides a method of enhancing the therapeutic efficacy of a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor, in a subject receiving the agent for tumor treatment. This method involves administering to the subject, an amount of urease effective to reduce or reverse the higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor. Preferably, the amount of urease administered is effective to raise the extracellular fluid of the tumor to at least pH 7.2. The urease may be injected directly into the tumor, or by parenteral administration other than direct administration, as above.

The anti-tumor compound may be, for example, doxorubicin, daunorubicin, mitoxanthrone, epirubicin, mitomycin, bleomycin, vinca alkaloids, such as vinblastine and vincristine, alkylating agents, such as cyclophosphamide and mechlorethamine hydrochloride, and antrineoplastic purine or pyrimidine derivatives.

In still another aspect, the invention is useful in assessing the presence, size or condition of a solid tumor in a subject. Here, urease is administered to the subject containing, or suspected of containing, a solid tumor, under conditions effective to localize the urease in a solid tumor in the subject. The subject is then interrogated with a diagnostic tool, such as fluoroscopy, MRI, or positron emission tomography, capable of detecting changes in extracellular pH in a

subject's tissue, in either the presence or absence of a pH-sensitive reporter, for identifying a tissue region within the subject that shows an elevation in extracellular pH.

This method may be used in conjunction with the above treatment method to assess the extent and/or effectiveness of urease dosing or treatment. Thus, for example, in administering urease to a subject, the extent and degree of pH change in a tumor region can be followed to guide urease administration, or to assess changes in tumor size or extent during treatment.

Also disclosed is a kit for use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject. The kit has a pharmaceutical composition containing urease enzyme, and instructional materials teaching the administration of the composition to a subject, for the treatment of a cancer in the subject.

The instructional material may teach administering the urease composition to a subject in an amount which is dependent on the size of the tumor and between 0.1 to 100 international units, preferably 0.5 to 10, urease activity per mm^3 tumor, when the composition is administered by direct injection into the tumor, and in an amount between 100-100,000 international units/kg, preferably 500-10,000 international units/kg international units urease activity/kg subject body weight, when the composition is administered parenterally to the subject other than by direct injection into the tumor.

The instruction material may teach administering urease to a subject who is also receiving a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor, in an amount of urease effective to reduce or reverse the higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.

The instruction material may teach administering urease to a subject containing, or suspected of containing, a solid tumor, under conditions effective to localize the urease in a solid tumor in the subject, interrogating the subject with a diagnostic tool capable of detecting changes in extracellular pH in a subject's tissue, and identifying a tissue region within the subject that shows an elevation in extracellular pH following said administering.

Also disclosed is a gene therapy composition for use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject. This composition includes, as noted above,

a targeting vector effective, when administered to the subject, of selectively transfecting cancer cells, and carried in the vector, a recombinant nucleic acid sequence effective to produce a urease mRNA in transfected cancer cells.

These and other objects and features of the invention will become more fully apparent when the following detailed description of the invention is read in conjunction with the accompanying drawings.

Brief Description of the Drawing

Figs. 1A-1D illustrate the steps of the urease reaction. Urea is cleaved by urease to produce one molecule of ammonia and one of carbamate (A). Carbamate spontaneously decomposes to ammonia and carbonic acid (B). The carbonic acid equilibrates in water (C), as do the two molecules of ammonia, which become protonated to yield ammonium and hydroxide ions (D). The reaction results in a rise in the pH of the reaction environment;

Fig. 2 shows the mass spectrometry profile of a crude sample containing urease prepared in accordance with one embodiment of the invention;

Fig. 3 illustrates the affinity purification profiles of urease during various stages of the purification process, in accordance with another embodiment of the invention;

Fig. 4 illustrates the purification of E-coil-αhEGFR IgG conjugate by a protein-G column prepared according to one embodiment of the invention; and

Fig. 5 shows the antibody titer of purified E-coil-αhEGFR IgG conjugate prepared according to one embodiment of the invention as determined by immobilized K-coil ELISA.

Detailed Description of the Invention

I. Definitions

Unless otherwise indicated, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as they would to one skilled in the art of the present invention. Practitioners are particularly directed to Sambrook *et al.* (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Press, 3rd Ed.; and Ausubel, F.M., *et al.* (1993) in Current Protocols in Molecular Biology, for definitions and terms of the art. It is to be understood that this invention is not

limited to the particular methodology, protocols, and reagents described, as these may vary.

The term "urease" refers to an enzyme having the enzymatic activity of a urea amidohydrolase (E.C. 3.5.1.5), either naturally occurring or obtained by e.g., recombinant nucleic acid techniques and/or chemical synthesis. Urease also includes fusion proteins comprising the entire urease, subunits, or fragments thereof, and/or urease with amino acid substitutions, deletions or additions that preserve the urea amidohydrolase activity of the polypeptide. A truncated urease sequence as used herein is a fragment of urease that is free from a portion of the intact urease sequence beginning at either the amino or carboxy terminus of urease. Methods for isolating native urease, for synthesizing urease recombinantly, and for identifying active fragments and modified urease polypeptides are given below.

The term "cancer" is meant to refer to an abnormal cell or cells, or a mass of tissue. The growth of these cells or tissues exceeds and is uncoordinated with that of the normal tissues or cells, and persists in the same excessive manner after cessation of the stimuli which evoked the change. These neoplastic tissues or cells show a lack of structural organization and coordination relative to normal tissues or cells which may result in a mass of tissues or cells which can be either benign or malignant. As used herein, cancer includes any neoplasm. This includes, but is not limited to, melanoma, adenocarcinoma, malignant glioma, prostatic carcinoma, kidney carcinoma, bladder carcinoma, pancreatic carcinoma, thyroid carcinoma, lung carcinoma, colon carcinoma, rectal carcinoma, brain carcinoma, liver carcinoma, breast carcinoma, ovary carcinoma, and the like.

A "tumor" or "solid tumor" refers to a cohesive mass of cancer cells, including but not limited to semi-solid and solid tumors, solid tumor metastases, angiofibromas, retrolental fibroplasia, hemangiomas, and Karposi's sarcoma.

As used herein, the term "targeting moiety" refers to a molecule that binds to a defined population of cells or selected cell type. The targeting moiety may bind a receptor, an oligonucleotide, an enzymatic substrate, an antigenic determinant, or other binding site present on or in the target cell or cell population. An exemplary targeting moiety is an antibody. Antibody fragments

and small peptide sequences capable of recognizing expressed antigens are also contemplated targeting moieties.

As used herein, the term "inhibits growth of cancer cells" or "inhibiting growth of cancer cells" refers to any slowing of the rate of cancer cell proliferation and/or migration, arrest of cancer cell proliferation and/or migration, or killing of cancer cells, such that the rate of cancer cell growth is reduced in comparison with the observed or predicted rate of growth of an untreated control cancer cell. The term "inhibits growth" can also refer to a reduction in size or disappearance of a cancer cell or tumor, as well as to a reduction in its metastatic potential. Preferably, such an inhibition at the cellular level may reduce the size, deter the growth, reduce the aggressiveness, or prevent or inhibit metastasis of a cancer in a patient. Those skilled in the art can readily determine, by any of a variety of suitable indicia, whether cancer cell growth is inhibited.

Inhibition of cancer cell growth may be evidenced, for example, by arrest of cancer cells in a particular phase of the cell cycle, e.g., arrest at the G2/M phase of the cell cycle. Inhibition of cancer cell growth can also be evidenced by direct or indirect measurement of cancer cell or tumor size. In human cancer patients, such measurements generally are made using well known imaging methods such as magnetic resonance imaging, computerized axial tomography and X-rays. Cancer cell growth can also be determined indirectly, such as by determining the levels of circulating carcinoembryonic antigen, prostate specific antigen or other cancer-specific antigens that are correlated with cancer cell growth. Inhibition of cancer growth is also generally correlated with prolonged survival and/or increased health and well-being of the subject.

As used herein, the term "induces apoptosis" refers to the promotion of a form of programmed cell death characterized by DNA fragmentation. Apoptosis can be determined by methods known in the art. For example, kits are commercially available that detect the presence of fragmented DNA by in situ immunohistochemistry (e.g., Apoptag, available from Intergen, Purchase, N.Y.). Additionally, apoptosis can also be determined by FACS analysis, in which apoptotic cells exhibit a sub-G1 DNA content, indicating DNA fragmentation.

As used herein, an "antibody" refers to a peptide, polypeptide, or protein comprising one or more peptides or polypeptides substantially or partially

encoded by at least one immunoglobulin nucleic acid molecule or immunoglobulin gene or fragment of at least one immunoglobulin molecule or immunoglobulin gene. The recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon and mu constant region genes, as well as myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively. A typical immunoglobulin (e.g., antibody) structural unit comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" chain (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD). The N-terminus of each chain defines a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The terms "variable light chain" (VL) and "variable heavy chain" (VH) refer to these light and heavy chains, respectively. Antibodies exist as intact immunoglobulins or as a number of well characterized fragments produced by digestion with various peptidases. Thus, for example, pepsin digests an antibody below the disulfide linkages in the hinge region to produce F(ab)'2, a dimer of Fab which itself is a light chain joined to VH-CH1 by a disulfide bond. The F(ab)'2 may be reduced under mild conditions to break the disulfide linkage in the hinge region, thereby converting the (Fab')2 dimer into an Fab' monomer. The Fab' monomer is essentially a Fab with part of the hinge region (see *Fundamental Immunology* , W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), for a more detailed description of other antibody fragments). While various antibody fragments are defined in terms of the digestion of an intact antibody, one of ordinary skill in the art will appreciate that such Fab' fragments may be synthesized de novo either chemically or by utilizing recombinant DNA methodology. Thus, the term "antibody", as used herein, also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies or synthesized de novo using recombinant DNA methodologies. Antibodies include single chain antibodies, including single chain Fv (sFv) antibodies in which a VH and a VL are joined together (directly or through a peptide linker) to form a continuous polypeptide.

An "antigen-binding fragment" of an antibody is a peptide or polypeptide

fragment of the antibody that binds an antigen. An antigen-binding site is formed by those amino acids of the antibody that contribute to, are involved in, or affect the binding of the antigen. See Scott, T. A. and Mercer, E. I., CONCISE ENCYCLOPEDIA: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (de Gruyter, 3d ed. 1997) and Watson, J. D. et al., RECOMBINANT DNA (2d ed. 1992), each of which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes. The term "antibody fragment" also includes any synthetic or genetically engineered protein that acts like an antibody by binding to a specific antigen to form a complex.

The terms "active agent", "drug" and "pharmacologically active agent" are used interchangeably herein to refer to a chemical material or compound which, when administered to a subject induces a desired pharmacologic effect, and is intended to include a diagnostic or therapeutic agent, including radionuclides, drugs, anti-cancer agents, toxins and the like. Preferably, the term active agent includes proteins, glycoproteins, natural and synthetic peptides, alkaloids, polysaccharides, nucleic acid molecules, small molecules and the like. More preferably, the term active agent refers to proteins. An exemplary active agent is urease.

A "pH-sensitive" active agent refers to an active agent whose ability to induce a desired pharmacologic effect depends, at least in part, on the pH of the surrounding extracellular environment.

The term "clearing agent", as used herein, refers to an agent capable of binding, complexing or otherwise associating with an administered moiety, e.g., targeting moiety-ligand, targeting moiety-anti-ligand or anti-ligand alone, present in the recipient's circulation, thereby facilitating circulating moiety clearance from the recipient's body, removal from blood circulation, or inactivation thereof in circulation. The clearing agent is preferably characterized by physical properties, such as size, charge, configuration or a combination thereof, that limit clearing agent access to the population of target cells recognized by a targeting moiety used in the same treatment protocol as the clearing agent.

The term "imaging agent" is meant to refer to compounds which can be detected.

The term "adjuvant" refers to a substance or agent added to a formulation or composition to aid the operation of the main ingredient.

The terms "interstitial" and "extracellular" fluid refer to the fluid lying between or bathing the cells of mammals.

The terms "subject", "individual" and "patient" are used interchangeably herein to refer to any target of the treatment. Also provided by the present invention is a method of treating tumor cells *in situ*, or in their normal position or location, for example, neoplastic cells of breast or prostate tumors. These *in situ* tumors can be located within or on a wide variety of hosts; for example, human hosts, canine hosts, feline hosts, equine hosts, bovine hosts, porcine hosts, and the like. Any host in which is found a tumor or tumor cells can be treated and is in accordance with the present invention. A subject thus includes a vertebrate, preferably a mammal, more preferably a human.

By "target cell retention time" is intended the amount of time that a urease molecule or other active agent remains at the target cell surface or within the target cell.

As used herein, the term "conjugate" encompasses chemical conjugates (covalently or non-covalently bound), fusion proteins and the like.

The terms "protein", "polypeptide" or "peptide", as used herein, refer interchangeably to a biopolymer composed of amino acid or amino acid analog subunits, typically some or all of the 20 common L-amino acids found in biological proteins, linked by peptide intersubunit linkages, or other intersubunit linkages. The protein has a primary structure represented by its subunit sequence, and may have secondary helical or pleat structures, as well as overall three-dimensional structure. Although "protein" commonly refers to a relatively large polypeptide, e.g., containing 100 or more amino acids, and "peptide" to smaller polypeptides, the terms are used interchangeably herein. That is, the term "protein" may refer to a larger polypeptide, as well as to a smaller peptide, and vice versa.

A "modulator of urease" is either an inhibitor of urease or an enhancer of urease.

An "inhibitor of urease" comprises a molecule or group of molecules that interferes with: (1) the expression, modification, regulation, activation or degradation of urease; or (2) one or more of the normal functions of urease. The

normal functions of urease include the hydrolysis of urea, leading to the production of carbamate and ammonia. An inhibitor "acts directly on urease" when the inhibitor binds to urease via electrostatic or chemical interactions. Such interactions may or may not be mediated by other molecules. An inhibitor acts "indirectly on urease" when its most immediate effect is on a molecule other than urease which influences the expression, activation or functioning of urease.

An "enhancer of urease" comprises a molecule or group of molecules that enhances: (1) the expression, modification, regulation or activation of urease; or (2) one or more of the normal functions of urease. An enhancer acts "indirectly on urease" when its most immediate effect is on a molecule other than urease which influences the expression, activation or functioning of urease.

An "engineered mutation" in a urease gene comprises a change in nucleotide sequence of the urease gene that results in the production of (1) increased or reduced amounts of urease protein relative to the amounts produced in the absence of such change; or (2) urease protein having enhanced or impaired normal functions relative to such functions in the absence of such changes.

The term "pharmaceutical composition" means a composition suitable for pharmaceutical use in a subject, including an animal or human. A pharmaceutical composition generally comprises an effective amount of an active agent and a carrier, including, e.g., a pharmaceutically acceptable carrier.

A "pharmaceutically acceptable formulation" comprises a formulation that is suitable for administering the active agent (e.g., urease or urease modulator) in a manner that gives the desired results and does not also produce adverse side effects sufficient to convince a physician that the potential harm to a patient is greater than the potential benefit to that patient. The basic ingredient for an injectable formulation is typically a water vehicle. Aqueous vehicles that are useful include sodium chloride (NaCl) solution, Ringer's solution, NaCl/dextrose solution, and the like. Water-miscible vehicles are also useful to effect full solubility of the active agent. Antimicrobial agents, buffers and antioxidants may be useful, depending on the need. Similarly, a "pharmaceutically acceptable" salt or a "pharmaceutically acceptable" derivative of a compound, as provided herein, is a salt or other derivative which is not biologically or otherwise undesirable.

The term "controlled release" is intended to refer to any drug-containing formulation in which the manner and profile of drug release from the formulation are controlled. The term "controlled release" refers to immediate as well as non-immediate release formulations, with non-immediate release formulations including but not limited to sustained release and delayed release formulations.

The term "sustained release" (also referred to as "extended release") is used in its conventional sense to refer to a drug formulation that provides for gradual release of a drug over an extended period of time, and that preferably, although not necessarily, results in substantially constant blood levels of a drug over an extended time period. The term "delayed release" is used in its conventional sense to refer to a drug formulation in which there is a time delay between administration of the formulation and the release of the drug therefrom. "Delayed release" may or may not involve gradual release of drug over an extended period of time, and thus may or may not be "sustained release."

A "therapeutic treatment" is a treatment administered to a subject who displays symptoms or signs of pathology, disease, or disorder, in which treatment is administered to the subject for the purpose of diminishing or eliminating those signs or symptoms of pathology, disease, or disorder. A "therapeutic activity" is an activity of an agent, such as a nucleic acid, vector, gene, polypeptide, protein, substance, or composition thereof, that eliminates or diminishes signs or symptoms of pathology, disease or disorder, when administered to a subject suffering from such signs or symptoms. A "therapeutically useful" agent or compound (e.g., nucleic acid or polypeptide) indicates that an agent or compound is useful in diminishing, treating, or eliminating such signs or symptoms of a pathology, disease or disorder.

The term "small molecule" includes a compound or molecular complex, either synthetic, naturally derived, or partially synthetic, and which preferably has a molecular weight of less than 5,000 Daltons. More preferably, a small molecule has a molecular weight of between 100 and 1,500 Daltons.

The terms "nucleic acid molecule" or "oligonucleotide" or grammatical equivalents herein, refer to at least two nucleotides covalently linked together, and typically refers to RNA, DNA and cDNA molecules. A nucleic acid of the present invention is preferably single-stranded or double-stranded, and will

generally contain phosphodiester bonds, although in some cases nucleic acid analogs are included that may have alternate backbones comprising, for example, phosphoramide, phosphorothioate, phosphorodithioate, and/or O-methylphosphoroamidite linkages. It will be understood that, as a result of the degeneracy of the genetic code, a multitude of nucleotide sequences encoding given peptides such as urease may be produced.

A "heterologous" nucleic acid construct or sequence has a portion of the sequence which is not native to the cell in which it is expressed. Heterologous, with respect to a control sequence, refers to a control sequence (*i.e.*, promoter or enhancer) that does not function in nature to regulate the same gene the expression of which it is currently regulating. Generally, heterologous nucleic acid sequences are not endogenous to the cell or part of the genome in which they are present, and have been added to the cell, by infection, transfection, microinjection, electroporation, or the like. A heterologous nucleic acid construct may contain a control sequence/DNA coding sequence combination that is the same as, or different from a control sequence/DNA coding sequence combination found in the native cell.

As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid construct designed for transfer between different host cells. An "expression vector" refers to a vector that has the ability to incorporate and express heterologous DNA fragments in a foreign cell. Many prokaryotic and eukaryotic expression vectors are commercially available. Selection of appropriate expression vectors is within the knowledge of those having skill in the art.

As used herein, an "expression cassette" or "expression vector" is a nucleic acid construct generated recombinantly or synthetically, with a series of specified nucleic acid elements that permit transcription of a particular nucleic acid in a target cell or *in vitro*. The recombinant expression cassette can be incorporated into a plasmid, chromosome, mitochondrial DNA, plastid DNA, virus, or nucleic acid fragment. Typically, the recombinant expression cassette portion of an expression vector includes, among other sequences, a nucleic acid sequence to be transcribed and a promoter.

As used herein, the term "plasmid" refers to a circular double-stranded DNA construct used as a cloning vector, and which forms an extrachromosomal self-replicating genetic element in many bacteria and some eukaryotes.

As used herein, the term "selectable marker-encoding nucleotide sequence" refers to a nucleotide sequence which is capable of expression in host cells and where expression of the selectable marker confers to cells containing the expressed gene the ability to grow in the presence of a corresponding selective agent.

As used herein, the terms "promoter" and "transcription initiator" refer to a nucleic acid sequence that functions to direct transcription of a downstream gene. The promoter will generally be appropriate to the host cell in which the target gene is being expressed. The promoter, together with other transcriptional and translational regulatory nucleic acid sequences (also termed "control sequences"), are necessary to express a given gene. In general, the transcriptional and translational regulatory sequences include, but are not limited to, promoter sequences, ribosomal binding sites, transcriptional start and stop sequences, translational start and stop sequences, and enhancer or activator sequences.

"Chimeric gene" or "heterologous nucleic acid construct", as defined herein refers to a non-native gene (*i.e.*, one that has been introduced into a host) that may be composed of parts of different genes, including regulatory elements. A chimeric gene construct for transformation of a host cell is typically composed of a transcriptional regulatory region (promoter) operably linked to a heterologous protein coding sequence, or, in a selectable marker chimeric gene, to a selectable marker gene encoding a protein conferring antibiotic resistance to transformed host cells. A typical chimeric gene of the present invention, for transformation into a host cell, includes a transcriptional regulatory region that is constitutive or inducible, a protein coding sequence, and a terminator sequence. A chimeric gene construct may also include a second DNA sequence encoding a signal peptide if secretion of the target protein is desired.

A nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA encoding a secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a

preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

As used herein, the term "gene" means the segment of DNA involved in producing a polypeptide chain, that may or may not include regions preceding and following the coding region, *e.g.*, 5' untranslated (5' UTR) or "leader" sequences and 3' UTR or "trailer" sequences, as well as intervening sequences (introns) between individual coding segments (exons).

As used herein, "recombinant" includes reference to a cell or vector that has been modified by the introduction of a heterologous nucleic acid sequence or that the cell is derived from a cell so modified. Thus, for example, recombinant cells express genes that are not found in identical form within the native (non-recombinant) form of the cell or express native genes that are otherwise abnormally expressed, under expressed or not expressed at all as a result of deliberate human intervention.

The term "introduced", in the context of inserting a nucleic acid sequence into a cell, means "transfection", "transformation" or "transduction" and includes reference to the incorporation of a nucleic acid sequence into a eukaryotic or prokaryotic cell where the nucleic acid sequence may be incorporated into the genome of the cell (for example, chromosome, plasmid, plastid, or mitochondrial DNA), converted into an autonomous replicon, or transiently expressed (for example, transfected mRNA).

As used herein, the term "expression" refers to the process by which a polypeptide is produced based on the nucleic acid sequence of a gene. The process includes both transcription and translation.

The term "signal sequence" refers to a sequence of amino acids at the N-terminal portion of a protein which facilitates the secretion of the mature form of

the protein outside the cell. The mature form of the extracellular protein lacks the signal sequence which is cleaved off during the secretion process.

By the term "host cell" is meant a cell that contains a vector and supports the replication, or transcription and translation (expression) of the expression construct. Host cells for use in the present invention can be prokaryotic cells, such as *E. coli*, or eukaryotic cells such as yeast, plant, insect, amphibian, or mammalian cells.

As used herein, "effective amount " or "pharmaceutically effective amount" of an active agent refers to an amount sufficient to derive a measurable change in a physiological parameter of the target cell or subject and/or to provide or modulate active agent expression or activity through administration of one or more of the pharmaceutical dosage units. Such effective amount may vary from person to person depending on their condition, height, weight, age, and/or health, the mode of administering the active agent (e.g., urease or urease modulator), the particular active agent administered, and other factors. As a result, it may be useful to empirically determine an effective amount for a particular patient under a particular set of circumstances.

All publications and patents cited herein are expressly incorporated herein by reference for the purpose of describing and disclosing compositions and methodologies which might be used in connection with the invention.

II. Composition of the Invention

The invention includes, in one aspect, a composition containing urease as an active agent for use in inhibiting growth of cancer cells. A chemical entity may be associated with the active agent, as described below, to enhance the delivery of the active agent to cancer cells. It has been discovered that exposing cancer cells in a patient to urease, as described herein, provides an effective treatment for cancer in the patent. The cancer cells may be contained within a tumor, e.g., a solid or semi-solid tumor. Alternatively, the cancer cells may be circulating in the bloodstream of a subject.

Cancers, tumors and/or neoplasms include new growths of cells or tissue in which the multiplication of cells is uncontrolled and progressive. Some such growths are benign, but others are termed "malignant, " leading to death of the

organism. Malignant neoplasms are distinguished from benign growths in that, in addition to exhibiting aggressive cellular proliferation, cancers invade surrounding tissues and metastasize. Moreover, malignant neoplasms are characterized in that they show a greater loss of differentiation, and of their organization relative to one another and their surrounding tissues.

Considered below are the components included in the compositions of the invention.

A. Urease

As noted above, the active agent in the composition is urease. The urease may be of any origin, including, e.g., bacteria, plants, fungi and viruses. A number of studies have provided detailed information about the genetics of ureases from a variety of evolutionarily diverse bacteria, plants, fungi and viruses (Mobley, H.L.T. *et al.* (1995) *Microbiol. Rev.* 59: 451-480; Eur. J. Biochem., 175, 151-165 (1988); Labigne, A. (1990) International publication No. WO 90/04030; Clayton, C. L. et al. (1990) *Nucleic Acid Res.* 18, 362; and U.S. Patent Nos. 6,248,330 and 5,298,399, each of which is incorporated herein by reference). Of particular interest is urease that is found in plants (Sirko, A. and Brodzik, R. (2000) *Acta Biochim Pol* 47(4):1189-95). One exemplary plant urease is jack bean urease, which is described in Examples 2-3. An exemplary amino acid sequence of jack bean urease is represented by SEQ ID NO: 7.

Useful urease sequences may be identified in public databases, e.g., Entrez (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/). Additionally, primers that are useful for amplifying ureases from a wide variety of organisms may be utilized as described by Baker, K. M. and Collier, J. L. (http://www.science.smith.edu/departments/Biology/lkatz/NEMEB_webpage/abstracts.html) or using the CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) as described in Rose, *et al.* (1998) *Nucl. Acids Res.* 26:1628.

The urease may contact the tumor cells, be positioned in the extracellular environment or interstitial fluid surrounding the tumor cells, or be expressed within the cancer cells or cells nearby the cancer cells. While not wishing to be bound by any specific molecular mechanisms underlying the successful inhibition

of growth of cancer cells by urease, the urease compound may raise the pH of interstitial fluid in which the cancer cells are bathed, by addition of urease to the interstitial fluid in the subject. Urease can convert the substrate urea to ammonia and carbamate. This enzymatic activity may increase the pH making the environment more basic (Figs. 1A-1D). The environment around a cancer cell is typically acidic (Webb, S.D., *et al.* (2001) *Novartis Found Symp* 240:169-81. Thus, by raising the pH of the extracellular environment in this manner, growth of the cancer cell is inhibited. Accordingly, addition of the active agent in certain embodiments of the invention causes the pH of the interstitial fluid to be raised by about 0.1 pH unit, e.g., 0.1 – 0.5 pH units or greater.

Thus, active agents of the invention include the naturally occurring forms of urease as well as functionally active variants thereof. Two general types of amino acid sequence variants are contemplated. Amino acid sequence variants are those having one or more substitutions in specific amino acids which do not destroy the urease activity. These variants include silent variants and conservatively modified variants which are substantially homologous and functionally equivalent to the native protein. A variant of a native protein is "substantially homologous" to the native protein when at least about 80%, more preferably at least about 90%, even more preferably at least about 95%, yet even more preferably 98%, and most preferably at least about 99% of its amino acid sequence is identical to the amino acid sequence of the native protein. A variant may differ by as few as 1 or up to 10 or more amino acids.

A second type of variant includes size variants of urease which are isolated active fragments of urease. Size variants may be formed by, e.g., fragmenting urease, by chemical modification, by proteolytic enzyme digestion, or by combinations thereof. Additionally, genetic engineering techniques, as well as methods of synthesizing polypeptides directly from amino acid residues, can be employed to produce size variants.

By "functionally equivalent" is intended that the sequence of the variant defines a chain that produces a protein having substantially the same biological activity as the native urease. Such functionally equivalent variants that comprise substantial sequence variations are also encompassed by the invention. Thus, a functionally equivalent variant of the native urease protein will have a sufficient

biological activity to be therapeutically useful. Methods are available in the art for determining functional equivalence. Biological activity can be measured using assays specifically designed for measuring activity of the native urease protein, as in Example 3. Additionally, antibodies raised against the biologically active native protein can be tested for their ability to bind to the functionally equivalent variant, where effective binding is indicative of a protein having a conformation similar to that of the native protein.

It will be appreciated by those skilled in the art that due to the degeneracy of the genetic code, a multitude of nucleic acids sequences encoding urease polypeptides of the invention may be produced, some of which may bear minimal sequence homology to known urease nucleic acid sequences. Such "silent variations" are one species of "conservatively modified variations", discussed below. The invention provides each and every possible variation of nucleic acid sequence encoding a polypeptide of the invention that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the nucleic acid sequence encoding a urease protein polypeptide of the invention.

Urease polypeptides of the present invention include one or more conservatively modified variations (or simply "conservative variations") of the sequences of known urease polypeptide sequences. Such conservative variations comprise substitutions, additions or deletions that alter, add or delete a single amino acid or a small percentage of amino acids. One of ordinary skill in the art will recognize that an individual substitution, deletion, or addition that substitutes, deletes, or adds a single amino acid or a small percentage of amino acids (typically less than 5%, more typically less than 4%, 2%, 1%, or less) in a sequence typically constitutes conservative variations where such changes result in the deletion of an amino acid, addition of an amino acid, or substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid.

Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known those of ordinary skill in the art. Table 1 sets forth six groups which contain amino acids that are conservative substitutions or conservative variations for one another.

Table 1. Conservative Substitution Groups

1	Alanine (A)	Serine (s)	Threonine (T)	
2	Aspartic Acid (D)	Glutamic Acid (E)		
3	Asparagine (N)	Glutamine (Q)		
4	Arginine (R)	Lysine (K)		
5	Isoleucine (I)	Leucine (L)	Methionine (M)	Valine (V)
6	Phenylalnine (F)	Tyrosine (Y)	Tryptophan (W)	

Additional groups of amino acids can also be formulated. For example, amino acids can be grouped by similar function or chemical structure or composition (e.g., acidic, basic, aliphatic, aromatic, sulfur-containing). For example, an aliphatic grouping may comprise: glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine. Other groups containing amino acids that are conservative substitutions for one another include the following: (i) aromatic: phenylalanine, tyrosine, tryptophan; (ii) sulfur-containing: methionine, cysteine; (iii) basic: arginine, lysine, histidine; and (iv) acidic: aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine. See Creighton (1984) Proteins, W. H. Freeman and Company, for additional groupings of amino acids.

The urease protein sequences of the invention, including conservatively substituted sequences, can be present as part of larger polypeptide sequences such as occur upon the addition of one or more domains for purification of the protein (e.g., poly his segments, FLAG tag segments, etc.), e.g., where the additional functional domains have little or no effect on the activity of the urease protein portion of the protein, or where the additional domains can be removed by post synthesis processing steps, such as by treatment with a protease.

The addition of one or more nucleic acids or sequences that do not alter the encoded activity of a nucleic acid molecule of the invention, such as the addition of a non-functional sequence, is a conservative variation of the basic nucleic acid molecule, and the addition of one or more amino acid residues that do not alter the activity of a polypeptide of the invention is a conservative variation of the basic polypeptide. Both such types of additions are features of the invention. One of ordinary skill in the art will appreciate that many

conservative variations of the nucleic acid constructs which are disclosed yield a functionally identical construct.

A variety of methods of determining sequence relationships can be used, including manual alignment, and computer assisted sequence alignment and analysis. This later approach is a preferred approach in the present invention, due to the increased throughput afforded by computer-assisted methods. A variety of computer programs for performing sequence alignment are available, or can be produced by one of skill.

As noted above, the sequences of the nucleic acids and polypeptides (and fragments thereof) employed in the subject invention need not be identical, but can be substantially identical (or substantially similar), to the corresponding sequence of a urease polypeptide or nucleic acid molecule (or fragment thereof) of the invention or related molecule. For example, the polypeptides can be subject to various changes, such as one or more amino acid or nucleic acid insertions, deletions, and substitutions, either conservative or non-conservative, including where, e.g., such changes might provide for certain advantages in their use, e.g., in their therapeutic or prophylactic use or administration or diagnostic application.

Alignment and comparison of relatively short amino acid sequences (less than about 30 residues) is typically straightforward. Comparison of longer sequences can require more sophisticated methods to achieve optimal alignment of two sequences. Optimal alignment of sequences for aligning a comparison window can be conducted by the local homology algorithm of Smith and Waterman (1981) *Adv Appl Math* 2:482; by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J Mol Biol* 48:443, by the search for similarity method of Pearson and Lipman (1988) *Proc Nat'l Acad Sci* USA 85:2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.; and BLAST, see, e.g., Altschul et al. (1977) *Nuc Acids Res* 25:3389- 3402 and Altschul et al. (1990) *J Mol Biol* 215:403-410), or by inspection, with the best alignment (i.e., resulting in the highest percentage of sequence similarity or sequence identity over the comparison window) generated by the various methods being selected.

An exemplary algorithm that is suitable for determining percent sequence identity (percent identity) and sequence similarity is the FASTA algorithm, which is described in Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988) *Proc Nat'l Acad Sci* USA 85:2444. See also, W. R. Pearson (1996) Methods Enzymology 266:227-258. Preferred parameters used in a FASTA alignment of DNA sequences to calculate percent identity are optimized, BL50 Matrix 15: -5, k-tuple=2; joining penalty=40, optimization=28; gap penalty= -12, gap length penalty=-2; and width=16.

It will be understood by one of ordinary skill in the art, that the above discussion of search and alignment algorithms also applies to identification and evaluation of polynucleotide sequences, with the substitution of query sequences comprising nucleotide sequences, and, where appropriate, selection of nucleic acid databases.

B. Associated Chemical Entity

The composition of the invention may comprise a chemical entity which is associated with the active agent to enhance the delivery of the active agent to the cancer cells. A wide variety of associated chemical entities are contemplated for use as described below.

B1. Polymers

The chemical entity may comprise a polymer including, for example, hydrophilic polymers and hydrophobic polymers, with hydrophilic polymers being preferred. The term "hydrophilic", as used herein, refers to a composition, substance or material, for example, a polymer, which may generally readily associate with water. Thus, although the hydrophilic polymers that may be employed in the present invention may have domains of varying type, for example, domains which are more hydrophilic and domains which are more hydrophobic, the overall nature of the hydrophilic polymers is preferably hydrophilic, it being understood, of course, that this hydrophilicity may vary across a continuum from relatively more hydrophilic to relatively less hydrophilic.

A wide variety of polymers may be employed in the present compositions and formulations. Generally, the polymer is one which has the desired hydrophilicity and/or hydrophobicity, and which may form matrices, as well as

covalent attachments with targeting ligands, as described herein. The polymer may be crosslinked or non-crosslinked. The terms "crosslink", "crosslinked" and "crosslinking", as used herein, generally refer to the linking of two or more compounds or materials, for example, polymers, by one or more bridges. The bridges, which may be composed of one or more elements, groups or compounds, generally serve to join an atom from a first compound or material molecule to an atom of a second compound or material molecule. The crosslink bridges may involve covalent and/or non-covalent associations. Any of a variety of elements, groups and/or compounds may form the bridges in the crosslinks, and the compounds or materials may be crosslinked naturally or through synthetic means.

In accordance with certain embodiments, the polymer, whether linear, star or branched, may be selected from the group consisting of a polyalkylene oxide, polyalkyleneimine, polyalkylene amine, polyalkene sulfide, polyalkylene sulfonate, polyalkylene sulfone, poly(alkylenesulfonylalkyleneimine) and copolymers thereof.

As noted above, depending on the particular polymer employed, the polymers may be relatively more hydrophilic or relatively more hydrophobic. Examples of suitable, relatively more hydrophilic polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol, polypropylene glycol, branched polyethylene imine, polyvinyl pyrrolidone, polylactide, poly(lactide-co-glycolide), polysorbate, polyethylene oxide, poly(ethylene oxide-co-propylene oxide), poly(oxyethylated) glycerol, poly(oxyethylated) sorbitol, poly(oxyethylated glucose), polymethyloxazoline, polyethyloxazoline, polyhydroxyethyloxazoline, polyhydroxypropyloxazoline, polyvinyl alcohol, poly(hydroxyalkylcarboxylic acid), polyhydroxyethyl acrylic acid, polyhydroxypropyl methacrylic acid, polyhydroxyvalerate, polyhydroxybutyrate, polyoxazolidine, polyaspartamide, polysialic acid, and derivatives, mixtures and copolymers thereof.

Accordingly, a polymer, preferably hydrophilic, may be conjugated to the active agent, or other associated chemical entities disclosed herein, to enhance the delivery of the active agent to the cancer cells. The polymer-active agent conjugate is preferably administered in an amount effective to extend the blood circulation time and/or reduce the antigenicity and/or immunogenicity of said

composition relative to native, or non-derivatized, active agent. Particularly preferred hydrophilic polymers include, but are not limited to, polyvinylpyrrolidone, polyvinylmethylether, polyhydroxypropyl methacrylamide, polyhydroxypropyl methacrylate, polyhydroxyethyl acrylate, polymethacrylamide, polydimethylacrylamide, polymethyloxazoline, polyethyloxazoline, polyhydroxyethyloxazoline, polyhydroxypropyoxazoline, polyaspartamide, and/or hydrophilic cellulose derivatives. A preferable hydrophilic polymer is polyethylene glycol having, e.g., a molecular weight between about 1,000 and 10,000 daltons. In one embodiment, the polyethylene glycol has a molecular weight between 1,000 and 5,000 daltons. Additional polymers contemplated for use in the invention are discussed in more detail in U.S. Pre-Grant Published No. 20020041898, published April 11, 2002, which is incorporated by reference herein.

B2. Targeting Moiety

Targeting moieties are contemplated as chemical entities of the present invention, and bind to a defined, selected cell type or target cell population, such as cancer cells. Targeting moieties useful in this regard include antibodies and antibody fragments, peptides, and hormones. Proteins corresponding to known cell surface receptors (including low density lipoproteins, transferrin and insulin), fibrinolytic enzymes, anti-HER2, platelet binding proteins such as annexins, and biological response modifiers (including interleukin, interferon, erythropoietin and colony-stimulating factor) are also contemplated targeting moieties. Oligonucleotides, e.g., antisense oligonucleotides that are complementary to a portion of a target cell nucleic acid, may be used as targeting moieties in the present invention. Targeting moieties may also be oligonucleotides that bind to a target cell surface. Analogs of the above-listed targeting moieties that retain the ability to bind to a defined target cell population may also be used as targeting moieties.

Functional equivalents of the aforementioned targeting moieties are also useful as targeting moieties of the present invention. An exemplary targeting moiety functional equivalent is an organic chemical construct designed to mimic the proper configuration and/or orientation for targeting moiety target cell binding.

Another targeting moiety functional equivalent is a short polypeptide that exhibits the binding affinity of the targeting moiety.

Preferred targeting moieties of the present invention are antibodies, peptides, oligonucleotides or the like, that are reactive with an antigen on the surface of a target cell. Both polyclonal and monoclonal antibodies which are either available commercially or described in the literature may be employed. The antibodies may be whole antibodies or fragments thereof. Monoclonal antibodies and fragments may be produced in accordance with conventional techniques, such as hybridoma synthesis, recombinant DNA techniques and protein synthesis. Useful monoclonal antibodies and fragments may be derived from any species (including humans) or may be formed as chimeric proteins which employ sequences from more than one species.

In one embodiment of the invention, human monoclonal antibodies or humanized murine antibodies are used as targeting moieties. Humanized targeting moieties are capable of decreasing the immunoreactivity of the antibody or polypeptide in the host recipient, permitting an increase in the half-life and a reduction in adverse immune reactions. Murine monoclonal antibodies may be humanized by, e.g., genetically recombining the nucleotide sequence encoding the murine Fv region or the complementarity determining regions thereof with the nucleotide sequence encoding a human constant domain region and an Fc region. Murine residues may also be retained within the human variable region framework domains to ensure proper target site binding characteristics. A non-limiting example of a targeting moiety is the anti-α-2-GP antibody to brain glial cells (alpha-2-glycoprotein) which is described by Slepnev *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 3: 273-274 (1992). Genetically engineered antibodies for delivery of various active agents to cancer cells is reviewed in Bodey, B. (2001) *Expert Opin Biol. Ther.* 1(4):603-17.

In another embodiment of the invention, the targeting moiety is a ligand which is reactive with a receptor on the surface of the target cell. Thus, the targeting moiety may include without limitation hormones with affinity for a cellular binding component, any molecule containing a carbohydrate moiety recognized by a cellular binding component and drugs or small molecules that bind to a cellular binding component. The phrase "binding component" includes both

receptor and acceptor molecules. Preferably, the binding component is a cell-surface binding component. In one embodiment, the targeting moiety is a naturally occurring protein, such as insulin, that binds to a target site. Cytokines, including interleukins and factors such as granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor (TNF) are also specific targeting moieties, known to bind to specific cells expressing high levels of their receptors (Terlikowski, SJ (2002) *Toxicology* 174(3):143-152).

In order to decrease urease or other active agent exposure to non-target cells or tissues, targeting moieties may be screened to identify those that display minimal non-target reactivity, while retaining target specificity and reactivity. By reducing non-target exposure (and adverse non-target localization and/or toxicity), increased doses of urease or other active agent may be administered. This allows the administration of the highest possible concentration of urease or other therapeutic agent in order to maximize exposure of target cells, while remaining below the threshold of unacceptable non-target cell toxicity.

In certain embodiments of the invention, two or more active agent-targeting moiety conjugates are employed, wherein each conjugate includes a different targeting moiety, e.g., a different antibody species. Each of the utilized targeting moieties binds to a different target site region that may be associated with the same or a different target site. The active agent component of each administered conjugate may be the same or different. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,867,962 and 5,976,535, each of which are incorporated by reference herein. In the practice of this embodiment of the invention, the target site accretion of active agent conjugate to the target site is improved, because each targeting moiety, e.g., antibody species, recognizes a different target site region, e.g., target site epitope. This alternative target site region approach provides more potential target site binding points for the active agent. Consequently, actual or effective target site saturation, e.g., via epitope saturation and/or steric hindrance, may be avoided. Thus, additive accumulation of active agent, e.g., urease, may be accomplished. Alternatively, or in combination, additional urease specific gene products may be employed as active agents, e.g., for the production of a catalytically active holoenzyme at the target site. An exemplary urease apoenzyme includes the gamma, beta and alpha subunits encoded by the

bacterial *ureABC* genes (Burne, R.A. and Chen, Y.M. (2000) *Microbes and Infection* 2:533-542).

The patterns of cross-reactivity for monoclonal antibodies directed against a particular target site may be analyzed to identify a set of two or more target-specific monoclonal antibodies with non-overlapping cross-reactivity for use in a diagnostic or therapeutic application. The phrase "non-overlapping patterns of cross-reactivity" indicates that the non-target tissues bound by one antibody species differs substantially from the non-target tissues bound by another antibody species. The patterns of cross-reactivity differ to the extent necessary to proportionately reduce the exposure of active agent for therapeutic applications. Less antibody pair (or larger set of antibodies) overlap is preferred.

Antibodies may be screened by a variety of methods. Immunohistochemical analysis may be employed to determine reactivity with target tissue and cross-reactivity with non-target tissue. Tissues to which the antibody species bind may be identified by exposing the tissue to the antibody; washing the tissue to remove any unbound antibody; and detecting the presence of bound antibody. *In vitro* histochemical procedures are known in the art. See, e.g., Sanchez-Islas, E. and Leon-Olea, M. (2001) *Nitric Oxide* 5(4):302-16.

The composition of the present invention may also be of use in the treatment of hCG-secreting tumors. Because the placental trophoblast is the normal site of synthesis of hCG, it is understandable that both gestational and nongestational trophoblastic tumors synthesize and secrete hCG. Indeed, hCG measurements have been quite useful for the diagnosis of these tumors, staging the tumors , and for monitoring the effects of therapy. In addition, some nontrophoblastic tumors may produce hCG ectopically. hCG may act as a growth factor for some tumors (Melmed S. and Braunstein GD: Human chorionic gonadotropin stimulates proliferation of Nb 2 rat lymphoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 56:1068-1070, (1983)). See, e.g., U.S. Patent No. 6,448,022, which is incorporated by reference herein.

Therefore, according to one embodiment of the invention, the use of an anti-hCG antibody to target the active agent to a hCG-secreting tumor suppresses the growth of the hCG-secreting tumor. Thus, in certain embodiments, the chemical entity of the invention is a targeting moiety attached

to an active agent and is an anti-tumor antigen antibody, an anti-hCG antibody or a ligand capable of binding specifically to cancer-cell surface receptors. The targeting moiety is, preferably, a polypeptide linked to the urease enzyme to form a fusion protein.

As noted above, in accordance with one embodiment of the invention, the active agent is directly conjugated to the targeting moiety. Alternatively, according to another embodiment of the invention, a two- or three-step approach is used to deliver the active agent to the cancer cells. Thus, the active agent may include a first binding partner which is able to interact with a second binding partner, and the chemical entity may include a targeting moiety which includes the second binding partner. These embodiments are described in more detail in Section III, below.

One of skill will appreciate that the targeting moieties of this invention and the active agents may be joined together in any order. Thus, where the targeting moiety is a polypeptide, the active agent may be joined to either the amino or carboxy termini of the targeting molecule. The targeting moiety may also be joined to an internal region of the active agent, or conversely, the active agent may be joined to an internal location of the targeting moiety, as long as the attachment does not interfere with the respective activities of the molecules.

The targeting moiety and the active agent may be attached by any of a number of means well known to those of skill in the art. Typically, the active agent is conjugated, either directly or through a linker (spacer), to the targeting moiety. However, where both the targeting moiety and the active agent are polypeptides, it may be preferable to recombinantly express the chimeric molecule as a single-chain fusion protein.

In one embodiment, the targeting moiety (e.g., αhEGFR IgG Ab) is chemically conjugated to the active agent or chemical entity (e.g., a drug, urease or liposome). Means of chemically conjugating molecules are well known to those of skill.

The procedure for attaching an agent to an antibody or other polypeptide targeting molecule will vary according to the chemical structure of the agent. Polypeptides typically contain a variety of functional groups; e.g., carboxylic acid (COOH) or free amine (--NH2) groups, which are available for reaction with a

suitable functional group on an active agent to bind the targeting moiety thereto.

Alternatively, the targeting moiety and/or active agent may be derivatized to expose or attach additional reactive functional groups. The derivatization may involve attachment of any of a number of linker molecules such as those available from Pierce Chemical Company, Rockford Ill.

A "linker", as used herein, is a molecule that is used to join the targeting moiety to the active agent. The linker is capable of forming covalent bonds to both the targeting moiety and to the active agent. Suitable linkers are well known to those of skill in the art and include, but are not limited to, straight or branched-chain carbon linkers, heterocyclic carbon linkers, or peptide linkers. Where the targeting moiety and the active agent molecule are polypeptides, the linkers may be joined to the constituent amino acids through their side groups (e.g., through a disulfide linkage to cysteine). However, in a preferred embodiment, the linkers will be joined to the alpha carbon amino and carboxyl groups of the terminal amino acids.

A bifunctional linker having one functional group reactive with a group on a particular agent, and another group reactive with an antibody, may be used to form the desired immunoconjugate. Alternatively, derivatization may involve chemical treatment of the targeting moiety, e.g., glycol cleavage of the sugar moiety of a the glycoprotein antibody with periodate to generate free aldehyde groups. The free aldehyde groups on the antibody may be reacted with free amine or hydrazine groups on an agent to bind the agent thereto. (see U.S. Pat. No. 4,671,958). Procedures for generation of free sulfhydryl groups on polypeptide, such as antibodies or antibody fragments, are also known (see U.S. Pat. No. 4, 659,839).

Many procedure and linker molecules for attachment of various compounds including radionuclide metal chelates, toxins and drugs to proteins, such as antibodies, are known (see, e.g., European Patent Application No. 188, 256; U.S. Pat. Nos. 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784; 4,680,338; 4,569,789; and 4,589,071; and Borlinghaus et al. (1987) *Cancer Res.* 47: 4071-4075). In particular, production of various immunotoxins is well-known within the art and can be found, for example, in "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe et al., *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine,*

Academic Press, pp. 168-190 (1982), Waldmann (1991) *Science*, 252: 1657, U.S. Pat. Nos. 4,545,985 and 4,894,443.

In some circumstances, it is desirable to free the active agent molecule from the targeting moiety when the chimeric molecule has reached its target site. Therefore, chimeric conjugates comprising linkages which are cleavable in the vicinity of the target site may be used when the effector is to be released at the target site. Cleaving of the linkage to release the agent from the targeting moiety may be prompted by enzymatic activity or conditions to which the conjugate is subjected either inside the target cell or in the vicinity of the target site. It should be appreciated that when the target site is a tumor, a linker which is cleavable under conditions present at the tumor site (e.g. when exposed to tumor-associated enzymes or acidic pH) may be used.

A number of different cleavable linkers are known to those of skill in the art (see U.S. Pat. Nos. 4,618,492; 4,542,225, and 4,625,014.) The mechanisms for release of an active agent from these linker groups include, for example, irradiation of a photolabile bond and acid-catalyzed hydrolysis. U.S. Pat. No. 4,671,958, for example, includes a description of immunoconjugates comprising linkers which are cleaved at the target site *in vivo* by the proteolytic enzymes of the patient's complement system. In view of the large number of methods that have been reported for attaching a variety of radiodiagnostic compounds, radiotherapeutic compounds, drugs, toxins, and other agents to targeting moieties, one skilled in the art will be able to determine a suitable method for attaching a given agent to a selected targeting moiety.

Where the targeting moiety and/or the active agent is relatively short, they may be synthesized using standard chemical peptide synthesis techniques. Where both molecules are relatively short, the chimeric molecule may be synthesized as a single contiguous polypeptide. Alternatively, the targeting moiety and the active agent may be synthesized separately and then fused by condensation of the amino terminus of one molecule with the carboxyl terminus of the other molecule, thereby forming a peptide bond. Alternatively, the targeting moiety and active agent molecules may each be condensed with one end of a peptide spacer molecule, thereby forming a contiguous fusion protein.

Solid phase synthesis in which the C-terminal amino acid of the sequence is

attached to an insoluble support followed by sequential addition of the remaining amino acids in the sequence is contemplated for one embodiment for the method for the chemical synthesis of the polypeptides of this invention. Techniques for solid phase synthesis are described by Barany and Merrifield, *Solid -Phase Peptide Synthesis;* pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963), and Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed.* Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

In a preferred embodiment, the chimeric fusion proteins of the present invention are synthesized using recombinant DNA methodology. Generally, this involves creating a DNA sequence that encodes the fusion protein, placing the DNA in an expression cassette under the control of a particular promoter, expressing the protein in a host, isolating the expressed protein and, if required, renaturing the protein.

DNA encoding the fusion proteins of this invention may be prepared by any suitable method, including, for example, cloning and restriction of appropriate sequences or direct chemical synthesis by methods such as the phosphotriester method of Narang et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; the phosphodiester method of Brown et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; the diethylphosphoramidite method of Beaucage et al. (1981) *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862; and the solid support method of U.S. Pat. No. 4,458,066.

Chemical synthesis produces a single stranded oligonucleotide. This may be converted into double stranded DNA by hybridization with a complementary sequence, or by polymerization with a DNA polymerase using the single strand as a template. One of skill would recognize that while chemical synthesis of DNA is limited to sequences of about 100 bases, longer sequences can be obtained by the ligation of shorter sequences.

Alternatively, subsequences can be cloned and the appropriate subsequences cleaved using appropriate restriction enzymes. The fragments can then be ligated to produce the desired DNA sequence.

While the two molecules are preferably essentially directly joined together, one of skill will appreciate that the molecules may be separated by a peptide spacer consisting of one or more amino acids. Generally the spacer will have no

specific biological activity other than to join the proteins or to preserve some minimum distance or other spatial relationship between them. However, the constituent amino acids of the spacer may be selected to influence some property of the molecule, such as the folding, net charge, or hydrophobicity.

The nucleic acid sequences encoding the fusion proteins may be expressed in a variety of host cells, including *E. coli,* other bacterial hosts, yeast, and various higher eukaryotic cells such as the COS, CHO and HeLa cells lines and myeloma cell lines. The recombinant protein gene will be operably linked to appropriate expression control sequences for each host. For *E. coli* this includes a promoter such as the T7, trp, or lambda promoters, a ribosome binding site and preferably a transcription termination signal. For eukaryotic cells, the control sequences will include a promoter and preferably an enhancer derived from immunoglobulin genes, SV40, cytomegalovirus, etc., and a polyadenylation sequence, and may include splice donor and acceptor sequences.

The plasmids of the invention can be transferred into the chosen host cell by well-known methods such as calcium chloride transformation for *E. coli* and calcium phosphate treatment or electroporation for mammalian cells. Cells transformed by the plasmids can be selected by resistance to antibiotics conferred by genes contained on the plasmids, such as the amp, gpt, neo and hyg genes.

Once expressed, the recombinant fusion proteins can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like (see, R. Scopes (1982) *Protein Purification,* Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) *Methods in Enzymology Vol.* 182: *Guide to Protein Purification.*, Academic Press, Inc. N.Y.). Substantially pure compositions of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity are most preferred for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the polypeptides may then be used therapeutically.

One of skill in the art would recognize that after chemical synthesis, biological expression, or purification, the targeted fusion protein may possess a conformation substantially different than the native conformations of the constituent polypeptides. In this case, it may be necessary to denature and

reduce the polypeptide and then to cause the polypeptide to re-fold into the preferred conformation. Methods of reducing and denaturing proteins and inducing re-folding are well known to those of skill in the art (see, Debinski et al. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4: 581-585; and Buchner, et al. (1992) *Anal. Biochem.*, 205: 263-270).

One of skill would recognize that modifications can be made to the targeted fusion proteins without diminishing their biological activity. Some modifications may be made to facilitate the cloning, expression, or incorporation of the targeting molecule into a fusion protein. Such modifications are well known to those of skill in the art and include, for example, a methionine added at the amino terminus to provide an initiation site, or additional amino acids placed on either terminus to create conveniently located restriction sites or termination codons.

B3. Entrapped Active Agents

In certain embodiments, the invention contemplates the use of vesicles such as liposomes and/or nanocapsules as chemical entities for the delivery of an active agent or active agents, e.g., urease to cancer cells. Such formulations may be preferred for the introduction of pharmaceutically-acceptable formulations of the polypeptides, pharmaceuticals, and/or antibodies disclosed herein. The formation and use of liposomes is generally known to those of skill in the art. (See, e.g., Backer, M.V., *et al.* (2002) *Bioconjug Chem* 13(3):462-7). In a preferred embodiment, the disclosed composition may be entrapped in a liposome.

Nanocapsules can generally entrap compounds in a stable and reproducible way (Whelan, J. (2001) *Drug Discov Today* 6(23):1183-84). To avoid side effects due to intracellular polymeric overloading, such ultrafine particles (sized around 0.1 μm) may be designed using polymers able to be degraded *in vivo*. Biodegradable polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles that meet these requirements are contemplated for use in the present invention, and such particles may be easily made, as described in, e.g., Lambert, G., *et al.* (2001) *Int J Pharm* 214(1-2):13-6. Methods of preparing polyalkyl-cyano-acrylate nanoparticles containing biologically active substances and their use are

described in U.S. Pat. Nos. 4,329,332, 4,489,055 and 4,913,908. Nanocapsules are available commercially from sources such as Capsulution, Inc. (www.capsulution.com).

Pharmaceutical compositions containing nanocapsules for the delivery of active agents are described in U.S. Pat. Nos. 5,500,224, 5,620,708 and 6,514,481. U.S. Pat. No. 5,500,224 describes a pharmaceutical composition in the form of a colloidal suspension of nanocapsules comprising an oily phase consisting essentially of an oil containing dissolved therein a surfactant, and suspended therein a plurality of nanocapsules having a diameter of less than 500 nanometers. U.S. Pat. No. 5,620,708 describes compositions and methods for the administration of drugs and other active agents. The compositions comprise an active agent carrier particle attached to a binding moiety which binds specifically to a target molecule present on the surface of a mammalian enterocyte. The binding moiety binds to the target molecule with a binding affinity or avidity sufficient to initiate endocytosis or phagocytosis of the particulate active agent carrier so that the carrier will be absorbed by the enterocyte. The active agent will then be released from the carrier to the host's systemic circulation. In this way, degradation of degradation-sensitive drugs, such as polypeptides, in the intestines can be avoided while absorption of proteins and polypeptides from the intestinal tract is increased. Alternatively, the invention contemplates release of the active agent in the environment surrounding the target cell. For example, in one embodiment, urease is released from the nanocapsule following target moiety binding to the target cell, such that urease is released into the microenvironment surrounding the target cell, e.g., a tumor cell. U.S. Pat. Nos. 6,379,683 and 6,303,150 describe methods of making nanocapsules and the use thereof, and are incorporated herein by reference.

Thus, in one embodiment of the invention, the contacting includes adding to the cells a conjugate comprising a targeting moiety and a first coil-forming peptide characterized by a selected charge and an ability to interact with a second, oppositely charged coil-forming peptide to form a stable α-helical coiled-coil heterodimer. Subsequently, a liposome is added to the cells. The liposome comprises an exterior surface and an internal compartment; an active agent, e.g., urease, located within the internal compartment of the liposome; and a plurality of

second peptides, wherein each second peptide is connected to the exterior surface of the liposome.

In another embodiment, described in detail below, the contacting includes adding liposomes to the cells, wherein the liposomes have the active agent, e.g., urease, in entrapped form, and outer surfaces of the liposome includes a cell targeting moiety effective to bind specifically to a target surface, and a hydrophilic polymer coating effective to shield the targeting moiety from interaction with the target surface. The hydrophilic polymer coating may be made up of polymer chains which are covalently linked to surface lipid components in the liposomes through releasable linkages. In this embodiment, a releasing agent is added to the tumor cells in an amount effective to cause release of a substantial portion of the linkages in the added liposomes, thereby exposing the targeting moiety to the target surface. The releasable linkages may be reducible chemical linkages such as disulfide, ester and peptide linkages. Preferably, the affinity moiety is effective to bind specifically to a cancer-specific antigen.

According to this embodiment of the invention, a method of liposome-based therapy for a mammalian subject is contemplated. The method includes systemically administering to the subject, e.g., intravenously administering, liposomes having a surface-bound targeting moiety and a hydrophilic polymer coating. The hydrophilic polymer coating, comprised of releasably attached polymer chains, is effective to shield the targeting moiety from interaction with its target. Preferred hydrophilic polymers are discussed above. The administered liposomes are allowed to circulate systemically until a desired biodistribution of the liposomes is achieved. A releasing agent, as described below, is administered to the subject in an amount effective to cause cleaving of a substantial portion, e.g., greater than about 50%, preferably greater than about 70%, and more preferably greater than about 90% of the releasable linkages in the administered liposomes. The targeting moiety is exposed upon release of the hydrophilic polymer chain for interaction with its target.

In a preferred embodiment, the liposomes are used for treatment of a solid tumor. The liposomes include urease, and optionally, an additional active agent, e.g., an anti-tumor drug, in entrapped form and are targeted to the tumor region by a targeting moiety effective to bind specifically to a tumor-specific antigen. In

an exemplary method, liposomes are targeted to the vascular endothelial cells of tumors by including a VEGF ligand in the liposomes, for selective attachment to Flk-1,2 receptors expressed on the proliferating tumor endothelial cells (Niederman, T.M., *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99(10):7009-14).

Preferably, the liposomes have a size between about 30-400nm. Liposomes in this size range have been shown to be able to enter tumors through "gaps" present in the endothelial cell lining of tumor vasculature (Maruyama, K, *et al.* (1999) *Adv Drug Deliv Rev* 40(1-2):89-102).

Following administration of the liposomes, e.g., intravenous administration, and after sufficient time has elapsed to allow the liposomes to distribute through the subject and bind to the tumor, a releasing agent is administered to the subject to release the hydrophilic surface coating from the liposomes. Release of the surface coating is effective to expose the targeting moiety to allow binding of the liposomes to the target cells. In one embodiment, the hydrophilic surface coating is attached to the liposomes by pH sensitive linkages. The linkages are released after the liposomes bind to the tumor.

The liposomes in any of the embodiments described above may, optionally, include one or more entrapped anti-tumor drugs or imaging agents or both. The liposomes may be added and allowed to distribute, after which a releasing agent can be administered to release the hydrophilic surface coating to expose the attached targeting moiety and initiate binding. Thus, the entrapped anti-tumor drug or imaging agent or both are specifically and locally administered to the target. Exemplary anti-cancer drugs are described in Section III.A. below. Exemplary imaging agents for use in the method of the invention are described in Section III.B. below. Liposomes may be prepared and administered as described in U.S. Patent No. 6,043,094, which is incorporated herein by reference.

Additional delivery agents such as small unilamellar vesicles (SUV's), as described in U.S. Patent No. 6,180,114, which is incorporated herein by reference in its entirety, may be employed in the present invention.

B4. Active Agent Modulators

Active agent modulators are also contemplated as associated chemical entities by the instant invention. A preferred active agent modulator is a urease

modulator. A "urease modulator" is either an inhibitor of urease or an enhancer of urease. The modulator in the compositions (e.g., pharmaceutical compositions) accordingly may be selected from among all or portions of urease polynucleotide sequences, urease antisense molecules, urease polypeptides, protein, peptide, or organic modulators of urease bioactivity, such as inhibitors, antagonists (including antibodies) or agonists. Preferably, the modulator is active in treating a medical condition that is mediated by, or ameliorated by, urease expression or urease activity.

An "inhibitor of urease" comprises a molecule or group of molecules that interferes with: (1) the expression, modification, regulation, activation or degradation of urease: or (2) one or more of the normal functions of urease, including the hydrolysis of urea leading to the production of carbamate and ammonia. An inhibitor "acts directly on urease" when the inhibitor binds to urease via electrostatic or chemical interactions. Such interactions may or may not be mediated by other molecules. An inhibitor acts "indirectly on urease" when its most immediate effect is on a molecule other than urease which influences the expression, activation or functioning of urease.

Urease inhibitors serve to slow the conversion of urea to ammonium ions. Urease inhibitors include but are not limited to hydroxamic acid derivatives (e.g., acetohydroxamic acid), phosphoramide derivatives (e.g., flurofamide), phosphates, thiols (e.g., 2-mercaptoethanol etc.), boric acid, halogen compounds (e.g., fluorides etc.), and cassia bark extract. Additional urease inhibitors are known to those of skill in the art and are described in U.S. Pat. No. 4,824,783 (Apr. 25, 1989) which is incorporated herein by reference.

An "enhancer of urease" comprises a molecule or group of molecules that enhances: (1) the expression, modification, regulation or activation of urease; or (2) one or more of the normal functions of urease. An enhancer "acts directly on urease" when the enhancer binds to urease via electrostatic or chemical interactions. Such interactions may or may not be mediated by other molecules. An enhancer acts "indirectly on urease" when its most immediate effect is on a molecule other than urease which influences the expression, activation or functioning of urease.

C. Additional Active Agents

Additional active agents may also be included in the composition of the invention. The additional active agents, e.g., an anti-tumor agent (an agent active against proliferating cells), may be utilized in the composition prior to, concurrently with, or subsequent to the cells being contacted with a first active agent. For example, after urease has been targeted to the tumor cells, it may have the ability to modulate or regulate the tumor external environment, e.g., through pH changes. Active agents, e.g., anti-tumor agents that favor a basic environment will then be more efficacious.

In certain embodiments, substrates that are capable of being enzymatically processed by urease are contemplated for use as active agents. Preferably, the active agent is a substrate that urease may utlilize to form ammonium ions, e.g., urea.

Exemplary anti-tumor agents include cytokines and other moieties, such as interleukins (e.g., IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 and the like), transforming growth factor-beta, lymphotoxin, tumor necrosis factor, interferons (e.g., gamma-interferon), colony stimulating factors (e.g., GM-CSF, M-CSF and the like), vascular permeability factor, lectin inflammatory response promoters (selectins), such as L-selectin, E-selectin, P-selectin, and proteinaceous moieties, such as C1q and NK receptor protein. Additional suitable anti-tumor agents include compounds that inhibit angiogenesis and therefore inhibit metastasis. Examples of such agents include protamine medroxyprogesteron, pentosan polysulphate, suramin, taxol, thalidomide, angiostatin, interferon-alpha, metalloproteinase inhibitors, platelet factor 4, somatostatin, thromobospondin. Other representative and non-limiting examples of active agents useful in accordance with the invention include vincristine, vinblastine, vindesine, busulfan, chlorambucil, spiroplatin, cisplatin, carboplatin, methotrexate, adriamycin, mitomycin, bleomycin, cytosine arabinoside, arabinosyl adenine, mercaptopurine, mitotane, procarbazine, dactinomycin (antinomycin D), daunorubicin, doxorubicin hydrochloride, taxol, plicamycin, aminoglutethimide, estramustine, flutamide, leuprolide, megestrol acetate, tamoxifen, testolactone, trilostane, amsacrine (m-AMSA), asparaginase (L-asparaginase), etoposide, blood products such as hematoporphyrins or derivatives of the foregoing. Other examples of active

agents include genetic material such as nucleic acids, RNA, and DNA of natural or synthetic origin, including recombinant RNA and DNA. DNA encoding certain proteins may be used in the treatment of many different types of diseases. For example, tumor necrosis factor or interleukin-2 genes may be provided to treat advanced cancers; thymidine kinase genes may be provided to treat ovarian cancer or brain tumors; and interleukin-2 genes may be provided to treat neuroblastoma, malignant melanoma or kidney cancer. Additional active agents contemplated for use in the present invention are described in U.S. Patent No. 6,261,537, which is incorporated by reference in its entirety herein. Anti-tumor agents and screens for detecting such agents are reviewed in Monga, M. and Sausville, E.A. (2002) *Leukemia* 16(4):520-6.

In certain embodiments, the active agent is a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.. Exemplary weakly basic anti-tumor compounds include doxorubicin, daunorubicin, mitoxanthrone, epirubicin, mitomycin, bleomycin, vinca alkaloids, such as vinblastine and vincristine, alkylating agents, such as cyclophosphamide and mechlorethamine hydrochloride, and antrineoplastic purine and pyrimidine derivatives.

In one embodiment of the invention, the composition includes urease, and lacks substantially any cytokines, e.g. tumor necrosis factor and/or interferons. In this embodiment, urease alone, or with active agents other than cytokines, preferably in combination with small molecule anti-tumor agents, is effective to inhibit cancer cell growth. Thus, in this embodiment, the composition may or may not act in concert with endogenous or native cytokines present in the subject being treated, but the composition being administered does not contain additional, exogenous cytokines.

D. Imaging Agents

Likewise, imaging agents may be included in the composition or in additional compositions. Suitable imaging agents include commercially available agents used in positron emission tomography (PET), computer assisted tomography (CAT), single photon emission computerized tomography, x-ray, fluoroscopy , and magnetic resonance imaging (MRI).

Imaging agents include metals, radioactive isotopes and radioopaque agents (e.g., gallium, technetium, indium, strontium, iodine, barium, bromine and phosphorus-containing compounds), radiolucent agents, contrast agents, dyes (e.g., fluorescent dyes and chromophores) and enzymes that catalyze a colorimetric or fluorometric reaction. In general, such agents may be attached or entrapped using a variety of techniques as described above, and may be present in any orientation. See, e.g., U.S. Patent Nos. 6,159,443 and 6,391,280, both of which are expressly incorporated by reference herein.

Contrast agents according to the present invention are useful in the imaging modalities, such as X-ray contrast agents, light imaging probes, spin labels or radioactive units.

Examples of suitable materials for use as contrast agents in MRI include the gadolinium chelates currently available, such as diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) and gadopentotate dimeglumine, as well as iron, magnesium, manganese, copper, and chromium.

Examples of materials useful for CAT and x-rays include iodine based materials, such as ionic monomers typified by diatrizoate and iothalamate, non-ionic monomers such as iopamidol, isohexol, and ioversol, non-ionic dimers, such as iotrol and iodixanol, and ionic dimers, for example, ioxagalte.

Air and other gases can be incorporated for use in ultrasound imaging. These agents can be detected using standard techniques available in the art and commercially available equipment.

According to one embodiment of the invention, the cancer cells are contacted with an imaging agent before or after, or both before and after being contacted with the active agent. For example, after urease has been targeted to the tumor cells, it may have the ability to modulate or regulate the tumor external environment, e.g., through pH changes. Imaging agents that favor a basic environment will then be more efficacious.

Both luminescent cyclen-based lanthanide chelates and those primarily yielding magnetic resonance signatures have been shown to be sensitive to changes in pH. Luminescent probes used for sensing pH changes typically detect changes in the fluorescence lifetime of the lanthanide ion as a function of pH. Analogously, magnetic resonance contrast agents which modulate the water

proton relaxivity via changes in pH are useful in the instant invention. In both cases, by changing the pH in a given system, one can envision agents with enhanced contrast.

Accordingly, a pH sensitive contrast agent is utilized at or near the cancer cell. The cancer cell or cells are also exposed to a urease composition containing urease enzyme to cause a change in pH at or near the cancer cell. In this way, a change in pH causes the nuclear magnetic resonance relaxation properties of water protons or other nuclei in the aqueous medium to be changed in a manner that is reflective of pH. Examples of pH sensitive contrast agents that may be utilized include those agents that contain a lanthanide metal, such as Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Db, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, and the like, or another paramagnetic element, such as Fe, Mn, 17O, or the like. Specific contrast agents that may be utilized include H (2)(17)O, GdDOTA-4AmP(5-) which is described in *Magn Reson Med.* 2003 Feb;49(2):249-57, and Fe(III)meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine (Fe-TPPS4) as described in Helpern *et al.* (1987) *Magnetic Resonance in Medicine* 5:302-305 and U.S. Patent No. 6,307,372, which is incorporated herein by reference. In addition, Gd based with polyion, as described in Mikawa et al. *Acad. Radiol* (2002) 9(suppl 1):S109-S1111, may be used in the invention.

As another alternative, a shift reagent may be provided in the aqueous medium surrounding the cancer cell. The shift reagent is configured such that a change in pH affects the chemical shift properties of the water protons or other nuclei in a manner that is reflective of pH. The change in chemical shift properties may then be measured using nuclear magnetic resonance to determine whether the active agent is biologically active. Examplary shift reagents that may be used include those containing a lanthanide metal, such as Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Db, Dy, Ho, Er, Tm, or Yb, or another paramagnetic element. Examples of specific shift reagents that may be utilized include Tm(DOTP) (5-), the thulium (III) complex of 1,4,7,10-tetraazacylododecane-N, N',N",N"'-tetra(methylenephospate). Dy(PPP) (2)(7)-dysprosium tripolyphosphate, and the like.

In one embodiment of the invention, a dual-contrast-agent strategy using two gadolinium agents, such as the pH-insensitive GdDOTP(5-) and the pH-

sensitive GdDOTA-4AmP(5-), may be utilized to generate pH maps by MRI, as described in *Magn Reson Med* (2003) Feb;49(2):249-57.

Preferred agents for use with PET scan include 13N and fluorodeoxyglucose (FDG).

E. Composition Formulation

As noted above, the compositions of the invention comprise an active agent and, optionally, an associated chemical entity. For example, a urease polypeptide or urease polynucleotide, and/or comprise a chemical or biological compound that is active as a modulator of urease expression or urease activity. In addition, a biocompatible pharmaceutical carrier, adjuvant, or vehicle may also be included.

The composition may also include other nucleotide sequences, polypeptides, drugs, or hormones mixed with excipient(s) or other pharmaceutically acceptable carriers. Compositions other than pharmaceutical compositions optionally comprise liquid, i.e., water or a water-based liquid.

Pharmaceutically acceptable excipients to be added to pharmaceutical compositions also are well-known to those who are skilled in the art, and are readily available. The choice of excipient will be determined in part by the particular method used to administer the product according to the invention. Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations for use in the context of the present invention.

Techniques for formulation and administration of pharmaceutical compositions may be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed., 19th Ed., Williams & Wilkins, 1995, and are well known to those skilled in the art. The choice of excipient will be determined in part by the particular method used to administer the product according to the invention. Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations for use in the context of the present invention. The following methods and excipients are merely exemplary and are in no way limiting.

The pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured using any conventional method, e.g., mixing, dissolving, granulating, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, melt-spinning,

spray-drying, or lyophilizing processes. However, the optimal pharmaceutical formulation will be determined by one of skill in the art depending on the route of administration and the desired dosage. Such formulations may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the administered agent. Depending on the condition being treated, these pharmaceutical compositions may be formulated and administered as described in Section III below.

The pharmaceutical compositions are formulated to contain suitable pharmaceutically acceptable carriers, and may optionally comprise excipients and auxiliaries that facilitate processing of the active compounds into preparations that can be used pharmaceutically. The administration modality will generally determine the nature of the carrier. For example, formulations for parenteral administration may comprise aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Carriers suitable for parenteral administration can be selected from among saline, buffered saline, dextrose, water, and other physiologically compatible solutions. Preferred carriers for parenteral administration are physiologically compatible buffers such as Hank's-solution, Ringer's solutions, or physiologically buffered saline. For tissue or cellular administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art. For preparations comprising proteins, the formulation may include stabilizing materials, such as polyols (e.g., sucrose) and/or surfactants (e.g., nonionic surfactants), and the like.

Alternatively, formulations for parenteral use may comprise suspensions of the active compounds prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils, such as sesame oil, and synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Aqueous injection suspensions may contain substances that increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents that increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. Emulsions, e.g., oil-in-water and water-in-oil dispersions, can also be used, optionally stabilized by an emulsifying agent or

dispersant (surface-active materials; surfactants). Liposomes, as described above, containing the active agent may also be employed for parenteral administration.

Alternatively, the pharmaceutical compositions comprising the agent in dosages suitable for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. The preparations formulated for oral administration may be in the form of tablets, pills, capsules, cachets, lozenges, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, or powders. To illustrate, pharmaceutical preparations for oral use can be obtained by combining the active compounds with a solid excipient, optionally grinding the resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries if desired, to obtain tablets. Oral formulations may employ liquid carriers similar in type to those described for parenteral use, e.g., buffered aqueous solutions, suspensions, and the like.

These preparations may contain one or more excipients, which include, without limitation: a) diluents such as sugars, including lactose, dextrose, sucrose, mannitol, or sorbitol; b) binders such as magnesium aluminum silicate, starch from corn, wheat, rice, potato, etc.; c) cellulose materials such as methyl cellulose, hydroxypropyhnethyl cellulose, and sodium carboxymethyl cellulose, polyvinyl pyrrolidone, gums such as gum arabic and gum tragacanth, and proteins such as gelatin and collagen; d) disintegrating or solubilizing agents such as cross-linked polyvinyl pyrrolidone, starches, agar, alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate; or effervescent compositions; e) lubricants such as silica, talc, stearic acid or its magnesium or calcium salt, and polyethylene glycol; f) flavorants and sweeteners; g) colorants or pigments, e.g., to identify the product or to characterize the quantity (dosage) of active agent; and h) other ingredients such as preservatives, stabilizers, swelling agents, emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating osmotic pressure, and buffers.

The pharmaceutical composition may be provided as a salt of the active agent, which can be formed with many acids, including but not limited to hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents that are the corresponding free base forms.

As noted above, the characteristics of the agent itself and the formulation of the agent can influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the administered agent. Such pharmacokinetic and pharmacodynamic information can be collected through pre-clinical *in vitro* and *in vivo* studies, later confirmed in humans during the course of clinical trials. Guidance for performing human clinical trials based on *in vivo* animal data may be obtained from a number of sources, including, e.g., http://www.clinicaltrials.gov. Thus, for any compound used in the method of the invention, a therapeutically effective dose in mammals, particularly humans, can be estimated initially from biochemical and/or cell-based assays. Then, dosage can be formulated in animal models to achieve a desirable circulating concentration range that modulates active agent expression or activity. As human studies are conducted, further information will emerge regarding the appropriate dosage levels and duration of treatment for various diseases and conditions.

Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD50 (the dose lethal to 50% of the population) and the ED50 (the dose therapeutically effective in 50% of the population).

III. Method of the Invention

Another aspect of the present invention includes a method of inhibiting the growth of cancer cells. The method employs one or more of the components of the composition described in Section II, above, and/or in Sections IV-VII, below. The method includes exposing the cells to urease as an active agent in an amount effective to inhibit growth of the cancer cells.

A. Exposing Cancer Cells to an Active Agent

The urease composition, e.g., urease alone or urease in combination with a chemical entity effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells, may be delivered to the cancer cells by a number of methods known in the art. In therapeutic applications, the composition is administered to a patient having cancer cells in an amount sufficient to inhibit growth of the cancer cell(s). The

pharmaceutical compositions of the invention can be exposed to the cancer cells by administration by a number of routes, including without limitation, parenteral, enteral, transepithelial, transmucosal, transdermal, and/or surgical.

Parenteral administration modalities include those in which the composition is administered by, for example, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intramedullary, intramuscular, intraarticular, intrathecal, and intraventricular injections, subcutaneous, intragonadal or intratumoral needle bolus injections, or prolonged continuous, pulsatile or planned perfusions or microinfusions using the appropriate pump technology. Enteral administration modalities include, for example, oral (including buccal and sublingual) and rectal administration. Transepithelial administration modalities include, for example, transmucosal administration and transdermal administration. Transmucosal administration includes, for example, enteral administration as well as nasal, inhalation, and deep lung administration, vaginal administration, and rectal administration. Transdermal administration includes passive or active transdermal or transcutaneous modalities, including, for example, patches and iontophoresis devices, as well as topical application of pastes, salves, or ointments. Surgical techniques include implantation of depot (reservoir) compositions, osmotic pumps, and the like.

Single or multiple administrations of the active agent may be administered depending on the dosage and frequency as required and tolerated by the subject. In any event, the composition should provide a sufficient quantity of the active agent of the invention to effectively treat the subject.

It will be appreciated by one of skill in the art that there are some regions that are not heavily vascularized or that are protected by cells joined by tight junctions and/or active transport mechanisms which reduce or prevent the entry of macromolecules present in the blood stream. Thus, for example, systemic administration of therapeutics to treat gliomas, or other brain cancers, may be constrained by the blood-brain barrier which resists the entry of macromolecules into the subarachnoid space. In these types of tumors, the therapeutic composition may preferably be administered directly to the tumor site. Thus, for example, brain tumors can be treated by administering the therapeutic

composition directly to the tumor site, e.g., through a bolus injection, microinfusion, or a surgically implanted catheter.

The exposing may include visualizing the cancer cell or tumor with an image guidance tool, e.g., as described in Enhanced Magnetic Resonance Imaging, V. M. Runge, ed., C. V. Mosby Co. (1989) for MRI ; e.g., in EP 188,256; Kozak et al., TIBTEC October 1986, 262; Radiotracers for Medical Applications, CRC Press, Boca Raton, Fla., for radiodiagnostics and/or for radiotherapy; in Positron Emission Tomography of the Brain, Springer Verlag 1983, for PET; and in J. W. Nowicky et al., "Macroscopic UV-Marking through Affinity," J. Tumor Marker Oncology 31, 463-465 (1988). Thus, any of a variety of diagnostic agents can be incorporated within the compositions, which can locally or systemically deliver the incorporated agents following administration to a patient.

Imaging agents, as described above, can be used to allow one to monitor tumor treatment following administration of the compositions in a patient. For example, they are typically administered prior to the performance of the imaging procedure. It is also possible for the administration to be simultaneous with the imaging where desired, e.g., in pharmacokinetic studies. The optimum time period required for localization at the target site and optimum image enhancement will also vary with active agent and/or conjugate and/or tissue and/or imaging modality, and will also be routinely determinable. Typically, imaging will occur prior to significant clearance of the active agent from the site, which time period can also be routinely determined by those of skill in the art. In certain embodiments, active agents or conjugates will be administered 15 minutes to 4 hours prior to performing the imaging procedure, since the active agents may be localized rapidly to their target sites and then, optionally, cleared rapidly therefrom, as discussed further below.

In one embodiment of the invention, the exposing includes interrogating the subject with a diagnostic tool capable of detecting changes in extracellular pH in a subject's tissue, and identifying a tissue region within the subject that shows a selected elevation in extracellular pH following the administering. Based on the identification, the exposing can be repeated until a selected change in extracellular pH within the entire solid tumor is achieved.

In one embodiment of th invention, the exposing includes administering the

active agent composition parenterally to the subject other than by direct injection. The active agent may be derivatized as discussed in Section II, above.

As discussed above, urease catalyzes the hydrolysis of urea, leading to the production of carbamate and ammonia. In an aqueous environment, the carbamate rapidly and spontaneously decomposes to yield a second molecule of ammonia and one of carbon dioxide (Fig. 1). Urease has a wide variety of functions. Its primary environmental role is to allow organisms to use external and internally generated urea as a nitrogen source. In plants urease may participate in the systemic nitrogen transport pathways and possibly act as a toxic defense protein.

The substrate for urease is urea, which is produced in the liver, carried in the bloodstream to the kidneys, and excreted in urine. Serum concentrations of urea in healthy humans are typically between one and 10 mM, but urea levels in urine may exceed 0.5 M (Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck and Co., Inc., Rahway, NJ, 1999). Urea is also present in the secretions of the major and minor exocrine glands at concentrations approximately equivalent to serum, so a large proportion of circulating urea is translocated onto cell surfaces by secretory systems, or in tissue exudates (Burne, R. A., and Chen, Y. M., *Microbes and Infection*, 2, 2000; 533-542). For example, adult humans secrete almost 1 liter of saliva per day containing 1-10 mM urea, and approximately 20-25% of all urea produced enters the intestinal tract rather than exiting the body in urine (Visek, W. J., *Fed. Proc.* 31 (1972) 1178-1193). There is no apparent active efflux mechanism for exocrine secretion of urea, so it is believed that the uncharged urea molecule simply follows water through the cells and tight junctions of the epithelium. As a consequence, the surfaces of cells in the human body are bathed in a fluid which contains urea (McLean R. J. C., *et al. CRC, Crit. Rev. Microbiol.* 16 (1988) 37-79).

B. Two- and Three-Stage Exposure

As noted above, in accordance with one embodiment of the invention, the active agent is directly conjugated to the targeting moiety. Alternatively, according to another embodiment of the invention, a two-step approach is used to deliver the active agent to the tumor cells. Preferably, the tumor cells are

contained within a subject. The two-step approach has the advantage of decoupling the pharmacokinetics of the active agent from that of the targeting moiety. The targeting moiety is permitted to accrete to target sites while conjugated to a first binding partner, e.g., a coil-forming peptide. Following accretion of the targeting moiety, substantially all of the non-targeted conjugate may be cleared from the subject's circulation. The active agent may then be administered as a conjugate to the complementary binding partner member, e.g., a second coil-forming peptide.

Any two-stage system known in the art may be used, such as biotin, haptens, etc. having a high affinity binding partner, e.g., avidin, specific antibodies, etc. See, e.g., U.S. Pat. Nos: 6,190,923, 6,187,285, and 6,183,721.

A preferred two-stage system includes a coiled-coil system. Thus, in certain embodiments of the invention employing a two-step approach as described above, a first conjugate comprising a targeting moiety and a first coil-forming peptide characterized by a selected charge and an ability to interact with a second, oppositely charged coil-forming peptide to form a stable α-helical coiled-coil heterodimer is added to the tumor cells. An exemplary method for conjugating an antibody targeting moiety to a coil-forming peptide is described in Example 4.

Subsequently a second conjugate comprising the second coil-forming peptide and the active agent is added to the cells. A preferable active agent is urease. An exemplary method for the conjugation of jack bean urease to a coil-forming peptide is described in Example 2.

When a first coil-forming peptide and a second coil-forming peptide are mixed together under conditions favoring the formation of α-helical coiled-coil heterodimers, they interact to form a two-subunit α-helical coiled-coil heterodimeric complex. Peptides in an α-helical coiled-coil conformation interact with one another in a characteristic manner that is determined by the primary sequence of each peptide. The tertiary structure of an α-helix is such that seven amino acid residues in the primary sequence correspond to approximately two turns of the α-helix. Accordingly, a primary amino acid sequence giving rise to an α-helical conformation may be broken down into units of seven residues each, termed "heptads". The heterodimer-subunit peptides are composed of a series of

heptads in tandem. When the sequence of a heptad is repeated in a particular heterodimer-subunit peptide, the heptad may be referred to as a "heptad repeat", or simply "repeat".

A first coil-forming peptide and second coil-forming peptide may assemble into a heterodimer coiled-coil helix (coiled-coil heterodimer) in either parallel or antiparallel configurations. In a parallel configuration, the two heterodimer-subunit peptide helixes are aligned such that they have the same orientation (amino-terminal to carboxyl-terminal). In an antiparallel configuration, the helixes are arranged such that the amino-terminal end of one helix is aligned with the carboxyl-terminal end of the other helix, and vice versa. Such heterodimer subunits are described in PCT patent application WO 95/31480 "Heterodimer Polypeptide Immunogen Carrier Composition and Method", publication date 23 November 1995, which is incorporated herein by reference in its entirety. Exemplary subunits are referred to herein as K-coils, referring to positively charged subunits whose charge is provided dominantly by lysine residues, and E-coils, referring to negatively charged subunits whose charge is provided dominantly by glutamic acid residues. Preferred examples from the above-mentioned application include SEQ ID NOS: 1-2.

Heterodimer-subunit peptides designed in accordance with the guidance presented in the above-referenced application typically show a preference for assembling in a parallel orientation versus an antiparallel orientation. For example, the exemplary peptides identified by SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4 form parallel-configuration heterodimers, as do other peptide sequences (as discussed in the WO 95/31480 application). An additional exemplary peptide includes a K-coil peptide made of 7-amino acid, e.g., SEQ ID NO: 5 repeats. In one embodiment, the K-coil is 35 amino acids in length; it is positively charged, with no specific structure in solution. The E-coil may be a peptide made of 7-amino acid, e.g., SEQ ID NO: 6 repeats. In one embodiment, the E-coil is 35 amino acids in length; it is negatively charged, and has no specific structure in solution.

As noted, one of the two subunit peptides in the heterodimer contains a targeting moiety, and the other peptide contains an active agent. In both cases, the peptide can be synthesized or derivatized after synthesis, to provide the requisite attachment function. An exemplary method of peptide synthesis is

described in Example 1. In general, most conjugating methods do not disrupt the coil-forming activity of either of the coil-forming peptide, nor do such conjugations disrupt the activity of the conjugated active agent or targeting moiety.

Considering the modification of the first coil-forming peptide, the peptide may be synthesized at either its N- or C-terminus to carry additional terminal peptides that can function as a spacer between the targeting moiety and the helical-forming part of the peptide. The targeting moiety-coil forming peptide and/or the active agent-coil forming peptide may be synthesized, as noted above, by either solid-state, PCR, or recombinant methods, *in vivo* or *in vitro*.

In forming the conjugate through solid-state methods, the active agent or targeting moiety is preferably covalently attached to the N-terminal amino acid residue, or to one of the residues facing the exposed face of the heterodimer. Preferred coupling groups are the thiol groups of cysteine residues, which are easily modified by standard methods. Other useful coupling groups include the thioester of methionine, the imidazolyl group of histidine, the guanidinyl group of arginine, the phenolic group of tyrosine and the indolyl group of tryptophan. These coupling groups can be derivatized using reaction conditions known to those skilled in the art.

To bind the active agent second coil-forming peptide to the targeting moiety-first coil-forming peptide, the two peptides are contacted under conditions that favor heterodimer formation. An exemplary medium favoring coiled-coil heterodimer formation is a physiologically-compatible aqueous solution typically having a pH of between about 6 and about 8 and a salt concentration of between about 50 mM and about 500 mM. Preferably, the salt concentration is between about 100 mM and about 200 mM. An exemplary medium has the following composition: 50 mM potassium phosphate, 100 mM KCl, pH 7. Equally effective media may be made by substituting, for example, sodium phosphate for potassium phosphate and/or NaCl for KCl. Heterodimers may form under conditions outside the above pH and salt range, medium, but some of the molecular interactions and relative stability of heterodimers vs. homodimers may differ from characteristics detailed above. For example, ionic interactions between the ionic groups that tend to stabilize heterodimers may break down at low or high pH values due to the protonation of, for example, Glu side chains at

acidic pH, or the deprotonation of, for example, Lys side chains at basic pH. Such effects of low and high pH values on coiled-coil heterodimer formation may be overcome, however, by increasing salt concentration.

Increasing the salt concentration can neutralize the stabilizing ionic attractions or suppress the destabilizing ionic repulsions. Certain salts have greater efficacy at neutralizing the ionic interactions. For example, in the case of the K-coil peptide, a 1M or greater concentration of ClO^{4-} anions is required to induce maximal α-helical structure, whereas a 3M or greater concentration of Cl^- ions is required for the same effect. The effects of high salt on coiled-coil formation at low and high pH also show that interhelical ionic attractions are not essential for helix formation, but rather, control whether a coiled-coil tends to form as a heterodimer versus a homodimer. The first coil-forming peptide, e.g., an E-coil peptide, and the second coil-forming peptide, e.g., a K-coil peptide can also be conjugated to targeting moieties and active agents as described in Example 2 of co-owned U.S. application number 09/654,191 (Attorney Docket #: 4800-0015.31), which is expressly incorporated by reference herein in its entirety. See, also, U.S. Patent No. 6,300,141, which is incorporated by reference herein in its entirety.

In one embodiment of the invention, the active agent-coil-forming peptide has a short serum half life and is excreted via the renal pathway. Thus, the active agent either accretes to the target site or it is rapidly removed from the subject. This biodistribution of active agent facilitates the protection of normal tissues of the recipient from undesired exposure. In order to enhance renal excretion, conjugation to a renal excretion promoting biodistribution directing molecule may be employed. An alternative to the optional clearance step is to allow a sufficient amount of time to pass which permits the subject's native clearance mechanisms to substantially remove the circulating first conjugate.

In another embodiment, antibody-based or non-antibody-based targeting moieties are employed to deliver a ligand or an anti-ligand to a target site bearing an unregulated antigen. Preferably, a natural binding agent for such an unregulated antigen is used for this purpose. For example, diseases such as hepatoma or myeloma are generally characterized by unregulated IL-6 receptors for which IL-6 acts as an autocrine or paracrine moiety with respect to rapid

proliferation of these target cell types. For the treatment of such ailments, IL-6 may therefore be employed as a targeting moiety. See, e.g., Miki, C. *et al.* (2002) *Cancer* 94(5):1584-92.

For example, IL-6 and a first coil-forming peptide may be conjugated via chemical means or be formed as a recombinant molecule. The IL-6-first coil-forming peptide conjugate is administered to a recipient, and the IL-6 component of the conjugate directs the localization of the conjugate to IL-6 receptors. This localization will occur preferentially to sites bearing unregulated IL-6 receptors. After target site localization occurs, a clearing agent, as described below, is optionally administered to substantially clear the recipient's circulation of IL-6-first coil-forming peptide conjugate. Suitable clearing agents for this purpose are, e.g., IL-6 receptor-HSA-galactose or anti-IL-6-antibody-HSA-galactose. After a time sufficient for substantial, e.g., 50%, 70%, or preferably 90%, clearance of IL-6 from the recipient's circulation, active agent-second coil-forming peptide, e.g., urease-second coil-forming peptide, is administered and localizes to target sites via the IL-6-first coil-forming peptide conjugate.

As described in more detail in Section VII below, expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes, or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids, may be used for delivery of recombinant urease molecules to the targeted cell population. Methods that are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant vectors containing urease. See, for example, the techniques described in Sambrook *et al.*, and Ausubel *et al.* Alternatively, active agents can be delivered to target cells utilizing liposomes or nanocapsules as described in Section II above. In one embodiment, the method of the invention includes adding to the subject a composition containing the active agent and a targeting moiety effective to target the composition to the cells.

C. Clearing Agents

As discussed above, a clearing agent may be administered to a subject. The clearing agent is capable of directing circulating first conjugate to hepatocyte receptors, thereby decreasing the amount of circulating first conjugate prior to administering the second conjugate.

As noted above, clearing agents of protein or nonprotein composition having physical properties facilitating use for *in vivo* complexation and blood clearance of unbound targeting moiety conjugates may be useful when the tumor cells are contained within a subject, e.g., a human. Clearing agents preferably exhibit one or more of the following characteristics: rapid, efficient complexation with targeting moiety *in vivo*; rapid clearance from the blood of targeting moiety conjugates capable of binding a subsequently administered active agent; high capacity for clearing or inactivating large amounts of targeting moiety conjugates; and low immunogenicity.

Useful clearing agents include hexose-based and non-hexose based moieties. Hexose-based clearing agents are molecules that have derivatized to incorporate one or more hexoses (six carbon sugar moieties) recognized by Ashwell receptors or other receptors such as the mannose/N-acetylglucosamine receptor which are associated with endothelial cells and/or Kupffer cells of the liver or the mannose 6-phosphate receptor. Exemplary hexoses include galactose, mannose, mannose 6-phosphate, N-acetylglucosamine and the like. Other moieties recognized by Ashwell receptors, including glucose, N-galactosamine, N-acetylgalactosamine, thioglycosides of galactose and, generally, D-galactosides and glucosides may also be used. Galactose thioglycoside conjugation to a protein may be accomplished, e.g., as described in Lee *et al.* (1976) *Biochemistry*, 15(18):3956 or Drantz *et al.*(1976) *Biochemistry*, 15(18):3963.

Protein-type galactose-based clearing agents include proteins having endogenous exposed galactose residues or which have been derivatized to expose or incorporate such galactose residues. Exposed galactose residues direct the clearing agent to rapid clearance by endocytosis into the liver through specific receptors (Ashwell receptors). These receptors bind the clearing agent and induce endocytosis into the hepatocyte, leading to fusion with a lysosome and recycle of the receptor back to the cell surface. This clearance mechanism is characterized by high efficiency, high capacity and rapid kinetics.

An exemplary clearing agent of the protein-based/galactose-bearing variety is the asialoorosomucoid derivative of human alpha-1 acid glycoprotein. The rapid clearance from the blood of asialoorosomucoid is described in Galli, *et al.*, *J*

of Nucl Med Allied Sci (1988) 32(2):110-16. Treatment of orosomucoid with neuraminidase removes sialic acid residues, thereby exposing galactose residues. Additional derivatized clearing agents include, e.g., galactosylated albumin, galactosylated-IgM, galactosylated-IgG, asialohaptoglobin, asialofetuin, and asialoceruloplasmin.

Additional clearing agents are described in U.S. Patent No. 6,358,490, issued March 19, 2002; U.S. Patent No. 6,172,045, issued January 9, 2001; and U.S. Patent No. 5,886,143, issued March 23, 1999, each of which is incorporated by reference herein.

A further class of clearing agents useful in the present invention include small molecules, e.g., ranging from about 500 to about 10,000 Daltons. The small molecules may be derivatized with galactose. The small molecule clearing agents are preferably capable of (1) rapidly and efficiently complexing with the relevant conjugate, coil-forming peptide, active agent, and/or targeting moiety; and (2) clearing such complexes from the blood via the galactose receptor, a liver specific degradation system, as opposed to aggregating into complexes that are taken up by, e.g., the lung and spleen. Additionally, the rapid kinetics of galactose-mediated liver uptake, coupled with the affinity of the ligand-anti-ligand interaction, allow the use of intermediate or even low molecular weight carriers.

In one embodiment of the invention, protein-type and polymer-type non-galactose-based clearing agents are used. These clearing agents may act through an aggregation-mediated mechanism. In this embodiment of the invention, the clearing agent used may be selected based on the target organ to which access of the clearing agent is to be excluded. For example, high molecular weight, e.g., ranging from about 200,000 to about 1,000,000 Daltons may be useful when tumor cell targets are involved.

Another class of clearing agents includes agents that do not remove circulating active agent/targeting moiety conjugates, but instead inactivate the circulating conjugates by blocking the relevant sites on the active agent, targeting moiety, liposome, viral vector, and/or any other portion thereof. These "cap-type" clearing agents are preferably small, e.g., 500 to 10,000 Daltons, highly charged molecules, e.g., derivatized 6,6'-[(3,3'-dimethyl[1,1'-biphenyl]-4,4'-

diyl)bis(azo)bis[4-amino-5-hydroxy-1,3-naphthalene disulfonic acid] tetrasodium salt.

E. Dosage/Administration

For the method of the invention, any effective administration regimen regulating the timing and sequence of doses may be used. Exemplary dosage levels for a human subject will depend on the mode of administration, extent (size and distribution) of the tumor, patient size, and responsiveness of the cancer to urease treatment.

Where a urease composition is injected directly into a tumor, an exemplary dose is 0.1 to 1,000 International units urease activity per mm^3 tumor. For example, and assuming a relatively uniform distribution of the urease in the tumor is achieved, a dose of between 0.5 and 5 international units may be suitable. The placement of the injection needle may be guided by conventional image guidance techniques, e.g., fluoroscopy, so that the physician can view the position of the needle with respect to the target tissue. Such guidance tools can include ultrasound, fluoroscopy, CT or MRI.

In accordance with one aspect of the invention, the effectiveness or distribution of the administered urease dose may be monitored, during or after direct injection of urease into the tumor, by monitoring the tumor tissue by a tool capable of detecting changes in pH within the cancerous tissue region of the subject. Such tools may include a pH probe that can be inserted directly into the tumor, or a visualization tool, such as magnetic resonance imaging (MRI), computerized tomography (CT), or fluoroscopy. MRI interrogation may be carried out in the absence of additional imaging agents, based simply on differences in magnetic properties of tissue as a function of pH. CT or fluoroscopic imaging may require an additional pH-sensitive imaging agent whose opacity is affected by the pH of the tissue medium. Such agents are well known to those of skill in the art.

Before any urease injection, the tumor tissue can be visualized by its lower pH relative to surrounding normal tissue. Thus, the normal tissue may have a normal pH of about 7.2, whereas the tumor tissue may be 0.1 to 0.4 or more pH units lower. That is, before any urease is injected, the extent of tumor tissue can

be defined by its lower pH. Following urease administration, the pH of the tumor region having urease will begin to rise, and can be identified by comparing the resulting images with the earlier pre-dosing images.

By interrogating the tissue in this manner, the degree of change in pH and extent of tissue affected may be monitored. Based on this interrogation, the physician may administer additional composition to the site, and/or may administer composition at additional areas within the tumor site. This procedure may be repeated until a desired degree of pH changes, e.g., 0.2 to 0.4 pH units, has been achieved over the entire region of solid tumor.

Dosing by direct injection may be repeated by suitable intervals, e.g., every week or twice weekly, until a desired end point, preferably substantial or complete regression of tumor mass is observed. The treatment efficacy can be monitored, as above, by visualizing changes in the pH of the treated tissue during the course of treatment. Thus, before each additional injection, the pH of the tissue can be visualized to determine the present existing extent of tumor, after which changes in the pH of the tissue can be used to monitor the administration of the new dose of urease composition to the tissue.

Where the urease is administered parenterally by a method other than direct injection, an exemplary dose of the urease is 100-100,000 international units/kg urease activity/kg subject body weight. As noted herein, the urease composition in this method preferably includes a targeting agent for targeting urease to the cancer cells, e.g., site of solid tumor, or for sequestering urease, e.g., in liposomal form, selectively at the tumor site.

As above, imaging techniques that are sensitive to changes in tissue pH, may be used to monitor the effectiveness of the dose administered. Since such targeting may take several hours or more, the method may involve monitoring tumor pH, as above, before urease injection, and several hours, e.g., 12-24 hours following dosing, to confirm that the tumor site has been adequately dosed, as evidenced by rise in pH of the tumor region. Depending on the results of this interrogation, the method may dictate additional dosing until a desired rise in pH, e.g., 0.2-0.4 pH units, is observed. Once this dose is established, the patient may be treated with a similar dose of the urease composition on a regular basis, e.g., one or twice weekly, until a change in tumor size or condition is achieved.

In both types of administration, final dosage regimen will be determined by the attending physician in view of good medical practice, considering various factors that modify the action of drugs, e.g., the agent's specific activity, the severity of the disease state, the responsiveness of the patient, the age, condition, body weight, sex, and diet of the patient, the severity of any infection, and the like. Additional factors that may be taken into account include time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Further refinement of the dosage appropriate for treatment involving any of the formulations mentioned herein is done routinely by the skilled practitioner, especially in light of the dosage information and assays disclosed, as well as the pharmacokinetic data observed in clinical trials. Appropriate dosages may be ascertained through use of established assays for determining concentration of the agent in a body fluid or other sample together with dose response data.

The frequency of dosing will depend on the pharmacokinetic parameters of the agent and the route of administration. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active agent or to maintain the desired effect. Accordingly, the pharmaceutical compositions can be administered in a single dose, multiple discrete doses, continuous infusion, sustained release depots, or combinations thereof, as required to maintain desired minimum level of the agent.

Short-acting pharmaceutical compositions (i.e., short half-life) can be administered once a day or more than once a day (e.g., two, three, or four times a day). Long acting pharmaceutical compositions might be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks. Pumps, such as subcutaneous, intraperitoneal, or subdural pumps, may be preferred for continuous infusion.

Compositions comprising an active agent of the invention formulated as described in Section II, above, in a pharmaceutical acceptable carrier may be prepared, placed in an appropriate container, and labeled for treatment of an indicated condition. Conditions indicated on the label may include, but are not limited to, treatment and diagnosis of various cancer types. Kits, as described below, are also contemplated, wherein the kit comprises a dosage form of a

pharmaceutical composition and a package insert containing instructions for use of the composition in treatment of a medical condition.

Generally, the active agents used in the invention are administered to a subject in an effective amount. Generally, an effective amount is an amount effective to either (1) reduce the symptoms of the disease sought to be treated; or (2) induce a pharmacological change relevant to treating the disease sought to be treated. For cancer, an effective amount may include an amount effective to: reduce the size of a tumor; slow the growth of a tumor; prevent or inhibit metastases; or increase the life expectancy of the affected subject. An exemplary method of administering the active agent to mice is described in Example 6, below.

Active agents, clearing agents, and/or imaging agents of the present invention may be administered in single or multiple doses. Alternatively, the agents may be infused intravenously over an extended period of time. For example, a clearing agent may be administered intravenously for a time period sufficient to clear the targeting moiety in a continuous manner.

In the multi-targeting moiety administering embodiments of the invention, described above, the doses of each administered component may be determined by the attending physician in accordance with his or her experience; the particulars of the recipient's condition, e.g., the nature and location of the target site, including the antigens associated therewith, will impact target moiety selection and route of administration decisions; and the combination of targeting moiety to be employed, e.g., antibody performance may vary with respect to antigen density and the affinity of the antibody for the antigen.

IV. Method of Potentiating an Anticancer Drug

As noted above, one of the limitations in current chemotherapy is that the target tumor becomes increasingly resistant to the effect of the anti-tumor compound. This resistance may be due to reduced uptake of the compound into tumor cells, reduced availability of the drug at the site of uptake, or increased intracellular metabolism.

For a number of weakly basic drugs, that is, drugs having one or more protonizable amines, the mechanism of drug uptake may involve passive

diffusion across the cell membrane in uncharged form. Accordingly, the rate of movement of the compound across the cell membrane will depend on the inside/outside pH gradient. If the extracellular pH is equal to or greater than the intracellular pH, e.g., around pH 7.2, the compound will tend to pass into the cells in uncharged form at least as frequently as it exits the cell. Conversely, as the extracellular pH falls with respect to intracellular pH, as it does in solid tumors, the lower outside pH will favor the charged, protonated form of the compound, and this will inhibit uptake of the drug into the cells. In effect, one of the effects of the lower extracellular pH in tumors is to protect the tumor against weakly basis anti-tumor compounds.

Weakly basic anti-tumor compound whose activity can be adversely affected by a lower extracellular pH include doxorubicin, daunorubicin, mitoxanthrone, epirubicin, mitomycin, bleomycin, vinca alkaloids such as vinblastine and vincristine, alkylating agents such as cyclophosphamide and mechlorethamine hydrochloride, and antrineoplastic purine and pyrimidine derivatives.

In the present method, urease or a urease containing composition is administered to a solid tumor in an amount effective to raise the extracellular pH of the tumor fluid at least 0.1 pH unit, e.g., 0.1 to 0.5 pH units or more. In certain embodiments, the extracellular pH of the fluid is raised to at least pH 7.0, 7.2, or higher.

The urease may be administered as described in Section III above, e.g., directly into the subject's tumor or parenterally other than by direct injection. Also as described above, the change in pH produced by the administration of urease may be monitored by determining changes in pH in tumor tissue and the extent of those changes, using imaging tools for visualizing tumor pH, or by direct pH measurements of the tumor.

The dose administered in this method may be less than that needed where urease is the sole anti-tumor agent, as long as the amount injected is sufficient to produce the desired rise in tumor pH. Alternatively, the method may involve administration of a therapeutic amount of urease and a therapeutic or subtherapeutic amount of the anti-cancer compound. As can be appreciated, the method may allow a lower than normal dose of the anti-tumor compound to be

given, both because urease enhances therapeutic effect of the compound, and because urease is itself contributing to the therapeutic effect. Greater efficacy with fewer side effects result.

In one embodiment, a chemical entity, as described above, may also be associated with the active agent to enhance the delivery of the active agent. In this embodiment, the active agent may be administered by any method, e.g., parenterally, other than direct injection.

V. Method of Monitoring Anticancer Treatment

The invention also provides, in yet another aspect, a method of monitoring anticancer treatment by assessing the presence, size or condition a solid tumor in a subject. The method includes administering an active agent as described above, e.g., urease, to a subject that contains, or is suspected of containing, a solid tumor. The active agent is administered under conditions effective to localize the active agent in the solid tumor in the subject.

The subject is interrogated with a diagnostic tool capable of detecting changes in extracellular pH in a subject's tissue, as described above. The diagnostic tool is preferably a pH-sensitive diagnostic agent, such as an imaging, contrast or shift reagent, as described in Section II, above, capable of localizing in the tumor that may be administered prior to, following or concurrently with the active agent. A tissue region is identified within the subject that shows an elevation in extracellular pH following the administration. Any tool capable of identifying the diagnostic agent may be used to detect the agent, such as MRI, PET scan, and the like. as described above.

In one embodiment, the method includes administering urease to the subject employed in an anti-tumor therapy, and the identification is used for detecting the localization of urease in a solid tumor.

The identifying may be used for monitoring the change in size and shape of the tumor in response to urease administration.

In one embodiment employing PET scan, the subject is administered 13N-labelled ammonia. The patient is then administered urease in an amount effective to reach the tumor site. The urease hydrolyzes urea to produce non-

labelled ammonia. Over time, the labelled ammonia is diluted or displaced, causing a gradual clearing on the scan.

In another embodiment employing PET scan, the subject is administered 13N-labelled urea. The patient is then administered urease in an amount effective to reach the tumor site. The urease hydrolyzes the labelled urea to produce labelled ammonia, which could be detected on the scan.

VI. Kits

In still another aspect, this invention provides kits for inhibiting the growth of tumor cells using the methods described herein. The kits include a container containing one or more active agents. The kits can additionally include any of the other components described herein for the practice of the methods of this invention. Such components include, but are not limited to pharmaceutical components, targeting moieties, imaging agents, clearing agents, gene therapy components, and the like.

The kits may optionally include instructional materials containing directions (i.e., protocols) disclosing the use of active agents for inhibiting tumor cell growth. Thus, in one embodiment, the kit includes a pharmaceutical composition containing an active agent, preferably a urease enzyme, and instructional materials teaching the administration of the composition to a subject, for the treatment of a cancer in the subject. In one embodiment, the instructional material teaches administering the urease composition to a subject in an amount which is dependent on the size of the tumor and between 0.1-to-100 international units urease activity per mm^3 tumor, when the composition is administered by direct injection into the tumor, and in an amount between 100-100,000 international units/kg international units urease activity/kg subject body weight, when the composition is administered parenterally to the subject other than by direct injection into the tumor.

In another embodiment, the instructional material teaches administering the urease composition to a subject who is also receiving a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor, in an amount of urease effective to

reduce or reverse the higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.

Alternatively, the instructional material teaches administering the urease composition to a subject containing, or suspected of containing, a solid tumor, under conditions effective to localize the urease in a solid tumor in the subject, interrogating the subject with a diagnostic tool capable of detecting changes in extracellular pH in a subject's tissue, and identifying a tissue region within the subject that shows an elevation in extracellular pH following said administering.

While the instructional materials typically comprise written or printed materials they are not limited to such. Any medium capable of storing such instructions and communicating them to an end user is contemplated by this invention. Such media include, but are not limited to electronic storage media (e.g., magnetic discs, tapes, cartridges, chips), optical media (e.g., CD ROM), and the like. Such media may include addresses to internet sites that provide such instructional materials.

VII. Gene/Cell Therapy

A gene therapy composition is also contemplated, in another aspect of the invention, for use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject. The gene therapy composition includes a targeting vector effective, when administered to the subject, of selectively transfecting cancer cells, and carried in said vector, a recombinant nucleic acid sequence effective to produce a nucleic acid molecule, e.g., mRNA; which encodes the active agent; preferably urease, in transfected cancer cells.

In one embodiment, the tumor cells are contacted with engineered non-tumorigenic cells that express a heterologous nucleic acid molecule that encodes the active agent. The non-tumorigenic engineered cells may be, without limitation, fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells, bone cells, keratinocytes, or irradiated, engineered non-tumorigenic cells derived from tumors.

In another embodiment, the tumor cells are transfected with a gene construct encoding a cell targeting moiety and a heterologous nucleic acid molecule which encodes the urease protein and a secretory leader sequence. The gene construct is capable of expressing the cell targeting moiety and

heterologous urease protein and the secretory leader sequence as a conjugate within the tumor cells and whereby the conjugate is directed by the secretory leader sequence to leave the cell thereafter for selective localization at a cell surface antigen recognized by the cell targeting moiety.

Preferably, the cell targeting moiety is selectively localized to a cell surface antigen, and the cell surface antigen is specific for at least one human solid tumor. The gene construct may comprise a transcriptional regulatory sequence comprising a promoter and a control element which comprises a genetic switch to control expression of the gene construct.

According to one embodiment of the invention, the gene construct is packaged within a viral vector. A variety of viral vectors are available for tumor targeting. Parvivirus are known to infect tumor cells selectively. Alternatively, the virus can be designed to replicate selectively in tumor cells, according to published methods. See, for example, Puhlmann M; *et al.*, *Hum Gene Ther*, (1999) 10 (4):649-57; Noguiez-Hellin P; *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*, (1996) 93(9):4175-80; and Cooper MJ, *Semin Oncol* (1996) 23(1) 172-87. For example, the virus may be altered to contain a mutated thymidine kinase or polymerase gene that allows viral replication only in rapidly dividing cells containing these enzymes. Alternatively, the virus can be genetically engineered to contain tumor-specific control elements, e.g., tumor-specific promoter regions, that are responsive and express the desired protein or protein necessary for viral replication only in tumor cells. Preferably, the gene construct is packaged within an adenovirus.

A. Vectors for Cloning, Gene Transfer and Expression

Within certain embodiments of the invention, expression vectors are employed to express the urease polypeptide product, which may then be purified. In other embodiments, the expression vectors are used in gene therapy. Expression vectors may include appropriate signals be provided in the vector, and various regulatory elements, such as enhancers/promoters from viral and/or mammalian sources that drive expression of the genes of interest in host cells. Elements designed to optimize messenger RNA stability and translatability in host cells also are defined. The conditions for the use of a number of dominant

drug selection markers for establishing permanent, stable cell clones expressing the products are also provided, as is an element that links expression of the drug selection markers to expression of the polypeptide.

B. Regulatory Elements

The term "expression construct" is meant to include any type of genetic construct containing a nucleic acid coding for a gene product in which part or all of the nucleic acid encoding sequence is capable of being transcribed. The transcript may be translated into a protein, but it need not be. In certain embodiments, expression includes both transcription of a gene and translation of mRNA into a gene product. In other embodiments, expression only includes transcription of the nucleic acid encoding a gene of interest.

In preferred embodiments, the nucleic acid encoding a gene product is under transcriptional control of a promoter. A "promoter" refers to a DNA sequence recognized by the synthetic machinery of the cell, or introduced synthetic machinery, required to initiate the specific transcription of a gene. The phrase "under transcriptional control" means that the promoter is in the correct location and orientation in relation to the nucleic acid to control RNA polymerase initiation and expression of the gene.

The term promoter will be used here to refer to a group of transcriptional control modules that are clustered around the initiation site for RNA polymerase II. The promoters may be composed of discrete functional modules, each consisting of approximately 7-20 bp of DNA, and containing one or more recognition sites for transcriptional activator or repressor proteins. At least one module in each promoter functions to position the start site for RNA synthesis. An exemplary module is the TATA box, but in some promoters lacking a TATA box, such as the promoter for the mammalian terminal deoxynucleotidyl transferase gene and the promoter for the SV40 late genes, a discrete element overlying the start site itself helps to fix the place of initiation.

The particular promoter employed to control the expression of a nucleic acid sequence of interest is not believed to be important, so long as it is capable of directing the expression of the nucleic acid in the targeted cell. Thus, where a human cell is targeted, it is preferable to position the nucleic acid coding region

adjacent to and under the control of a promoter that is capable of being expressed in a human cell. Generally, such a promoter may include either a human or viral promoter.

In various embodiments, the human cytomegalovirus (CMV) immediate early gene promoter, the SV40 early promoter, the Rous sarcoma virus long terminal repeat, rat insulin promoter and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase may be used to obtain high-level expression of the coding sequence of interest. The use of other viral or mammalian cellular or bacterial phage promoters, which are well-known in the art to achieve expression of a coding sequence of interest, is contemplated as well.

Where a cDNA insert is employed, one may desire to include a polyadenylation signal to effect proper polyadenylation of the gene transcript. The nature of the polyadenylation signal is not believed to be crucial to the successful practice of the invention, and any such sequence may be employed, such as human growth hormone and SV40 polyadenylation signals. Also contemplated as an element of the expression cassette is a terminator. These elements can serve to enhance message levels and to minimize read through from the cassette into other sequences.

C. Selectable Markers

In certain embodiments of the invention, the cells containing nucleic acid constructs of the present invention may be identified *in vitro* or *in vivo* by including a marker in the expression construct. Such markers confer an identifiable change to the cell permitting easy identification of cells containing the expression construct. Typically, the inclusion of a drug selection marker aids in cloning and in the selection of transformants, for example, genes that confer resistance to neomycin, puromycin, hygromycin, DHFR, GPT, zeocin and histidinol are useful selectable markers. Alternatively, enzymes such as herpes simplex virus thymidine kinase (tk) or chloramphenicol acetyltransferase may be employed. Immunologic markers also may be employed. Further examples of selectable markers are well known to one of skill in the art. See, e.g., Baumann, R.P. *et al.* (2002) *Biotechniques* 32(5):1030-34.

D. Delivery of Expression Vectors

There are a number of ways in which expression vectors may be introduced into cells. In certain embodiments of the invention, the expression construct comprises a virus or engineered construct derived from a viral genome which is used to deliver a urease composition to a target cell. The ability of certain viruses to enter cells via receptor-mediated endocytosis, to integrate into host cell genome, and express viral genes stably and efficiently, have made them attractive candidates for the transfer of foreign genes into mammalian cells.

One of the preferred methods for *in vivo* delivery involves the use of an adenovirus expression vector. "Adenovirus expression vector" is meant to include those constructs containing adenovirus sequences sufficient to (a) support packaging of the construct and (b) to express a polynucleotide that has been cloned therein. In this context, expression does not require that the gene product be synthesized. See, e.g., Barnett, B.G., *et al.* (2002) "Targeted Adenovirus Vectors" *Biochim Biophys Acta* 1575(1-3):1-14.

In one embodiment of the invention, the expression vector may comprise a genetically engineered form of adenovirus. Knowledge of the genetic organization of adenovirus, a 36 kb, linear, double-stranded DNA virus, allows substitution of large pieces of adenoviral DNA with foreign sequences up to 7 kb. In contrast to retrovirus, the adenoviral infection of host cells does not result in chromosomal integration because adenoviral DNA can replicate in an episomal manner without potential genotoxicity. Also, adenoviruses are structurally stable, and no genome-rearrangement has been detected after extensive amplification.

Adenovirus is particularly suitable for use as a gene transfer vector because of its mid-sized genome, ease of manipulation, high titer, wide target cell range and high infectivity. Generation and propagation of adenovirus vectors may depend on a helper cell line. Helper cell lines may be derived from human cells, such as human embryonic kidney cells, muscle cells, hematopoietic cells or other human embryonic mesenchymal or epithelial cells. Alternatively, the helper cells may be derived from the cells of other mammalian species that are permissive for human adenovirus. Such cells include, e.g., Vero cells or other monkey embryonic mesenchymal or epithelial cells. An exemplary helper cell line is the 293 cell line, which was transformed from human embryonic kidney

cells by Ad5 DNA fragments and constitutively expresses E1 proteins. Methods for culturing 293 cells and propagating adenovirus have been described.

Additional viral vectors may be employed as expression constructs in the present invention. Vectors derived from viruses such as vaccinia virus (Walther, W. and Stein, U. (2000) *Drugs* 60(2):249-71), adeno-associated virus (Zhao, N. *et al.* (2001) *Mol Biotechnol* 19(3):229-37) and herpesviruses (Burton, E.A. *et al.* (2001) *Adv Drug Deliv Rev* 53(2):155-70) may be employed. Additional tumor-specific, replication-selective viruses that may be used in the present invention are reviewed in Hawkins, L.K. *et al.* (2002) *Lancet Oncol* 3(1):17-26.

Several non-viral methods for the transfer of expression constructs into cultured mammalian cells also are contemplated by the present invention. These include calcium phosphate precipitation, DEAE-dextran, electroporation, direct microinjection, DNA-loaded liposomes and lipofectamine-DNA complexes, cell sonication, gene bombardment using high velocity microprojectiles, and receptor-mediated transfection.

Once the expression construct has been delivered into the cell, the nucleic acid encoding the gene of interest, e.g., the urease gene, may be positioned and expressed at different sites. In certain embodiments, the nucleic acid encoding the active agent may be stably integrated into the genome of the cell. This integration may be in the cognate location and orientation, via homologous recombination (gene replacement) or it may be integrated in a random, non-specific location (gene augmentation). In yet further embodiments, the nucleic acid may be stably maintained in the cell as a separate, episomal segment of DNA. Such nucleic acid segments or "episomes" encode sequences sufficient to permit maintenance and replication independent of or in synchronization with the host cell cycle. The method of delivery of the expression construct and the location in the cell where the nucleic acid remains is dependent on the type of expression construct employed.

In yet another embodiment of the invention, the expression construct may simply consist of naked recombinant DNA or plasmids. Transfer of the construct may be performed by any of the methods mentioned above which physically or chemically permeabilize the cell membrane. This is particularly applicable for transfer *in vitro*, but it may be applied to *in vivo* use as well.

In still another embodiment of the invention for transferring a naked DNA expression construct into cells may involve particle bombardment. This method depends on the ability to accelerate DNA-coated microprojectiles to a high velocity allowing them to pierce cell membranes and enter cells without killing them. Several devices for accelerating small particles are useful in this regard. One such device relies on a high voltage discharge to generate an electrical current, which in turn provides the motive force. The microprojectiles used may consist of biologically inert substances such as tungsten or gold beads.

In one embodiment, such expression constructs may be entrapped in a liposome, lipid complex, nanocapsule, or other formulation using one or more of the methods disclosed in Section II, above. Also contemplated are lipofectamine-DNA complexes.

In certain embodiments of the invention, the liposome may be complexed with a hemagglutinating virus (HVJ). In other embodiments, the liposome may be complexed or employed in conjunction with nuclear non-histone chromosomal proteins (HMG-1). In yet further embodiments, the liposome may be complexed or employed in conjunction with both HVJ and HMG-1.

Other expression constructs which can be employed to deliver a nucleic acid encoding a particular gene into cells are receptor-mediated delivery vehicles. These take advantage of the selective uptake of macromolecules by receptor-mediated endocytosis in almost all eukaryotic cells. Because of the cell type-specific distribution of various receptors, the delivery can be highly specific.

Receptor-mediated gene targeting vehicles generally consist of two components: a cell receptor-specific ligand and a DNA-binding agent. Several ligands have been used for receptor-mediated gene transfer, e.g., asialoorosomucoid and transferrin. In addition, epidermal growth factor (EGF) has also been used to deliver genes to squamous carcinoma cells (Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP 0360257, specifically incorporated herein by reference).

In other embodiments, the delivery vehicle may comprise a ligand and a liposome. Thus, it is feasible that a nucleic acid encoding a particular gene also may be specifically delivered into a cell type such as lung, epithelial or tumor cells, by any number of receptor-ligand systems with or without liposomes. For example, EGF or other small molecules may be used as the receptor for

mediated delivery of a nucleic acid encoding a gene in many tumor cells that exhibit upregulation of EGF receptor (Basela, J. (2002) *J Clin Oncol* 20(9):2217-9). Also, antibodies to CD5 (CLL), CD22 (lymphoma), CD25 (T-cell leukemia) and MAA (melanoma) can similarly be used as targeting moieties.

In certain embodiments, gene transfer may more easily be performed under *ex vivo* conditions. *Ex vivo* gene therapy refers to the isolation of cells from an animal, the delivery of a nucleic acid into the cells *in vitro*, and then the return of the modified cells back into an animal. This may involve the surgical removal of tissue/organs from an animal or the primary culture of cells and tissues. See, e.g., Ahonen, M. *et al.* (2002) *Mol Ther* 5(6):705-15 and Kawai, K. *et al.* (2000) *Mol Urol* 4(2):43-6; U.S. Patent Nos. 6,395,712, 6,149,904, and 6,410,029, each of which is incorporated herein by reference.

Primary mammalian cell cultures may be prepared in various ways. In order for the cells to be kept viable while *in vitro* and in contact with the expression construct, the cells typically will maintain contact with the correct ratio of oxygen and carbon dioxide and nutrients and be protected from microbial contamination. Cell culture techniques are well known to those of skill in the art.

Examples of useful mammalian host cell lines are Vero and HeLa cells and cell lines of Chinese hamster ovary, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, NIH3T3, RIN and MDCK cells. In addition, a host cell strain may be chosen that modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and process the gene product in the manner desired. Such modifications (e.g., glycosylation) and processing (e.g., cleavage) of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to insure the correct modification and processing of the foreign protein expressed.

A number of selection systems may be used including, but not limited to, HSV thymidine kinase, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and adenine phosphoribosyltransferase genes, in tk-, hgprt- or aprt- cells, respectively. Also, anti-metabolite resistance can be used as the basis of selection for gpt, that confers resistance to mycophenolic acid; neo, that confers

resistance to the aminoglycoside G418; and hygro, that confers resistance to hygromycin.

From the foregoing, it can be seen how various objects and features of the invention are met.

Table 2

Sequences Provided In Support Of The Invention.

Description	SEQ. ID NO.
E-coil: Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys	1
K-coil: Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu	2
Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Cys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys	3
Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Cys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys	4
K-coil: KVSALKE	5
E-coil: EVSALEK	6
Jack Bean Urease MKLSPREVEKLGLHNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGE KTVAQLMCLGQHLLGRRQVLPAVPHLLNAVQVEATFPDGTKLVTVHDPISR ENGELQEALFGSLLPVPSLDKFAETKEDNRIPGEILCEDECLTLNIGRKAVILK VTSKGDRPIQVGSHYHFIEVNPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDC KSVTLVSIEGNKVIRGGNAIADGPVNETNLEAAMHAVRSKGFGHEEEKDAS EGFTKEDPNCPFNTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGDTNLLAEIEKDYALYG DECVFGGGKVIRDGMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIIDYTGIIKADIGIKDGLIA SIGKAGNPDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYEA ISSGITTLVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMRLMLQSTDDLPLNFGFTGKG SSSKPDELHEIIKAGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTDTLN EAGFVEHSIAAFKGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIIKVCGIKNVLPSSTNPTRPL TSNTIDEHLDMLMVCHHLDREIPEDLAFAHSRIRKKTIAAEDVLNDIGAISIISS DSQAMGRVGEVISRTWQTADKMKAQTGPLKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTIN PAIANGFSQYVGSVEVGKLADLVMWKPSFFGTKPEMVIKGGMVAWADIGD	7

PNASIPTPEPVKMRPMYGTLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLYGLNKRV EAVSNVRKLTKLDMKLNDALPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVPLSRN YFLF	

IV. Examples

The following examples further illustrate the invention described herein and are in no way intended to limit the scope of the invention.

A. Example 1

A1. Peptide Synthesis

Peptides were prepared by solid-phase synthesis methodology using conventional N-t-butyloxycarbonyl (t-Boc) chemistry. Peptides were cleaved from the resin by reaction with hydrogen fluoride (20 ml/g resin) containing 10% anisole and 2% 1,2-ethanedithiol for 1.5 h at 4°C. Crude peptides were washed with cold ether, and extracted from the resin with glacial acetic acid and freeze-dried. Synthetic peptide was purified by reversed-phase HPLC on a Zorbax semi-preparative C-8 column (250 x 10 mm I.D., 6.5-µm particle size, 300-Å pore size) with a linear AB gradient (ranging from 0.2 to 1.0% B/min) at a flow rate of 2 ml/min, where solvent A is aqueous 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) and solvent B is 0.05% TFA in acetonitrile. Homogeneity of the purified peptides was verified by analytical reversed phased-HPLC, amino acid analysis and MALDI mass spectrometry.

A2. Affinity Purification of Urease

The affinity column was prepared by reacting hydroxyurea to epoxy-activated Sepharose 6B (Amersham Biosciences). Remaining active groups were blocked using 1 M ethanolamine.

Purification was performed as follows. The column was equilibrated with PEB (0.02 M phosphate, 1 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0). A crude urease sample (Fig. 2) was applied (0.5 mg/ml in PEB, total 8 ml). The column was washed with 15 ml of PB (0.02 M phosphate, 1 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0). The column was then washed with 8 ml of each of the

following: PB + 0.1 M NaCl, PB + 0.5 M NaCl, and PB + 0.95 M NaCl. The urease was eluted with 8 ml of EB (0.2 M phosphate, 1 mM β-mercaptoethanol, pH 4.6), collecting 1 ml fractions. Fractions were checked by reading OD at 280nm (Fig. 3) and HPLC (C5 column) analysis. The column was stored in 0.01% NaN_3

B. Example 2 – Preparation of the Urease-Coil Conjugate

Urease coil conjugate was prepared by dissolving 10 mg of Jack bean Urease in 300 ul of 2mM phosphate buffer pH 7.2. Then 5 mg of the bifunctional cross-linker Sulfo-MBS was added to the solution and the mixture was slowly stirred for one hour at room temperature. The mixture was then dialyzed against 2mM phosphate buffer at pH 7.2 to remove excess linker.

K-coil or E-coil with a C-terminal cys linker (1.5 mg) was added to the linker-modified urease solution and slowly mixed for 3 hours at room temperature. The coil urease conjugate was dialyzed against fresh 2mM phosphate buffer at pH 7.2 overnight to remove unconjugated coil peptide. Dialyzed urease conjugate was lyophilized, then dissolved in 1 mL of 2mM phosphate buffer pH 7.2 and applied to sephadex G75 column for further purification. The void volume fractions, which contained the coil urease conjugate, were pooled, freeze-dried and stored at 4°C.

The purity of the conjugate and the ratio of the coil to urease in the preparation were determined by amino acid analysis and MALDI mass spectrometry using standard procedures.

C. Example 3 – Activity assay of Urease and Urease conjugate

The enzymatic activity of urease or urease conjugate was carried out in a coupled enzyme reaction with glutamate dehydrogenase (GLDH). The amount of NADH oxidized was determined by measuring the change in absorbance at 340 nm (Kaltwasser, H. and Schlegel, H.G., Anal. Biochem., 16, 132, 1966). The reagents used were: 0.10 M Potassium phosphate buffer, pH 7.6; 1.80 M Urea prepared in phosphate buffer; 0.025 M Adenosine-5'-diphosphate (ADP) (10.7 mg/ml) in buffer; 0.008 M NADH (5 mg/ml) in phosphate buffer; 0.025 M α-Ketoglutarate (3.7 mg/ml) in phosphate buffer; Glutamate dehydrogenase

(GLDH) solution, free from ammonium ions; 50 U/ml phosphate buffer prepared fresh prior to assay. Urease solution was prepared by dissolving in phosphate buffer to yield a concentration of 0.1-0.5 U/ml. This solution was prepared fresh prior to assay.

Assay was initiated by adding the following 2.0 mL of Phosphate buffer 2.40 ml, 0.10 ml each of urea, ADP, NADH, GLDH and α-Ketoglutarate in a cuvette. The spectrophotometer was adjusted to 340 nm and 25°C. The cuvette with the added ingredients was placed in the spectrophotometer at 25°C for 5 minutes to attain temperature equilibration and then establish blank rate, if any, at 340 nm.

To initiate the enzymatic reaction 0.1 ml of the urease solution was added to the cuvette. The changes in the absorbance at 340 nm were recorded for 15 min. Enzyme activity was correlated with a decrease in absorbance at 340nm per min.

D. Example 4 – Preparation of Coil Antibody Conjugate

Materials include: (1) Rat Anti-hEGFR IgG2a (Serotec), 200 µg/0.2 ml (i.e. 1 mg/ml); (2) E-coil (N-linker); (3) Sodium m-periodate (Pierce); and (4)Bifunctional crosslinker, KMUH (Pierce).

Functional modification of E-coil was performed by performing the following steps:

a. Dissolve KMUH in DMSO to prepare a 10 mg/ml solution (2.5 mg in 250 µl of DMSO).
b. Dissolve E-coil in PB (~2 mg in 392 µl of 10 mM PB, pH 7.4 + 4 µl of TCEP, 100 mM stock)
c. Add 1 µl of Tris (2 M) to neutralize the E-coil solution
d. Add E-coil solution to the KMUH solution and incubate at R.T. for 2 hr
e. Keep solution at 4°C overnight
f. Next morning, centrifuge at 12000 rpm for 5 min. to remove insoluble precipitate.
g. Remove KMUH and DMSO on a C8 HPLC column (0-20% acetonitrile/ H_2O with 0.05% TFA) and collect all peptide fractions (75% acetonitrile).

g. Lyophilize the peptide fractions and check by MS.

The antibody was oxidized by the following steps:

a. For each 2 mg of antibody, weigh 20 mg of periodate in an amber vial.

b. Add 2 ml of PBS, pH 7.2 and 2 ml of stock antibody to the vial (final [antibody] is 0.5 mg/ml) and gently swirl until the periodate powder was dissolved.

c. Incubate at room temp. for 30 min.

d. Remove periodate by dialyzing 3 times vs 100 mM acetate buffer, pH 5.5.

Conjugation was performed by the following steps:

a. Concentrate oxidized antibody (~2 mg in 4 ml) using Millipore Ultrafree Filter units (30k MWc/o).

b. Add 75 µl of the functionalized E-coil solution (4 µg/µl ddH_2O) to half of the oxidized antibody solution (containing ~ 0.75 mg of antibody in acetate buffer, pH 5.5).

c. Incubate at room temp. for 2 hr with shaking.

d. Purify the antibody mixture using a Protein G column (See Fig. 4).

e. Compare and analysis of sample (before and after affinity purification).

E. Example 5 – Biacore Analysis of Coil Urease Conjugate and Coil Antibody Conjugate

Cysteine containing K-coil peptide or the E-coil peptide was covalent coupled to the Pioneer B1 biosensor chip according to the manufacturer suggested protocol. Briefly, the dextran surface of the sensor chip was first activated with NHS/EDC (15 ul) followed by addition of PDEA (20 ul). K-coil (or E-coil (50 µg/ml) in 10 mM sodium acetate buffer pH 4.3 was injected and allowed to react to give a surface density of approximately 200-400 RU. Remaining activated groups were then blocked by injection (10 ul) of a 50 mM cysteine, 1 M NaCl, 0.1 M formate, pH 4.3 deactivation solution.

226

Kinetic experiments were performed on a BIAcore3000 instrument at 25°C. Each biosensor run consisted of (1) a 600s sample injection phase (coil urease or coil antibody), (2) a 600s dissociation phase, and (3) a 2x 15s regeneration phase (6M guanidine HCl). A flow rate of 5 ul/min was maintained throughout the cycle. PBS was used as a buffer. The SPR signal was recorded in real time with sampling at every 0.5 s and plotted as RU versus time (sensorgram). Each sensorgram obtained was corrected for bulk refractive index changes by subtracting the corresponding sample injection cycle on a blank cell surface

F. Example 6 -- Animal Studies

Athymic nu/nu female mice with human mammary gland adenocarcinoma xenografts were used for testing. Animals selected were generally 5 to 7 weeks of age, and their body weights at treatment commencement range from approximately 15 to 28 grams.

MCF-cells were used to generate the xenografts. The cells were grown in MEM media supplemented with Penicillin/Streptomycin 5000U/ml, L-glutamine 200mM, Sodium pyruvate, nonessential amino acids, vitamins, and 10% FBS; The cell incubator was maintained with 5% C02, 37.50C, and 80% humidity. The cells were harvested with 0.25%(w/v) trypsin-0.03%(w/v) EDTA solution. Approximately 1 x 10^6 cells in 100 uL was injected subcutaneously to the right flank of each mouse.

Tumor growth was allowed to proceed for about 6-8 days allowing the size of the tumor to reach at least 2 – 4 mm in diameter. Doses were administered via intratumor injection. The dose volume for each animal was 50 µL. Each solid tumor was injected with the given dose of test article in a "fanning fashion". Tumor volumes were taken by external caliper measurements. Body weights were taken at the start of the trial and at time of sacrifice.

Results, as shown in Table 3 below, show that tumors were not perceptible 24 hours following treatment.

Table 3

Successful Treatment of Tumors in Mice

Mouse	1	2	3	4	5	6
MCF cell	0.8 x10^6	0.8 x10^6	0.8 x10^6	0.8 x10^6	1.3x10^6	0.8 x10^6

injected						
Tumor size before treatment	22.5 mm^3	33.5 mm^3	15.6 mm^3	31.1 mm^3	32.5 mm^3	8.2 mm^3
Urease amount injected	50U/50uL	50U/50uL	50U/50uL	50U/50uL	40U/50uL	10U/50uL
Tumor size post injection (24 hours)	not perceptible	not perceptible	not perceptible	not perceptible	not perceptible	not perceptible

Although the invention has been described with respect to particular embodiments, it will be apparent to those skilled in the art that various changes and modifications can be made without departing from the invention.

IT IS CLAIMED:

1. A pharmaceutical composition comprising a urease enzyme in a pharmaceutical carrier for use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject.

2. The composition of claim 1, which includes a chemical entity effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells, when the composition is administered to the subject.

3. The composition of claim 1, wherein said chemical entity includes a hydrophilic polymer (i) conjugated to the urease, (ii) selected from the group consisting of polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, polyvinylmethylether, polyhydroxypropyl methacrylamide, polyhydroxypropyl methacrylate, polyhydroxyethyl acrylate, polymethacrylamide, polydimethylacrylamide, polymethyloxazoline, polyethyloxazoline, polyhydroxyethyloxazolione, polyhydroxypropyoxazoline, polyaspartamide, and hydrophilic cellulose derivatives, and (iii) present in an amount effective to extend the blood circulation time or reduce the antigenicity of said composition relative to native urease.

4. The composition of claim 3, wherein said hydrophilic polymer is polyethylene glycol having a molecular weight between about 1,000 and 10,000 daltons.

5. The composition of claim 2 or 3, wherein said chemical entity is a targeting moiety attached to said urease and selected from the group consisting of an anti-tumor antigen antibody, anti-hCG antibody, and a ligand capable of binding specifically to cancer-cell surface receptors.

6. The composition of claim 5, wherein said targeting moiety is a polypeptide, and said composition is a fusion protein of the targeting moiety and urease enzyme.

7. The composition of claim 5, wherein said urease includes, at its C- or N-terminus, a first coil-forming peptide characterized by a selected charge and an ability to interact with a second, oppositely charged coil-forming peptide to form a stable α-helical coiled-coil heterodimer; and said chemical entity includes a targeting moiety which includes said second coil-forming peptide.

8. The composition of claim 2, wherein said chemical entity includes vesicles having urease enzyme in entrapped form.

9. The composition of claim 8, wherein said vesicles are liposomes which are long-circulating by virtue of an exterior coating of polyethylene glycol chains, and sized to extravasate into tumor regions, when the composition is administered intravenously.

10. The composition of claim 8, wherein said vesicles are liposomes having surface bound targeting moieties selected from the group consisting of an anti-tumor antigen antibody, anti-hCG antibody, and ligands capable of binding specifically to cancer-cell surface receptors.

11. The composition of claim 2, wherein said chemical entity includes a urease inhibitor associated therewith, in an amount sufficient to inhibit the activity of said enzyme.

12. The composition of claim 1, wherein said urease is a plant or bacterial urease.

13. The composition of claim 1, further comprising an agent selected from the group consisting urea, a therapeutically active anti-tumor agent and an imaging agent.

14. The composition of claim 13, which further includes vesicles containing the urease and agent in entrapped form.

15. The composition of claim 1, further comprising a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.

16. The composition of claim 15, wherein the the anti-tumor compound is selected from the group consisting of doxorubicin, daunorubicin, mitoxanthrone, epirubicin, mitomycin, bleomycin, vinca alkaloids such as vinblastine and vincristine, alkylating agents such as cyclophosphamide and mechlorethamine hydrochloride, and antrineoplastic purine and pyrimidine derivatives.

17. The use of urease enzyme in the manufacture of a medicament for treating or diagnosing cancer in a mammalian subject.

18. The use of claim 17, in the manufacture of a medicament for treating a solid tumor in a mammalian subject.

19. The use of claim 17, in the manufacture of a medicament for treating a solid tumor in a subject who is being treated with a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.

20. The use of claim 17, in the manufacture of a medicament for use in generating diagnostic information about the pH within a solid tumor region in a subject.

21. A gene therapy composition for use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject, comprising

a targeting vector effective, when administered to the subject, of selectively transfecting cancer cells, and

carried in said vector, a recombinant nucleic acid sequence effective to produce a urease mRNA in transfected cancer cells.

22. The composition of claim 21, wherein said vector is an adenovirus.

23. The gene therapy composition of claim 21, wherein said sequence encodes urease and a secretory leader sequence effective to promote secretion of the urease from the transfected cancer cells.



FIG. 1A



FIG. 1B

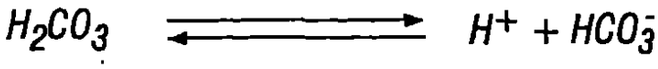


FIG. 1C

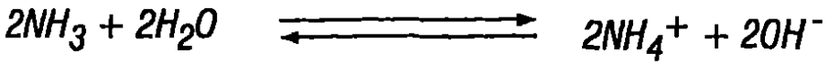


FIG. 1D

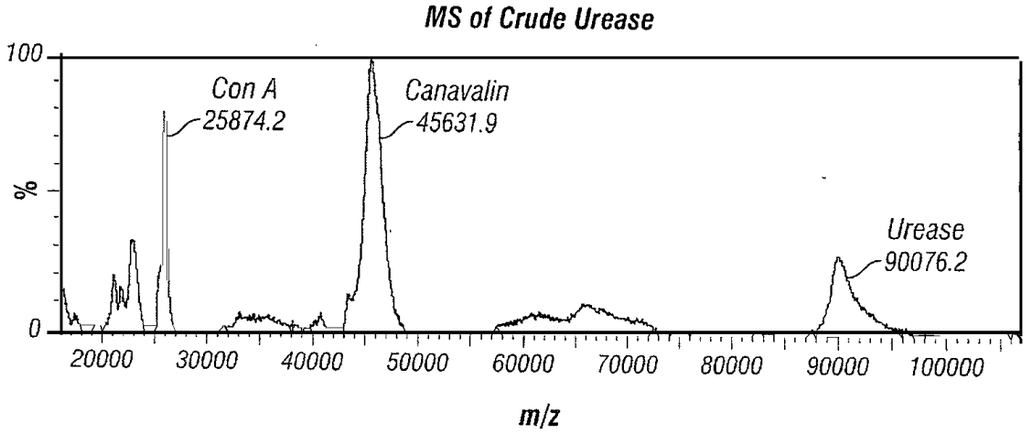

MS of Crude Urease
100
%
0
Con A
25874.2
Canavalin
45631.9
Urease
90076.2
20000
30000
40000
50000
60000
70000
80000
90000
100000
m/z

FIG. 2

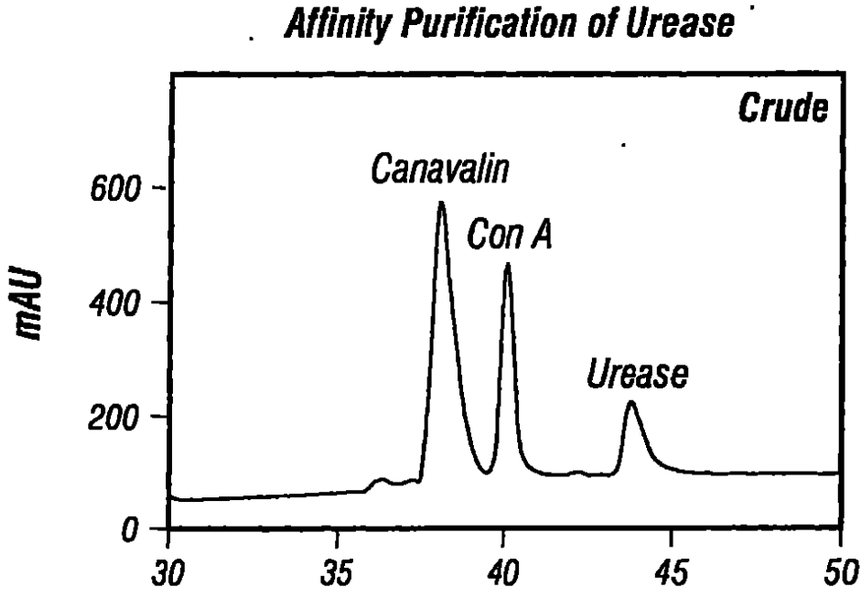

Affinity Purification of Urease
Crude
Canavalin
Con A
Urease
mAU
600
400
200
0
30
35
40
45
50

FIG. 3A

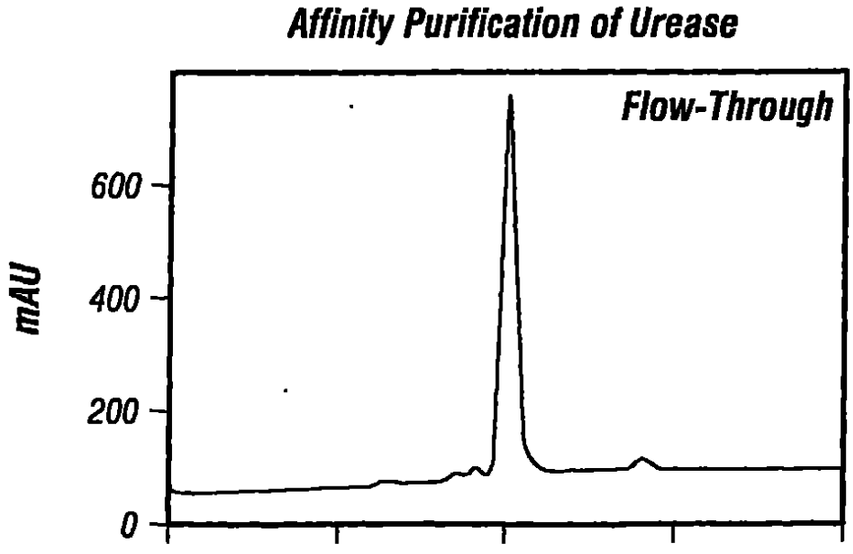

Affinity Purification of Urease
Flow-Through
mAU
600
400
200
0

FIG. 3B

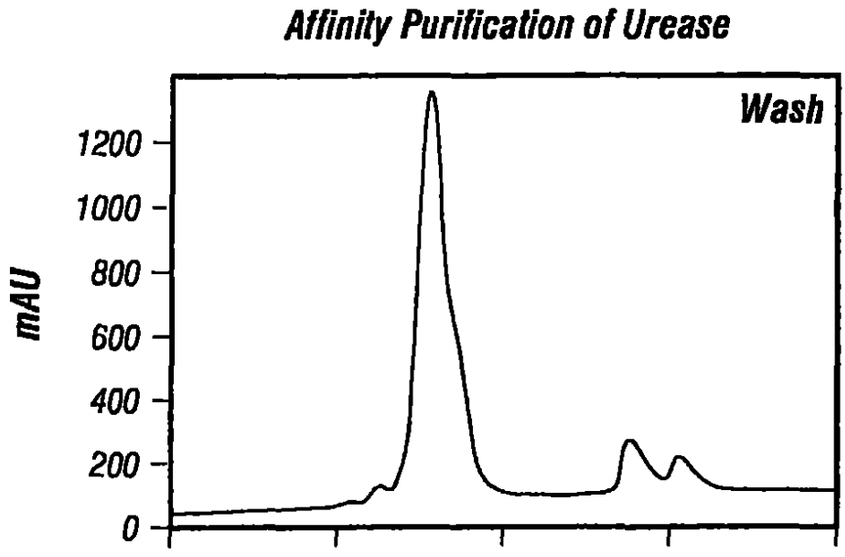

Affinity Purification of Urease
Wash
1200
1000
800
600
400
200
0
mAU

FIG. 3C

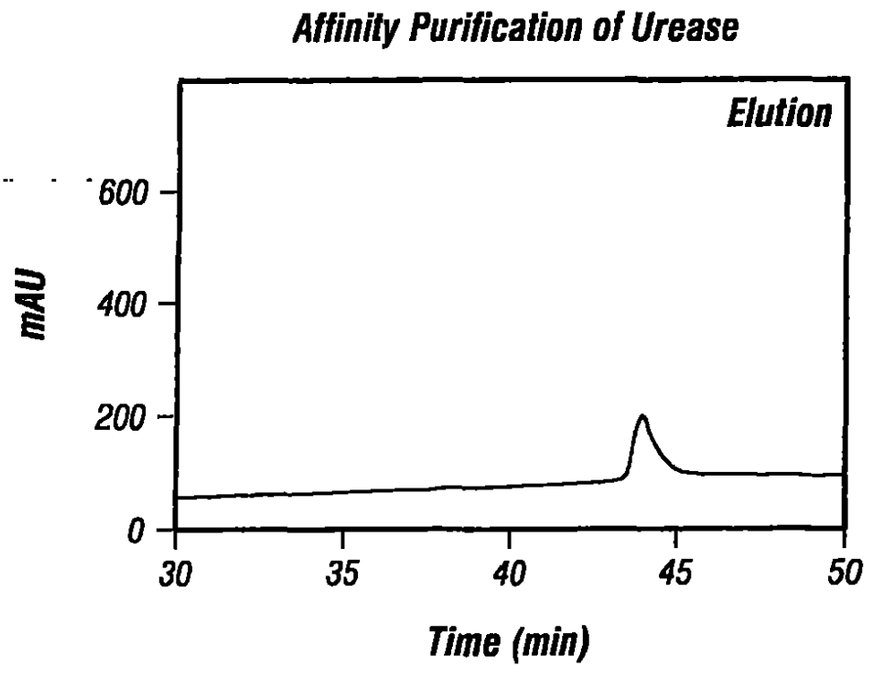

Affinity Purification of Urease
Elution
600
400
200
0
mAU
30
35
40
45
50
Time (min)

FIG. 3D

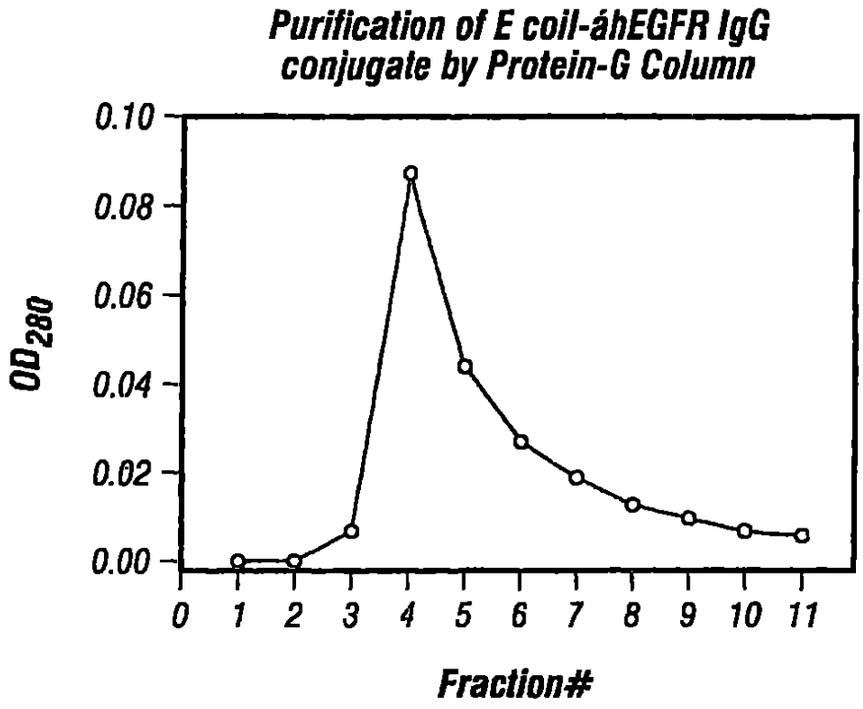

Purification of E coil-áhEGFR IgG
conjugate by Protein-G Column
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
OD280
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Fraction#

FIG. 4

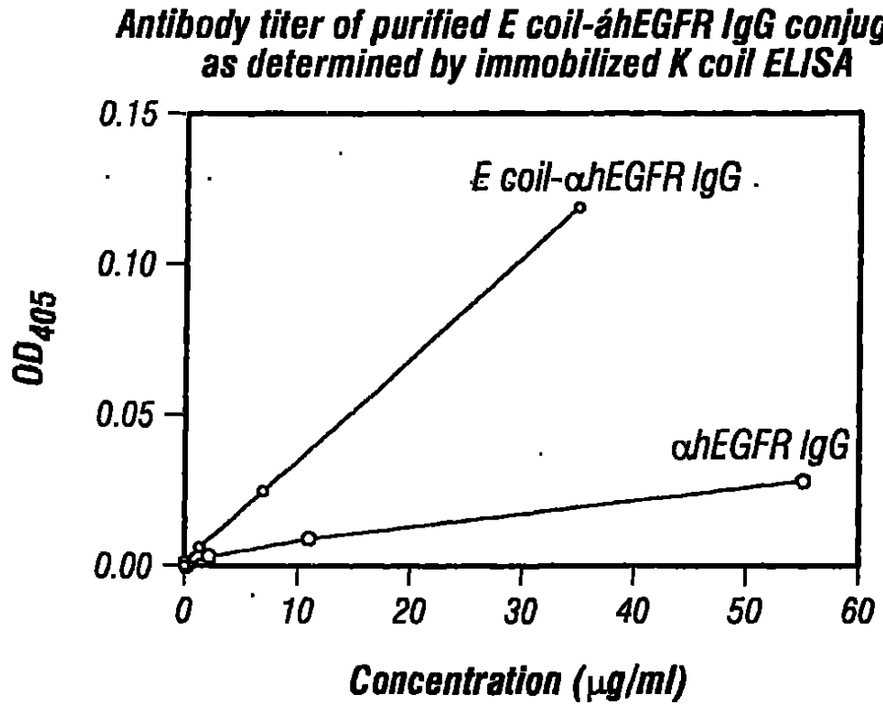

Antibody titer of purified E coil-áhEGFR IgG conjugate
as determined by immobilized K coil ELISA
0.15
0.10
0.05
0.00
OD405
E coil-αhEGFR IgG
αhEGFR IgG
0 10 20 30 40 50 60
Concentration (μg/ml)

FIG. 5

SEQUENCE LISTING

<110> Helix BioPharma Corp.

<120> Method and Composition for Inhibiting Cancer Cell Growth

<130> 08-898277WO

<140> n/a
<141> 2003-07-16

<150> US 60/397,244
<151> 2002-07-18

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> E-coil forming peptide

<400> 1
Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15
Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala
20 25 30
Leu Glu Lys
35

<210> 2
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> K-coil forming peptide

<400> 2
Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15
Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala
20 25 30
Leu Lys Glu
35

<210> 3
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> coil forming peptide

<400> 3
Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

85 90 95
His Asp Pro Ile Ser Arg Glu Asn Gly Glu Leu Gln Glu Ala Leu Phe
100 105 110
Gly Ser Leu Leu Pro Val Pro Ser Leu Asp Lys Phe Ala Glu Thr Lys
115 120 125
Glu Asp Asn Arg Ile Pro Gly Glu Ile Leu Cys Glu Asp Glu Cys Leu
130 135 140
Thr Leu Asn Ile Gly Arg Lys Ala Val Ile Leu Lys Val Thr Ser Lys
145 150 155 160
Gly Asp Arg Pro Ile Gln Val Gly Ser His Tyr His Phe Ile Glu Val
165 170 175
Asn Pro Tyr Leu Thr Phe Asp Arg Arg Lys Ala Tyr Gly Met Arg Leu
180 185 190
Asn Ile Ala Ala Gly Thr Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Asp Cys Lys
195 200 205
Ser Val Thr Leu Val Ser Ile Glu Gly Asn Lys Val Ile Arg Gly Gly
210 215 220
Asn Ala Ile Ala Asp Gly Pro Val Asn Glu Thr Asn Leu Glu Ala Ala
225 230 235 240
Met His Ala Val Arg Ser Lys Gly Phe Gly His Glu Glu Glu Lys Asp
245 250 255
Ala Ser Glu Gly Phe Thr Lys Glu Asp Pro Asn Cys Pro Phe Asn Thr
260 265 270
Phe Ile His Arg Lys Glu Tyr Ala Asn Lys Tyr Gly Pro Thr Thr Gly
275 280 285
Asp Lys Ile Arg Leu Gly Asp Thr Asn Leu Leu Ala Glu Ile Glu Lys
290 295 300
Asp Tyr Ala Leu Tyr Gly Asp Glu Cys Val Phe Gly Gly Gly Lys Val
305 310 315 320
Ile Arg Asp Gly Met Gly Gln Ser Cys Gly His Pro Pro Ala Ile Ser
325 330 335
Leu Asp Thr Val Ile Thr Asn Ala Val Ile Ile Asp Tyr Thr Gly Ile
340 345 350
Ile Lys Ala Asp Ile Gly Ile Lys Asp Gly Leu Ile Ala Ser Ile Gly
355 360 365
Lys Ala Gly Asn Pro Asp Ile Met Asn Gly Val Phe Ser Asn Met Ile
370 375 380
Ile Gly Ala Asn Thr Glu Val Ile Ala Gly Glu Gly Leu Ile Val Thr
385 390 395 400
Ala Gly Ala Ile Asp Cys His Val His Tyr Ile Cys Pro Gln Leu Val
405 410 415
Tyr Glu Ala Ile Ser Ser Gly Ile Thr Thr Leu Val Gly Gly Gly Thr
420 425 430
Gly Pro Ala Ala Gly Thr Arg Ala Thr Thr Cys Thr Pro Ser Pro Thr
435 440 445
Gln Met Arg Leu Met Leu Gln Ser Thr Asp Asp Leu Pro Leu Asn Phe
450 455 460
Gly Phe Thr Gly Lys Gly Ser Ser Ser Lys Pro Asp Glu Leu His Glu
465 470 475 480
Ile Ile Lys Ala Gly Ala Met Gly Leu Lys Leu His Glu Asp Trp Gly
485 490 495
Ser Thr Pro Ala Ala Ile Asp Asn Cys Leu Thr Ile Ala Glu His His
500 505 510
Asp Ile Gln Ile Asn Ile His Thr Asp Thr Leu Asn Glu Ala Gly Phe
515 520 525
Val Glu His Ser Ile Ala Ala Phe Lys Gly Arg Thr Ile His Thr Tyr
530 535 540
His Ser Glu Gly Ala Gly Gly Gly His Ala Pro Asp Ile Ile Lys Val
545 550 555 560
Cys Gly Ile Lys Asn Val Leu Pro Ser Ser Thr Asn Pro Thr Arg Pro
565 570 575
Leu Thr Ser Asn Thr Ile Asp Glu His Leu Asp Met Leu Met Val Cys

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED
Perkins
OCT 13 2004
PCT GOWLINGS

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Erratt, Judy A.
GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP
Suite 2600
160 Elgin Street
Ottawa, Ontario K1P 1C3
CANADA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	06.10.2004

Applicant's or agent's file reference	IMPORTANT NOTIFICATION
08-898277WO	

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/CA 03/01061	16.07.2003	18.07.2002

Applicant
HELIX BIOPHARMA CORP.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the International preliminary examining authority:	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Pfitzner, G Tel. +49 89 2399-8032

Form PCT/IPEA/416 (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 08-898277WO	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/CA 03/01061	International filing date *(day/month/year)* 16.07.2003	Priority date *(day/month/year)* 18.07.2002
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A61K38/50		
Applicant HELIX BIOPHARMA CORP.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

   ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

   These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

   - I ☒ Basis of the opinion
   - II ☐ Priority
   - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
   - IV ☐ Lack of unity of invention
   - V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
   - VI ☐ Certain documents cited
   - VII ☐ Certain defects in the international application
   - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
28.01.2004	06.10.2004
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Böhmerova, E Telephone No. +49 89 2399-7859

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/CA 03/01061

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17))*:

Description, Pages

1-78 as originally filed

Claims, Numbers

1-22 filed with telefax on 04.08.2004

Drawings, Sheets

1/5-5/5 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

   These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

   ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).

   ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

   ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

   ☒ contained in the international application in written form.

   ☒ filed together with the international application in computer readable form.

   ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

   ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

   ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

   ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

   ☐ the description, pages:

   ☐ the claims, Nos.:

   ☐ the drawings, sheets:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT International application No. PCT/CA 03/01061

5. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

   (Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

   see separate sheet

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	-
	No:	Claims	1,17,21
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	-
	No:	Claims	1,17,21
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1,17,21
	No:	Claims	-

2. Citations and explanations

   see separate sheet

Re Item I
Basis of the report

The amendments filed with the letter dated 04.08.2004 introduce subject-matter which extends beyond the content of the application as filed, contrary to Article 34(2)(b) PCT. The amendments concerned are the following:

New set of the claims 1-22 with independent claims 1, 16,20 has been filed. New independent claims 1 and 16 are directed to a pharmaceutical composition comprising -
a urease enzyme;
- a chemical entity attached to the urease enzyme and being effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells when the composition is administered to the subject; and
- a pharmaceutical carrier;
and the second medical use of said composition, resp..

In the original claims, the composition was defined as comprising a urease enzyme and including a chemical entity effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells when the composition is administered to the subject (see original claims 1 and 2). There is no general disclosure in the application as originally filed teaching that any chemical entity is to be attached to the urease enzyme. Original dependent claim 5 defines that the chemical entity is a targeting moiety attached to said urease, however this teaching is restricted to said targeting moiety as a specific embodiment of the chemical entity and cannot be generalised to any chemical entity. If such generalisation was accepted, the new independent claims 1 and 16 would include any chemical entity attached to the urease enzyme, including for example vesicles (see new claims 7-9). However, there is no disclosure of vesicles attached to the urease enzyme in the application as originally filed.

The above amendments introduce subject-matter which was not disclosed in the application as originally filed. Consequently, no opinion on novelty, inventiveness and industrial applicability of new claims 1-22 will be provided. The following opinion is based on claims 1-23 as originally filed.

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Cited documents

Reference is made to the following documents:
D1: WO 95 22987 A (ORAVAX INC) 31 August 1995
D2: US-B1-6 248 330 (SUERBAUM SEBASTIEN ET AL) 19 June 2001
D3: US-A-6 126 938 (QUENTIN-MILLET MARIE-JOSE ET AL) 3 October 2000
D4: ZIMBER A ET AL: 'EFFECT OF UREASE INJECTIONS ON EHRLICH ASCITES TUMOR GROWTH IN MICE' PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 139, no. 1, 1972, pages 143-149

Unless indicated otherwise reference is made to the passages considered relevant in the search report.

Novelty

Subject-matter of independent claims 1,17,21 is considered to lack novelty under Art. 33(1) and (2) PCT for the following reasons:

Claim 1

Present claim 1 is directed to a pharmaceutical composition comprising a urease enzyme for the use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject which represent so-called first medical use formate. It is to be stressed that in such case, the intended medical application (inhibition of growth of cancer cells) is not a relevant feature which could establish novelty of the subject-matter of such claim over the prior art teaching any medical use of the same active compound.

D1-D4 all disclose pharmaceutical compositions comprising urease and medical uses thereof. D1 discloses the use of urease from *Helicobacter pylori* for the treatment and prevention of gastroduedenal diseases including low grade MALT lymphomas. D2 discloses a vaccine inducing protective antibodies against *Helicobacter pylori* comprising urease and excipients, such as cellulose derivatives or PEG400.

D3 discloses a pharmaceutical composition for inducing immune response comprising urease entrapped in liposomes. D4 teaches that injection of jack bean urease reduces size of Ehrlich ascites tumor in mice. The above disclosure of D1-D4 anticipates novelty of present claim 1.

Claim 17

Independent claim 17 is directed to the use of urease enzyme in the manufacture of a medicament for treating or diagnosing cancer in a mammalian subject. Novelty of the subject-matter of claim 17 is anticipated by the above disclosure of D1 and D4.

Claim 21

Independent claim 21 is directed to a gene therapy composition comprising a targeting vector effective, when administered to the subject. of selectively transfecting cancer cells, and carried in said vector, a recombinant nucleic acid sequence effective to produce a urease mRNA in transfected cancer cells.

As claim 21 is in the form of the so-called first medical use, the intended medical application of the composition (inhibition of growth of cancer cells in a mammalian subject) is not a relevant feature which could establish novelty of the subject-matter of the claim over the prior art disclosing any medical use of the same composition.

As already stated in the search report, an attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved which renders the subject-matter of claim 21 unclear under Article 6 PCT . Product features necessary to achieve said effect should be defined in the claim.

D1 discloses a composition for the treatment of a gastroduodenal diseases in a mammal comprising recombinant live vector expressing *Helicobacter* urease peptide, the vector being preferably an adenovirus. Although D1 does not disclose that said vector selectively transfects cancer cells, D1 discloses all the relevant product features of the composition according to claims 21 (see the previous paragraph), the disclosure thereof is consequently considered as anticipating novelty of this claim.

Inventiveness

As the subject-matter of claim 1, 17, 21 is considered as lacking novelty, no inventiveness can be acknowledged at this stage.

Industrial applicability

Subject-matter of independent claims 1,17,21 is considered to be industrially applicable under Art. 33(1) and (4) PCT.

IT IS CLAIMED:

1. A pharmaceutical composition comprising:

a urease enzyme;

a chemical entity attached to the urease enzyme and being effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells when the composition is administered to the subject; and

a pharmaceutical carrier.

2. The composition of claim 1, wherein said chemical entity includes a hydrophilic polymer (i) conjugated to the urease, (ii) selected from the group consisting of polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, polyvinylmethylether, polyhydroxypropyl methacrylamide, polyhydroxypropyl methacrylate, polyhydroxyethyl acrylate, polymethacrylamide, polydimethylacrylamide, polymethyloxazoline, polyethyloxazoline, polyhydroxyethyloxazoline, polyhydroxypropyoxazoline, polyaspartamide, and hydrophilic cellulose derivatives, and (iii) present in an amount effective to extend the blood circulation time or reduce the antigenicity of said composition relative to native urease.

3. The composition of claim 2, wherein said hydrophilic polymer is polyethylene glycol having a molecular weight between about 1,000 and 10,000 daltons.

4. The composition of claim 1 or 2, wherein said chemical entity is a targeting moiety attached to said urease and selected from the group consisting of an anti-tumor antigen antibody, anti-hCG antibody, and a ligand capable of binding specifically to cancer-cell surface receptors.

5. The composition of claim 4, wherein said targeting moiety is a polypeptide, and said composition is a fusion protein of the targeting moiety and urease enzyme.

AMENDED SHEET

246
245

6. The composition of claim 4, wherein said urease includes, at its C- or N-terminus, a first coil-forming peptide characterized by a selected charge and an ability to interact with a second, oppositely charged coil-forming peptide to form a stable α-helical coiled-coil heterodimer, and said chemical entity includes a targeting moiety which includes said second coil-forming peptide.

7. The composition of claim 1, wherein said chemical entity includes vesicles having urease enzyme in entrapped form.

8. The composition of claim 7, wherein said vesicles are liposomes which are long-circulating by virtue of an exterior coating of polyethylene glycol chains, and sized to extravasate into tumor regions, when the composition is administered intravenously.

9. The composition of claim 7, wherein said vesicles are liposomes having surface bound targeting moieties selected from the group consisting of an anti-tumor antigen antibody, anti-hCG antibody, and ligands capable of binding specifically to cancer-cell surface receptors.

10. The composition of claim 1, wherein said chemical entity includes a urease inhibitor associated therewith, in an amount sufficient to inhibit the activity of said enzyme.

11. The composition of claim 1, wherein said urease is a plant or bacterial urease.

12. The composition of claim 1, further comprising an agent selected from the group consisting urea, a therapeutically active anti-tumor agent and an imaging agent.

13. The composition of claim 12, which further includes vesicles containing the urease and agent in entrapped form.

AMENDED SHEET

246

14. The composition of claim 1, further comprising a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.

15. The composition of claim 14, wherein the anti-tumor compound is selected from the group consisting of doxorubicin, daunorubicin, mitoxanthrone, epirubicin, mitomycin, bleomycin, vinca alkaloids such as vinblastine and vincristine, alkylating agents such as cyclophosphamide and mechlorethamine hydrochloride, and antineoplastic purine and pyrimidine derivatives.

16. The use of a composition comprising a urease enzyme and a chemical entity attached to the urease enzyme and being effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells when the composition is administered to the subject in the manufacture of a medicament for treating or diagnosing cancer in a mammalian subject.

17. The use of claim 16, in the manufacture of a medicament for treating a solid tumor in a mammalian subject.

18. The use of claim 16, in the manufacture of a medicament for treating a solid tumor in a subject who is being treated with a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.

19. The use of claim 16, in the manufacture of a medicament for use in generating diagnostic information about the pH within a solid tumor region in a subject.

20. Use of a gene therapy composition for manufacture of a medicament for inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject, said composition comprising

a targeting vector effective, when administered to the subject, of selectively transfecting cancer cells, and

carried in said vector, a recombinant nucleic acid sequence effective to produce a urease mRNA in transfected cancer cells.

21. The use of claim 20, wherein said vector is an adenovirus.

22. The use of claim 20, wherein said sequence encodes urease and a secretory leader sequence effective to promote secretion of the urease from the transfected cancer cells.

AMENDED SHEET

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende:

una enzima ureasa;

una entidad química unida a la enzima ureasa y que es efectiva para mejorar la liberación de la enzima a células cancerosas cuando la composición es administrada al sujeto; y

un vehículo o excipiente farmacéutico.

2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la entidad química incluye un polímero hidrofílico (i) conjugado con la ureasa, (ii) seleccionado del grupo que consiste de polietilen glicol, polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polihidroxipropil metacrilamida, metacrilato de polihidroxipropilo, acrilato de polihidroxietilo, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxietiloxazolina, polihidroxipropioxazolina, poliaspartamida y derivados hidrofílicos de células, y (iii) presente en una cantidad efectiva para extender el tiempo de circulación en la sangre o reducir la antigenicidad de la composición en relación a la ureasa nativa.

3. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el polímero

hidrofílico es polietilen glicol que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1,000 y 10,000 daltones.

4. La composición de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la entidad química es una entidad que elige el blanco unida a la ureasa y seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo de antígeno antitumoral, anticuerpo hCG, y un ligando capaz de unirse específicamente a receptores de la superficie de células cancerosas.

5. La composición de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la entidad que elige el blanco es un polipéptido, y la composición es una proteína de fusión de la entidad que elige el blanco y enzima ureasa.

6. La composición de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la ureasa incluye, en su C- o N-terminal, un primer péptido que forma un espiral, caracterizada por una carga seleccionada y una capacidad para interactuar con un segundo péptido formador de espiral con carga opuesta para formar un heterodímero espiral enrollado α-helicoidal estable; y la entidad química incluye una entidad que elige el blanco que incluye el segundo péptido formador de espiral.

7. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque entidad química

incluye vesículas que tienen enzima ureasa en forma atrapada.

8. La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque las vesículas son liposomas que circulan durante mucho tiempo en virtud de un recubrimiento exterior de cadenas de polietilen glicol, y dimensionadas para extravasarse a regiones tumorales, cuando la composición es administrada intravenosamente.

9. La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque las vesículas son liposomas que tienen entidades que eligen el blanco unidas a la superficie, seleccionadas del grupo que consiste de un anticuerpo de antígeno anti-tumoral, anticuerpo anti-hCG, y ligandos capaces de unirse específicamente a receptores de la superficie de células cancerosas.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la entidad química incluye un inhibidor de ureasa asociado con ésta, en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de la enzima.

11. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la ureasa es una ureasa de planta o bacteriana.

12. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste de urea, un agente

antitumoral terapéuticamente activo y un agente formador de imágenes.

13. La composición de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque incluye además vesículas que contienen la ureasa y agente en forma atrapada.

14. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además un compuesto antitumoral débilmente básico cuya efectividad es reducida por un gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido.

15. La composición de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque el compuesto antitumoral es seleccionado del grupo que consiste de doxorrubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, epirrubicina, mitomicina, bleomicina, alcaloides de vinca como la vinblastina y vincristina, agentes alquilantes como la ciclofosfamida y clorhidrato de mecloretamina, y derivados antineoplásicos de purina y pirimidina.

16. El uso de una composición que comprende una enzima ureasa y una entidad química unida a la enzima ureasa y que es efectiva para mejorar la liberación de la enzima a células cancerosas cuando la composición es administrada al sujeto en la elaboración de un medicamento para tratar o diagnosticar el cáncer en un sujeto mamífero.

17. El uso de conformidad con la reivindicación 16, en la elaboración de un medicamento para tratar un tumor sólido en un sujeto mamífero.

18. El uso de conformidad con la reivindicación 16, en la elaboración de un medicamento para tratar un tumor sólido en un sujeto que está siendo tratado con un compuesto antitumoral débilmente básico cuya efectividad es reducida por un gradiente de pH intracelular más alto/extracelular más bajo en un tumor sólido.

19. El uso de conformidad con la reivindicación 16, en la elaboración de un medicamento para usarse en la generación de información de diagnóstico acerca del pH en una región de tumor sólido en un sujeto.

20. El uso de una composición de terapia genética para la elaboración de un medicamento para inhibir el crecimiento de células cancerosas en un sujeto mamífero, la composición comprende

un vector que elige el blanco efectivo, cuando se administra a un sujeto, de células cancerosas que se transfectan selectivamente, y

conteniendo el vector, una secuencia de ácido nucleico recombinante efectiva para producir un ARNm de ureasa en células cancerosas transfectadas.

21. El uso de conformidad con la reivindicación 20,

donde el vector es un adenovirus.

22. El uso de conformidad con la reivindicación 20, donde la secuencia codifica para ureasa y una secuencia líder secretora efectiva para promover la secreción de ureasa de células cancerosas transfectadas.

254

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference *(if desired) (12 characters maximum)* 08-898277WO

Box No. I TITLE OF INVENTION

Method And Composition For Inhibiting Cancer Cell Growth

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

Helix BioPharma Corp.
3-305 Industrial Parkway South
Aurora, Ontario
CANADA L4G 6X7

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: CA

State *(that is, country)* of residence: CA

This person is applicant for the purposes of: ☒ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

CHAO, Heman
20 Gilbank Drive
Aurora, Ontario
CANADA L4G 5G4

This person is:
☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☒ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

ERRATT, Judy A.; SECHLEY, Konrad A.; COLTON, Ian; SCHROEDER, Hans; SMITH, Dallas F.; WADA, Ikuko
Gowling Lafleur Henderson LLP
160 Elgin Street, Suite 2600
Ottawa, Ontario K1P 1C3
CANADA

Telephone No. 613 - 233-1781

Facsimile No. 613 - 563-9869

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

WONG, Wah
17915 77th Ave.
Edmonton, Alberta
CANADA T5T 2S1

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☒ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

SEGAL, Donald
Rural Route 3
Stouffville, Ontario
CANADA L4A 7X4

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☒ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

McELROY, Jerry
26 High Oak Trail
Richmond Hill, Ontario
CANADA L4E 3L0

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☒ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

DOCHERTY, John
65 Ostick St.
Aurora, Ontario
CANADA L4G 7K4

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☒ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

DICKSTEIN, Jodi
18 Cornell Park Ave.
Markham, Ontario
CANADA L6B 1B5

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☒ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES *Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.*

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

- ☒ AP **ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....
- ☒ EA **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ EP **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, SI Slovenia, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ OA **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

National Patent *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*:

☒ AE United Arab Emirates	☒ GM Gambia	☒ NZ New Zealand
☒ AG Antigua and Barbuda	☒ HR Croatia	☒ OM Oman
☒ AL Albania	☒ HU Hungary	☒ PH Philippines
☒ AM Armenia	☒ ID Indonesia	☒ PL Poland
☒ AT Austria	☒ IL Israel	☒ PT Portugal
☒ AU Australia	☒ IN India	☒ RO Romania
☒ AZ Azerbaijan	☒ IS Iceland	☒ RU Russian Federation
☒ BA Bosnia and Herzegovina	☒ JP Japan	
☒ BB Barbados	☒ KE Kenya	☒ SC Seychelles
☒ BG Bulgaria	☒ KG Kyrgyzstan	☒ SD Sudan
☒ BR Brazil	☒ KP Democratic People's Republic of Korea	☒ SE Sweden
☒ BY Belarus		☒ SG Singapore
☒ BZ Belize	☒ KR Republic of Korea	☒ SK Slovakia
☒ CA Canada	☒ KZ Kazakhstan	☒ SL Sierra Leone
☒ CH & LI Switzerland and Liechtenstein	☒ LC Saint Lucia	☒ TJ Tajikistan
☒ CN China	☒ LK Sri Lanka	☒ TM Turkmenistan
☒ CO Colombia	☒ LR Liberia	☒ TN Tunisia
☒ CR Costa Rica	☒ LS Lesotho	☒ TR Turkey
☒ CU Cuba	☒ LT Lithuania	☒ TT Trinidad and Tobago
☒ CZ Czech Republic	☒ LU Luxembourg	
☒ DE Germany	☒ LV Latvia	☒ TZ United Republic of Tanzania
☒ DK Denmark	☒ MA Morocco	☒ UA Ukraine
☒ DM Dominica	☒ MD Republic of Moldova	☒ UG Uganda
☒ DZ Algeria		☐ US United States of America
☒ EC Ecuador	☒ MG Madagascar	
☒ EE Estonia	☒ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia	☒ UZ Uzbekistan
☒ ES Spain		☒ VC Saint Vincent and the Grenadines
☒ FI Finland	☒ MN Mongolia	☒ VN Viet Nam
☒ GB United Kingdom	☒ MW Malawi	☒ YU Yugoslavia
☒ GD Grenada	☒ MX Mexico	☒ ZA South Africa
☒ GE Georgia	☒ MZ Mozambique	☒ ZM Zambia
☒ GH Ghana	☒ NO Norway	☒ ZW Zimbabwe

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

☒ NI - Nicaragua	☒ SY - Syrian Arab Republic	☐
☒ PG - Papua New Guinea	☐	☐

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

259

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 18 July 2002 (18. 07. 02)	60/39,244	US		
item (2)				
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☐ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ item (4) ☐ item (5) ☐ other, see Supplemental Box

** Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):* ....

.....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:

ISA / EPO .....

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*:

Date *(day/month/year)* Number Country *(or regional Office)*

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:		Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

259

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:		This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*:	Number of items
(a) In paper form, the following number of sheets:			
request (including declaration sheets)	6	1. ☒ fee calculation sheet	:
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	78	2. ☐ original separate power of attorney	:
claims	4	3. ☐ original general power of attorney	:
abstract	1	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:
drawings	5	5. ☐ statement explaining lack of signature	:
Sub-total number of sheets	94	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:
sequence listings	4	7. ☐ translation of international application into *(language)*:	:
tables related thereto		8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		9. ☒ sequence listings in computer readable form *(Indicate type and number of carriers)*	
Total number of sheets	98	(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application)	:
(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))		(ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*	:
(i) ☐ sequence listings		(iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column	:
(ii) ☐ tables related thereto		10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings *(Indicate type and number of carriers)*	
(c) ☒ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) only (and not as part of the international application)	:
(i) ☒ sequence listings		(ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*)	:
(ii) ☐ tables related thereto		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the		11. ☐ other *(specify)*:	:
☐ sequence listings:			
☐ tables related thereto:			
(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)			

Figure of the drawings which should accompany the abstract:	1	Language of filing of the international application:	ENGLISH

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Judy A. Erratt

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	☐ not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

260

IN THE CANADIAN PATENT OFFICE

The Receiving Office

In The Matter of International (PCT) Patent Application:

Original Applicant	:	**Helix BioPharma Corp.**
Current Owner	:	**Helix BioPharma Corp.**
Title	:	**Method And Composition For Inhibiting Cancer Cell Growth**
Our File	:	**08898277WO**
Date	:	**July 17, 2003**

The Commissioner of Patents
Ottawa-Hull, Canada K1A 0C9

Replacement of Page 5 of the Request Form

Dear Sir:

Further to our letter of July 16th for the above case, we have just noted a discrepancy in the priority application serial number. Enclosed is an amended Page 5 of the Request Form and we would kindly ask the Office to substitute this amended page for the one originally submitted.

Respectfully submitted,

GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

Agents for Applicant

Judy A. Erratt, Ph.D.
Direct Dial (613) 786-0199
JAE:gr
Encl.

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 18 July 2002 (18. 07. 02)	60/397,244	US		
item (2)				
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☐ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ item (4) ☐ item (5) ☐ other, see Supplemental Box

** Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):* ....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):*

ISA / EPO

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):*

Date *(day/month/year)* Number Country *(or regional Office)*

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*: Number of declarations

☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

IN THE EUROPEAN PATENT OFFICE

In The Matter of PCT International Patent Application:

Applicant	:	**Helix BioPharma Corp.**
Owner	:	**Helix BioPharma Corp.**
PCT Appln. No.	:	**PCT/CA03/01061**
PCT Filing Date	:	**July 16, 2003**
Title	:	**Use of Urease for Inhibiting Cancer Cell Growth**
Our File	:	**08898277WO**
Date	:	**January 28, 2004**

European Patent Office
Erhardstrasse 27
D-80331 Munich
GERMANY

Demand under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty;
and Request for Detailed Examination

Dear Sir:

The Applicant requests that the International Application specified above be made the subject of International Preliminary Examination according to Article 31 of the Patent Cooperation Treaty.

In addition, the Applicant requests detailed examination of this case.

The prescribed Demand form is attached hereto together with our remittance in the amount of 1689 euro.

Respectfully submitted,

GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP
160 Elgin Street, Suite 2600
Ottawa, Ontario
Canada K1P 1C3

Agents for Applicant

Judy A. Erratt, Ph.D.
Direct Dial (613) 786-0199
JAE:sg

263

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ _____

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only	
Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND

Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference
		08898277WO
International application No. PCT/CA03/01061	International filing date *(day/month/year)* 16 July 2003 (16.07.03)	(Earliest) Priority date *(day/month/year)* 16 July 2002 (16.07.02)
Title of invention Use of Urease for Inhibiting Cancer Cell Growth		

Box No. II APPLICANT(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*	Telephone No. 605-838-4300
Helix BioPharma Corp. 3-305 Industrial Parkway South Aurora, Ontario CANADA L4G 6X7	Facsimile No. 605-838-4350
	Teleprinter No.
	Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
CA	CA

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*	
State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*	
State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representative

and ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.

☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.

☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

ERRATT, Judy A.; SECHLEY, Konrad A.; COLTON, Ian; SCHROEDER, Hans; SMITH, Dallas F.; WADA, Ikuko
Gowling Lafleur Henderson LLP
160 Elgin Street, Suite 2600
Ottawa, Ontario
Canada K1P 1C3

Telephone No.
(613) 233-1781

Facsimile No.
(613) 563-9869

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filed

the description ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34

the claims ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)
☐ as amended under Article 34

the drawings ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34

2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).

4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54*bis*.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: ENGLISH

☒ which is the language in which the international application was filed.
☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.
☒ which is the language of publication of the international application.
☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

International application No.
PCT/CA03/01061

265

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

			For International Preliminary Examining Authority use only: received	not received
1. translation of international application	:	sheets	☐	☐
2. amendments under Article 34	:	sheets	☐	☐
3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	:	sheets	☐	☐
4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	:	sheets	☐	☐
5. letter	:	sheets	☐	☐
6. other *(specify)*	:	sheets	☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☐ original separate power of attorney
3. ☐ original general power of attorney
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
5. ☐ statement explaining lack of signature
6. ☐ sequence listing in computer readable form
7. ☐ tables in computer readable form related to a sequence listing
8. ☒ other *(specify)*: Bank Draft

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Judy A. Erratt Ph.D.

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
   ☐ The applicant has been informed accordingly.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.
6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54*bis*.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.
7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54*bis*.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.
8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54*bis*.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 03/01061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/50 A61K47/48 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 22987 A (ORAVAX INC) 31 August 1995 (1995-08-31) claims page 48, line 15 -page 49, line 12	1,12, 17-23
X	US 6 248 330 B1 (SUERBAUM SEBASTIEN ET AL) 19 June 2001 (2001-06-19) claims column 42, line 30 - line 42	1-4,12
X	US 6 126 938 A (QUENTIN-MILLET MARIE-JOSE ET AL) 3 October 2000 (2000-10-03) claims column 9, line 34 - line 46; figure 10	1,2,8,12
	-/—	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 November 2003	28/11/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Böhmerova, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 03/01061

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZIMBER A ET AL: "EFFECT OF UREASE INJECTIONS ON EHRLICH ASCITES TUMOR GROWTH IN MICE" PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 139, no. 1, 1972, pages 143-149, XP009019018 ISSN: 0037-9727	17-20
Y	Summary table I	3-11, 13-16, 21-23
Y	SHI G ET AL: "Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 80, no. 1-3, 23 April 2002 (2002-04-23), pages 309-319, XP004348644 ISSN: 0168-3659 abstract; figures 4,5	3,4,8-10
Y	HERRON J N ET AL: "ANTIBODIES AS TARGETING MOIETIES: AFFINITY MEASUREMENTS, CONJUGATION CHEMISTRY AND APPLICATIONS IN IMMUNOLIPOSOMES" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 28, no. 1/3, 1994, pages 155-166, XP000435246 ISSN: 0168-3659 abstract; figure 4	8-10
Y	WO 98 37207 A (HICKSON IAN DAVID ;IMP CANCER RES TECH (GB); EDWARDS SUSAN NICOLA) 27 August 1998 (1998-08-27) page 9, line 9 -page 13, line 13 claims page 15, line 19 - line 20	8-10, 21-23
Y	WO 01 00245 A (GENENTECH INC) 4 January 2001 (2001-01-04) page 34, line 17 -page 36, line 30	5-7
Y	BAGSHAWE K D ET AL: "A CYTOTOXIC AGENT CAN BE GENERATED SELECTIVELY AT CANCER SITES" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 58, 1988, pages 700-703, XP000121545 ISSN: 0007-0920 abstract	5-7

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 03/01061

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RAGHUNAND N ET AL: "Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH" BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 80, no. 7, June 1999 (1999-06), pages 1005-1011, XP002261347 ISSN: 0007-0920 abstract; figure 3 page 1010, right-hand column, paragraphs 2,3	13-16
Y	WAMPLER G L ET AL: "ANTI TUMOR ACTIVITY OF ACETO HYDROXAMIC-ACID" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 18, 1977, page 214 XP009020909 ISSN: 0569-2261 abstract	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 03/01061

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 2,11,21 (all partialy)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/CA 03 01061

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 2,11,21 (all partialy)

Present claims 2, 11 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to "a chemical entity effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells".

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the chemical entities as defined in claims 3-10.

Present claim 21 relates to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to "a targeting vector effective of selectively transfecting cancer cells"

An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the vector as claimed in claim 22.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATION. . SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 03/01061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9522987 A	31-08-1995	US 6290962 B1	18-09-2001
		AU 694195 B2	16-07-1998
		AU 1968195 A	11-09-1995
		BR 9506884 A	19-08-1997
		CA 2184057 A1	31-08-1995
		CZ 9602503 A3	11-12-1996
		EP 0751786 A1	08-01-1997
		FI 963281 A	22-10-1996
		HU 75374 A2	28-05-1997
		JP 9509661 T	30-09-1997
		NO 963508 A	21-10-1996
		NZ 282535 A	30-03-2001
		OA 10372 A	14-11-2001
		PL 316007 A1	23-12-1996
		SK 109496 A3	09-07-1997
		WO 9522987 A1	31-08-1995
		US 2003007980 A1	09-01-2003
US 6248330 B1	19-06-2001	WO 9514093 A1	26-05-1995
		AU 689779 B2	09-04-1998
		AU 6929094 A	12-12-1994
		AU 7508198 A	01-10-1998
		CA 2144307 A1	24-11-1994
		WO 9426901 A1	24-11-1994
		EP 0703981 A1	03-04-1996
		JP 8510120 T	29-10-1996
		SG 52480 A1	28-09-1998
		US 6258359 B1	10-07-2001
		US 5843460 A	01-12-1998
		JP 8509873 T	22-10-1996
US 6126938 A	03-10-2000	FR 2732605 A1	11-10-1996
		AU 5504996 A	23-10-1996
		CA 2192473 A1	10-10-1996
		EP 0765170 A1	02-04-1997
		WO 9631235 A1	10-10-1996
		HU 9700037 A2	28-10-1998
		JP 10501556 T	10-02-1998
		NO 965207 A	05-12-1996
		NZ 306483 A	26-08-1998
WO 9837207 A	27-08-1998	AU 6300798 A	09-09-1998
		WO 9837207 A1	27-08-1998
WO 0100245 A	04-01-2001	AU 5632900 A	31-01-2001
		AU 5763200 A	31-01-2001
		BR 0012196 A	19-03-2002
		BR 0012198 A	02-04-2002
		CA 2370466 A1	04-01-2001
		CA 2376596 A1	04-01-2001
		CN 1387444 T	25-12-2002
		CN 1370082 T	18-09-2002
		CZ 20014596 A3	12-02-2003
		DE 10084743 T0	14-08-2002
		EP 1191944 A2	03-04-2002
		EP 1189641 A2	27-03-2002
		GB 2368796 A	15-05-2002
		HU 0201616 A2	28-08-2002

INTERNATIO. .L SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 03/01061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0100245 A		HU 0201695 A2	28-09-2002
		JP 2003503365 T	28-01-2003
		JP 2003503366 T	28-01-2003
		NO 20016329 A	25-02-2002
		TR 200103756 T2	21-06-2002
		WO 0100244 A2	04-01-2001
		WO 0100245 A2	04-01-2001
		US 2003086924 A1	08-05-2003
		ZA 200109786 A	28-11-2002
		ZA 200110263 A	13-12-2002

PATENT COOPERATION TREATY

270

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Erratt, Judy A.
GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP
Suite 2600
160 Elgin Street
Ottawa, Ontario K1P 1C3
CANADA

RECEIVED
PCT
MAY 07 2004
WRITTEN OPINION
GOWLINGS

Date of mailing *(day/month/year)*	04.05.2004
Applicant's or agent's file reference 08-898277WO	**REPLY DUE** **within 3 month(s)** from the above date of mailing

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/CA 03/01061	16.07.2003	18.07.2002

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K38/50

Applicant
HELIX BIOPHARMA CORP.

1. This written opinion is the **first** drawn up by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

I	☒	Basis of the opinion
II	☐	Priority
III	☐	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	☐	Lack of unity of invention
V	☒	Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	☐	Certain documents cited
VII	☐	Certain defects in the international application
VIII	☐	Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also: For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 bis.
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 18.11.2004

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:

European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer
Böhmerova, E

Formalities officer (incl. extension of time limits)
Ladurner, Y
Telephone No. +49 89 2399-7913

I. Basis of the opinion

1. With regard to the **elements** of the international application *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed")*:

Description, Pages

1-78 as originally filed

Claims, Numbers

1-23 as originally filed

Drawings, Sheets

1/5-5/5 as originally filed

Sequence listing part of the description, pages:

1/4-4/4, as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

   These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

   - ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
   - ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
   - ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

   - ☒ contained in the international application in written form.
   - ☒ filed together with the international application in computer readable form.
   - ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
   - ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
   - ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
   - ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

   - ☐ the description, pages:
   - ☐ the claims, Nos.:
   - ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This opinion has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1,17,21
Inventive step (IS)	Claims	-
Industrial applicability (IA)	Claims	1,17,21

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Cited documents

Reference is made to the following documents:
D1: WO 95 22987 A (ORAVAX INC) 31 August 1995
D2: US-B1-6 248 330 (SUERBAUM SEBASTIEN ET AL) 19 June 2001
D3: US-A-6 126 938 (QUENTIN-MILLET MARIE-JOSE ET AL) 3 October 2000
D4: ZIMBER A ET AL: 'EFFECT OF UREASE INJECTIONS ON EHRLICH ASCITES TUMOR GROWTH IN MICE' PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 139, no. 1, 1972, pages 143-149

Unless indicated otherwise reference is made to the passages considered relevant in the search report.

N velty

Subject-matter of independent claims 1,17,21 is considered to lack novelty under Art. 33(1) and (2) PCT for the following reasons:

Claim 1

Present claim 1 is directed to a pharmaceutical composition comprising a urease enzyme for the use in inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject which represent so-called first medical use formate. It is to be stressed that in such case, the intended medical application (inhibition of growth of cancer cells) is not a relevant feature which could establish novelty of the subject-matter of such claim over the prior art teaching any medical use of the same active compound.

D1-D4 all disclose pharmaceutical compositions comprising urease and medical uses thereof. D1 discloses the use of urease from *Helicobacter pylori* for the treatment and prevention of gastroduedenal diseases including low grade MALT lymphomas. D2 discloses a vaccine inducing protective antibodies against *Helicobacter pylori*

comprising urease and excipients, such as cellulose derivatives or PEG400.
D3 discloses a pharmaceutical composition for inducing immune response comprising urease entrapped in liposomes. D4 teaches that injection of jack bean urease reduces size of Ehrlich ascites tumor in mice. The above disclosure of D1-D4 anticipates novelty of present claim 1.

Claim 17

Independent claim 17 is directed to the use of urease enzyme in the manufacture of a medicament for treating or diagnosing cancer in a mammalian subject. Novelty of the subject-matter of claim 17 is anticipated by the above disclosure of D1 and D4.

Claim 21

Independent claim 21 is directed to a gene therapy composition comprising a targeting vector effective, when administered to the subject. of selectively transfecting cancer cells, and carried in said vector, a recombinant nucleic acid sequence effective to produce a urease mRNA in transfected cancer cells.

As claim 21 is in the form of the so-called first medical use, the intended medical application of the composition (inhibition of growth of cancer cells in a mammalian subject) is not a relevant feature which could establish novelty of the subject-matter of the claim over the prior art disclosing any medical use of the same composition.

As already stated in the search report, an attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved which renders the subject-matter of claim 21 unclear under Article 6 PCT . Product features necessary to achieve said effect should be defined in the claim.

D1 discloses a composition for the treatment of a gastroduodenal diseases in a mammal comprising recombinant live vector expressing *Helicobacter* urease peptide, the vector being preferably an adenovirus. Although D1 does not disclose that said vector selectively transfects cancer cells, D1 discloses all the relevant product features of the composition according to claims 21 (see the previous paragraph), the disclosure thereof is consequently considered as anticipating novelty of this claim.

Inventiveness

As the subject-matter of claim 1, 17, 21 is considered as lacking novelty, no inventiveness can be acknowledged at this stage.

Industrial applicability

Subject-matter of independent claims 1,17,21 is considered to be industrially applicable under Art. 33(1) and (4) PCT.

IN THE EUROPEAN PATENT OFFICE

FILE COPY

In The Matter of PCT International Patent Application:

Applicant	:	**Helix BioPharma Corp.**
Owner	:	**Helix BioPharma Corp.**
PCT Appln. No.	:	**PCT/CA03/01061**
PCT Filing Date	:	**July 16, 2003**
Title	:	**Use of Urease for Inhibiting Cancer Cell Growth**
Our File	:	**08898277WO**
Date	:	**August 4, 2004**

European Patent Office
Erhardstrasse 27
D-80331 Munich
GERMANY

Response to Written Opinion

Amendment under Article 34 of the PCT

Dear Sirs:

In response to the Written Opinion dated May 4, 2004 Applicant wishes to amend the application as follows.

IN THE CLAIMS:

Claims 1, 17 and 21-23: Amend.

Claim 2: Cancel.

Claims 3-23 renumber as new Claims 2-22.

Amended claim pages are submitted herewith.

REMARKS

Reconsideration of this application is respectfully requested having regard to the foregoing amendments and the following comments.

Applicant has amended Claims 1 and 17 to include a chemical entity attached to the urease enzyme as described in original Claim 2. Claim 21 is amended to a second medical use format. Claim 2 has been deleted. The remaining claims have been renumbered and amended to conform to this new format, to correct dependencies and also to correct typographical errors.

Novelty

Claim 1 was rejected as allegedly anticipated by the following references:

D1: PCT Publication No. WO 95/22987;
D2: US Patent No. 6,248,330;
D3: US Patent No. 6,126,938; and
D4: Zimber et al. Proc. Soc. Exper. Bio. Med., 139(1):143-149, (1972).

Claim 17 was rejected as allegedly anticipated by D1 and D4.

Claim 21 was rejected as allegedly anticipated by D1.

The Present Invention

Independent claim 1 relates to a pharmaceutical composition comprising (i) a urease enzyme, (ii) a chemical entity attached to the urease enzyme and being effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells when the composition is administered to the subject, and (iii) a pharmaceutical carrier.

Independent claim 17 relates to the use of a urease enzyme and a chemical entity attached to the urease enzyme, where the chemical entity is effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells when the composition is administered to the subject in the manufacture of a medicament for treating or diagnosing cancer in a mammalian subject.

Independent claim 21 relates to the use of a gene therapy composition for manufacture of a medicament for inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject. The composition comprises a targeting vector effective, when administered to the subject, of selectively transfecting cancer cells, and carried in the vector, a recombinant nucleic acid sequence that is effective to produce a urease mRNA in transfected cancer cells.

The Prior Art

D1 relates to the prevention and treatment of Helicobacter infection in mammals. D1 provides a composition comprising a Helicobacter urease peptide for the treatment of gastroduodenal disease associated with Helicobacter infection.

D2 describes an immunogenic composition for inducing protective antibodies against Helicobacter infection using the urease polypeptides of *H. felis*.

D3 relates to a composition and method for inducing a protective immune response against an antigen at a mucosal effector site comprising at least two inducing agents. One of the inducing agents is administered nasally and the other is administered at a mucosal site, but not nasal. In one embodiment, the antigen is the apoenzyme form of *Helicobacter pylori* urease for protection against *Helicobacter pylori* infection.

D4 discloses a method of causing hydrolysis of endogenous urea by injection of crystalline jack bean urease to treat Ehrlich ascites tumor cells.

Analysis

1. Rejection over claim 1

As noted above, amended claim 1 includes a urease enzyme, a chemical entity attached to the urease enzyme, and a pharmaceutical carrier.

Each of D1, D2, D3, and D4 fail to teach, at least, a chemical entity attached to the urease enzyme where the chemical entity is effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells.

Therefore, the Invention as presently claimed defines over D1, D2, D3, and D4.

2. Rejection over claim 17

As noted above, claim 17, as amended, is directed to the use of a urease enzyme and a chemical entity attached to the enzyme for used in the manufacture of a medicament for treating or diagnosing cancer in a mammalian subject. As noted in Section 1. above, each of D1 and D4 fail to teach the use of a urease enzyme and a chemical entity attached to the enzyme.

Further, D1 fails to teach the use of a urease enzyme in a medicament for inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject.

D1 clearly teach treatment of gastroduedenal diseases, including MALT lymphoma, by treatment or prevention of the underlying Helicobacter infection (see D1, page 27, lines 18-20) and not by inhibiting growth of the MALT cells. Thus, D1 can only fairly be said to teach treatment of Helicobacter infection.

Therefore, the invention, as embodied by claim 17, defines over D1 and D4.

3. Rejection over claim 21

With regard to claim 21, D1 fails to teach the use of a gene therapy composition for use in the manufacture of a medicament for inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject. D1 states that urease from *Helicobacter pylori* may be used for the treatment and prevention of gastroduedenal diseases including low grade MALT lymphomas. However, these lymphomas are known to be associated with Helicobacter infection (see D1, page 3, lines 16-22). From a careful reading of D1 it is clear that the gastroduedenal diseases are treated or prevented by treatment of the underlying Helicobacter infection (see D1, page 27, lines 18-20) and not by inhibiting growth of the MALT cells. Thus, D1 can only fairly be said to teach treatment of Helicobacter infection.

Therefore, the invention described in claim 21 defines over D1.

Reconsideration of the claims as amended is respectfully requested.

Respectfully submitted,

GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP
160 Elgin Street, Suite 2600
Ottawa, Ontario
Canada K1P 1C3

COPY

Agents for Applicant

Judy A. Erratt, Ph.D.
Direct Dial (613) 786-0199
JAE:jm
Encls.

IT IS CLAIMED:

1. A pharmaceutical composition comprising:

a urease enzyme;

a chemical entity attached to the urease enzyme and being effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells when the composition is administered to the subject; and

a pharmaceutical carrier.

2. The composition of claim 1, wherein said chemical entity includes a hydrophilic polymer (i) conjugated to the urease, (ii) selected from the group consisting of polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, polyvinylmethylether, polyhydroxypropyl methacrylamide, polyhydroxypropyl methacrylate, polyhydroxyethyl acrylate, polymethacrylamide, polydimethylacrylamide, polymethyloxazoline, polyethyloxazoline, polyhydroxyethyloxazolione, polyhydroxypropyoxazoline, polyaspartamide, and hydrophilic cellulose derivatives, and (iii) present in an amount effective to extend the blood circulation time or reduce the antigenicity of said composition relative to native urease.

3. The composition of claim 2, wherein said hydrophilic polymer is polyethylene glycol having a molecular weight between about 1,000 and 10,000 daltons.

4. The composition of claim 1 or 2, wherein said chemical entity is a targeting moiety attached to said urease and selected from the group consisting of an anti-tumor antigen antibody, anti-hCG antibody, and a ligand capable of binding specifically to cancer-cell surface receptors.

5. The composition of claim 4, wherein said targeting moiety is a polypeptide, and said composition is a fusion protein of the targeting moiety and urease enzyme.

6. The composition of claim 4, wherein said urease includes, at its C- or N-terminus, a first coil-forming peptide characterized by a selected charge and an ability to interact with a second, oppositely charged coil-forming peptide to form a stable α-helical coiled-coil heterodimer; and said chemical entity includes a targeting moiety which includes said second coil-forming peptide.

7. The composition of claim 1, wherein said chemical entity includes vesicles having urease enzyme in entrapped form.

8. The composition of claim 7, wherein said vesicles are liposomes which are long-circulating by virtue of an exterior coating of polyethylene glycol chains, and sized to extravasate into tumor regions, when the composition is administered intravenously.

9. The composition of claim 7, wherein said vesicles are liposomes having surface bound targeting moieties selected from the group consisting of an anti-tumor antigen antibody, anti-hCG antibody, and ligands capable of binding specifically to cancer-cell surface receptors.

10. The composition of claim 1, wherein said chemical entity includes a urease inhibitor associated therewith, in an amount sufficient to inhibit the activity of said enzyme.

11. The composition of claim 1, wherein said urease is a plant or bacterial urease.

12. The composition of claim 1, further comprising an agent selected from the group consisting urea, a therapeutically active anti-tumor agent and an imaging agent.

13. The composition of claim 12, which further includes vesicles containing the urease and agent in entrapped form.

14. The composition of claim 1, further comprising a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.

15. The composition of claim 14, wherein the anti-tumor compound is selected from the group consisting of doxorubicin, daunorubicin, mitoxanthrone,
epirubicin, mitomycin, bleomycin, vinca alkaloids such as vinblastine and vincristine, alkylating agents such as cyclophosphamide and mechlorethamine hydrochloride, and antrineoplastic purine and pyrimidine derivatives.

16. The use of a composition comprising a urease enzyme and a chemical entity attached to the urease enzyme and being effective to enhance the delivery of the enzyme to cancer cells when the composition is administered to the subject in the manufacture of a medicament for treating or diagnosing cancer in a mammalian subject.

17. The use of claim 16, in the manufacture of a medicament for treating a solid tumor in a mammalian subject.

18. The use of claim 16, in the manufacture of a medicament for treating a solid tumor in a subject who is being treated with a weakly basic anti-tumor compound whose effectiveness is reduced by a higher intracellular/lower extracellular pH gradient in a solid tumor.

19. The use of claim 16, in the manufacture of a medicament for use in generating diagnostic information about the pH within a solid tumor region in a subject.

20. Use of a gene therapy composition for manufacture of a medicament for inhibiting growth of cancer cells in a mammalian subject, said composition comprising

a targeting vector effective, when administered to the subject, of selectively transfecting cancer cells, and

carried in said vector, a recombinant nucleic acid sequence effective to produce a urease mRNA in transfected cancer cells.

21. The use of claim 20, wherein said vector is an adenovirus.

22. The use of claim 20, wherein said sequence encodes urease and a secretory leader sequence effective to promote secretion of the urease from the transfected cancer cells.

284

284

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05003465 00000000 Folios: 283
Fecha (AMD): 2005-01-18 16:23:10
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN MODELO DE UTILIDAD	( )	( )
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	( )
- Descripción de la invención.	( )	( )
- Dibujos de ser estos pertinentes.	( )	( )
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta	( )	( )
- la solicitud.		
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
ESQUEMA DE TRAZADO ( )		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	( )	( )
Representación gràfica del esquema de trazado	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )

Firma Responsable:

Fecha:

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

285

2020

Bogotá D C
Doctor(a)
DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
Apoderado(a)
HELIX BIOPHARMA

No de Expediente	**05-3465**
Solicitud internacional	**PCT/CA2003/001061**
Fecha límite inicio fase nacional	**2005-02-18**
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,
04 FEB 2005
202063